



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

***“Análisis in vivo de la microarquitectura y de la respuesta de  
linfocitos B y T en el ganglio linfático regional ante la infección  
cutánea con Virus Dengue”***

**TESIS**

Que presenta

**M. en C. EDITH MARCIAL JUÁREZ**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**BIOLOGÍA CELULAR**

Directores de la Tesis:

**Dr. José Leopoldo Flores Romo**

**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 y la Dra. Leticia Cedillo Barrón. Para el desarrollo de este proyecto se obtuvo la beca de Doctorado (CVU: 553410) durante el periodo 2015-2019 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).

## Agradecimientos

Al Dr. Leopoldo Flores Romo por abrirme las puertas de su lab, por su invaluable apoyo en cada etapa y por todas las enseñanzas que, sin duda, perdurarán a través de los años.

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón por su amable disposición, guía y cariñoso apoyo a lo largo de mi formación profesional.

Al comité tutorial, Dra. Luvia Sánchez Torres, Dr. Rommel Chacón Salinas, Dr. Francisco García Sierra, Dr. José Manuel Hernández Hernández por enriquecer el proyecto con su experiencia, con las observaciones y las discusiones generadas.

Al Cinvestav y al Departamento de Biología celular por la formación profesional de alta calidad brindada.

Al CONACYT, por la beca de Doctorado y de movilidad otorgada.

Al personal administrativo del Departamento de Biología Celular, Clara y Cuquis.

Al personal técnico de citometría de flujo, Victor Rosales y de microscopia confocal, Jaime Escobar.

Al Dr. Julio García Cordero por su amistad y su disposición de apoyar en todo momento.

A la M en C. Juana Calderón Amador, a Yola, a Grecia y a Froy por su apoyo técnico.

Al Prof. Adam Cunningham por recibirme en su laboratorio para la realización de una estancia de investigación y por todo el apoyo subsecuente para la obtención de la Newton International Fellowship.

A Noni y Marisol por toda su ayuda en el lab de Adam durante la estancia realizada.

A los integrantes del laboratorio de Biomedicina Molecular, Paola, Sofi, Alfredo, Gaurav, Giovanni, Vero y del laboratorio 15 de Biología Celular, Juan Carlos, por inducirme en el camino científico y a Raúl, Rafa, Estela, Felipe, Uziel, Mariana por las discusiones científicas generadas, su amistad y apoyo.

A mi amiga Zoraida, por confiar y creer en mí.

A hermano, por su amor y apoyo incondicional en cada momento de este sinuoso camino.

A mi mamá, por ser el mejor ejemplo de esfuerzo, valentía y perseverancia. Por su amor y apoyo incondicional que ha sido el motor que me ha permitido culminar esta etapa.

# CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
MARCO TEÓRICO.....	2
ANTECEDENTES .....	9
REFERENCIAS .....	11
JUSTIFICACIÓN .....	14
HIPÓTESIS .....	14
OBJETIVOS .....	15
<i>General</i> .....	15
<i>Particulares</i> .....	15
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>16</b>
<b>IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DENGUE DESDE SU ENTRADA EN LA PIEL HASTA SU DISTRIBUCIÓN DENTRO DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS .....</b>	<b>16</b>
RESUMEN .....	16
INTRODUCCIÓN .....	17
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN .....	24
REFERENCIAS .....	27
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>32</b>
<b>CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE LINFOCITOS T Y B EN GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES ANTE LA INFECCIÓN CUTÁNEA CON EL VIRUS DENGUE .....</b>	<b>32</b>
RESUMEN .....	32
INTRODUCCIÓN .....	33
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN .....	51
REFERENCIAS .....	54
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>59</b>
<b>REMODELACIÓN DE LAS POBLACIONES ESTROMALES DE GANGLIOS LINFÁTICOS ANTE LA INFECCIÓN CUTÁNEA CON EL VIRUS DENGUE.....</b>	<b>59</b>
RESUMEN .....	59
INTRODUCCIÓN .....	60
RESULTADOS.....	61
DISCUSIÓN .....	74

REFERENCIAS .....	76
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>80</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>80</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>91</b>

## Lista de figuras

FIG. 1. 1. SISTEMA LINFÁTICO Y MICROARQUITECTURA DE LNs. ....	7
FIG. 1. 2. CENTRO GERMINAL Y SISTEMA DE CONDUCTOS DE LOS LNs. ....	8
FIG. 2. 1. LA INOCULACIÓN DEL DENV MARCADO FLUORESCENTEMENTE PERMITE SU IDENTIFICACIÓN EN LA PIEL DE RATONES INMUNOCOMPETENTES. ....	19
FIG. 2. 2. LA INOCULACIÓN DEL DENV MARCADO FLUORESCENTEMENTE PERMITE SU IDENTIFICACIÓN EN LA PIEL DE RATONES INMUNOCOMPETENTES. ....	20
FIG. 2. 3. DENV Y CÉLULAS B EN CRIOSECCIONES DE DLNs DE RATONES INOCULADOS CUTÁNEAMENTE CON DENV MARCADO FLUORESCENTEMENTE. ....	21
FIG. 2. 4. DENV Y MACRÓFAGOS CD169+ O F4/80+ EN LNs REGIONALES. ....	22
FIG. 2. 5. DENV Y DCs EN GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES. ....	23
FIG. 2. 6. EVALUACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DE CÉLULAS DENV+ EN LNs REGIONALES. ....	24
FIG. 3. 1. ORGANIZACIÓN DE LOS COMPARTIMENTOS DE CÉLULAS T Y B EN DLNs DESPUÉS DE LA INFECCIÓN CUTÁNEA CON EL DENV. ....	36
FIG. 3. 2. ORGANIZACIÓN DE LOS COMPARTIMENTOS DE CÉLULAS T Y B EN DLNs DESPUÉS DE LA INMUNIZACIÓN CUTÁNEA CON EL IDENV. ....	37
FIG. 3. 3. ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO IN SITU DE LOS DLNs DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN CUTÁNEA CON EL IDENV Y EL DENV. ....	38
FIG. 3. 4. DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS PROLIFERANTES EN LOS FOLÍCULOS DE CÉLULAS B Y EN EL ÁREA PARACORTICAL (CÉLULAS T). ....	40
FIG. 3. 5. LOS TBMs SE RECLUTAN ABUNDANTEMENTE DENTRO DEL GC ANTE LA INFECCIÓN CUTÁNEA CON EL DENV. ....	43
FIG. 3. 6. ANÁLISIS DE LAS SUSPENSIONES CELULARES DE LINFOCITOS B Y T POR CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA. ....	44
FIG. 3. 7. LA INOCULACIÓN CUTÁNEA CON DENV ACTIVA A LOS LINFOCITOS B MUCHO MÁS QUE A LOS LINFOCITOS T. ....	46
FIG. 3. 8. DENV INDUCE UNA FUERTE PROLIFERACIÓN EN LOS LINFOCITOS B, PERO NO EN LOS LINFOCITOS T DE LOS DLNs. ....	47
FIG. 3. 9. DENV INDUCE LA ENTRADA DE LOS LINFOCITOS B EN FASES ACTIVAS DEL CICLO CELULAR, PERO LOS LINFOCITOS T PERMANECEN EN FASE QUIESCENTE. ....	49
FIG. 3. 10. LAS CÉLULAS T NO PARECEN EXPERIMENTAR APOPTOSIS SIGNIFICATIVA DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN CUTÁNEA CON DENV. ....	50
FIG. 4. 1. LAS FDCs SE EXPANDEN EN LOS FOLÍCULOS DE LOS DLNs DEBIDO A LA INOCULACIÓN CUTÁNEA CON DENV. ....	62
FIG. 4. 2. VASOS LINFÁTICOS EN DLNs DE RATONES INMUNIZADOS CON DENV. ....	64
FIG. 4. 3. DISTRIBUCIÓN DE ANTÍGENOS SOLUBLES POR VASOS LINFÁTICOS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN CUTÁNEA CON DENV. ....	65
FIG. 4. 4. EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CCL21 IN SITU Y LA INTEGRIDAD DE LOS CONDUCTOS DE FRCs. ....	68
FIG. 4. 5. REMODELAMIENTO EN LA VASCULATURA SANGUÍNEA INDUCIDA POR EL DENV. ....	71
FIG. 4. 6. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD VASCULAR SANGUÍNEA EN LNs ANTE LA INFECCIÓN CON DENV. ....	73
FIG. 5. 1. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS ESTROMALES DE LNs: FRCs, LECs Y BECs POR CITOMETRÍA DE FLUJO. ....	88

## Resumen

### **“Análisis *in vivo* de la microarquitectura y la respuesta inmune de linfocitos B y T en ganglio linfático regional ante la infección cutánea con virus dengue”**

Los ganglios linfáticos (LNs) son órganos altamente especializados en la generación de respuestas inmunes adaptativas. Para ello, es indispensable el encuentro entre células del sistema inmune y microorganismos que han traspasado las barreras físicas como la piel y mucosas. Nos propusimos estudiar la distribución del DENV en LNs desde su entrada en la piel, las respuestas de activación y proliferación de linfocitos T y B, así como el remodelamiento de células estromales y endoteliales en LNs regionales de ratones inmunocompetentes ante la infección cutánea con DENV.

El DENV se localizó rápidamente en LNs tras su inoculación en piel asociado principalmente con células dendríticas, macrófagos CD169+ y dentro de los folículos de linfocitos B desde 1 h post inoculación (p.i.) cutánea. A tiempos más tardíos, 3 días p.i., se detectó una proporción muy importante de linfocitos B activados (CD69+), disminuyendo a tiempos tardíos. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ mostraron una mínima expresión de CD69 desde los 3 días y hasta los 23 días p.i. Encontramos un notable agrandamiento en los folículos de linfocitos B que ocupan casi la mitad del área total de los DLNs, en comparación con un ≈24% en condiciones basales. Dichos folículos albergan gran cantidad de células proliferantes desde los 7 días p.i con un pico máximo a los 14 días y disminuyendo para los 28 y 49 días. Además, dentro de los centros germinales (GCs) notamos un reclutamiento importante de macrófagos fagocitando cuerpos apoptóticos. Los linfocitos T Ki-67+ se encontraron dispersos y distribuidos al azar en la paracorteza de los LNs de manera muy similar que en los ratones no infectados. La aparente falta de respuestas de las células T no es atribuible a la muerte por apoptosis ya que no se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones no infectados.

Encontramos una expansión importante de la red de células dendríticas foliculares (FDCs) ocupando toda el área de los GCs, sin la clásica compartimentalización en zona clara y oscura. La vasculatura linfática se encontró incrementada principalmente en la zona medular del LN manteniéndose así hasta tiempos tardíos p.i., esto provocó una mayor captación de antígenos solubles. Las células fibroblásticas reticulares desregularon la expresión del marcador reticular ER-TR-7, sin embargo, se mantuvo la producción de la quimiocina CCL21, y el andamiaje para el tráfico de células acarreadoras de antígenos particulados grandes. La vasculatura sanguínea también sufrió un incremento en el número de vasos y mayor cantidad de azul de Evans fue retenido en los LNs en ratones infectados con DENV. Importantemente, se encontró hemorragia en LNs de ratones infectados con DENV 10 días p.i., por la presencia abundante de eritrocitos fuera de los vasos sanguíneos.

Estas observaciones contribuyen para una mejor comprensión de la respuesta inmune innata y adaptativa fundamental desencadenadas por la infección con el DENV.

## Abstract

### "Microarchitecture and immune response of B and T lymphocytes in draining lymph nodes after cutaneous Dengue virus infection "

Lymph nodes (LNs) are highly specialized organs where adaptive immune responses take place. This requires crucial interactions between relevant immune cells and incoming microorganisms that have disrupted physical barriers such as the skin and mucosae. We aim to study the distribution of DENV in LNs from its entry into the skin, the activation and proliferation responses of T and B lymphocytes, as well as the remodeling of stromal and endothelial cells of regional LNs of immunocompetent mice after cutaneous DENV infection.

DENV was rapidly located in LNs after cutaneous inoculation and mainly associated with dendritic cells, CD169+ macrophages and within B-lymphocyte follicles from 1h post cutaneous inoculation (p.i.). Later, 3 days p.i., a very important proportion of activated B lymphocytes (CD69+) were detected and decreased over time. While CD4 + and CD8 + T cells showed minimal expression of CD69 from 3 days to 23 days p.i. We found a greatly enlarged B cell follicles, occupying almost half of the draining LN area compared to ≈24% in naïve conditions. The follicles hosted enormous clusters of proliferating cells from 7 days p.i, with a maximum peak at 14 days and decreasing for 28 and 49 days. Inside germinal centers (GCs) we noticed, an important recruitment of tingle body macrophages removing apoptotic cells. Scattered randomly distributed Ki-67+ T cells were found in the paracortex, similarly to non-infected mice. The apparent lack of T cell responses cannot be attributed to apoptosis since no significant differences were observed compared to non-infected mice.

We found an important expansion of the follicular dendritic cells (FDCs) network, occupying the entire area of the GCs and lacking the classic light zone and dark zone compartmentalization. The lymphatic vasculature was found increased in the medullary area of the LNs until later times p.i., this caused an increased uptake of soluble antigens. The fibroblastic reticular cells deregulated the expression of the ER-TR-7 reticular marker but the production of the chemokine CCL21 and the scaffolding for the traffic of large particulate antigen-bearing cells was maintained. The blood vasculature also experienced an increase in the number of vessels and more Evans blue was retained in LNs from DENV infected mice. Importantly, hemorrhage was found in LNs evidenced by the abundant presence of erythrocytes outside the blood vessels after 10 days p.i. of DENV.

These observations contribute to a better understanding of the fundamental innate and adaptive immune response triggered by DENV infection.



# CAPÍTULO 1

## Introducción

## MARCO TEÓRICO

### Sistema inmune y microorganismos

El ser humano está expuesto continuamente a agentes microbianos, potencialmente patógenos que ponen en riesgo su salud y supervivencia. Por lo tanto, está dotado de un sistema inmunológico compuesto de órganos linfoides primarios que generan (medula ósea) y en donde maduran (timo) las células inmunitarias que trabajan en conjunto para contrarrestar dichas amenazas. El sistema linfático y el sistema circulatorio permiten la constante recirculación de células hematopoyéticas mientras que las células estromales conforman la estructura de los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos [LNs]), etc) y dirigen la migración dentro de ellos para facilitar el encuentro entre antígenos y escasas células específicas y con ello, el desarrollo de respuestas inmunes protectoras.

### El sistema linfático

El sistema linfático juega un papel muy importante tanto en mantener un balance osmótico a nivel sistémico, así como en el transporte de lípidos y proteínas a través de la linfa. Como parte fundamental de este sistema se encuentran distribuidos concatenadamente los LNs (~ 450 en humanos, 23 en ratón [1]), órganos altamente especializados en donde se llevan a cabo respuestas inmunes adaptativas [2]. Es en estos órganos convergen tanto escasas células específicas como antígenos microbianos provenientes de los epitelios y mucosas de exposición en la periferia, propiciando así tanto la vigilancia inmunológica y la homeostasis con respuestas adaptativas efectivas para contrarrestar los microorganismos.

El flujo a través del sistema linfático comienza con la extravasación de plasma de los capilares sanguíneos hacia los espacios intersticiales en los tejidos, debido a gradientes de presión tanto osmóticos como hidrostáticos. Una porción de este líquido intersticial es colectado por capilares linfáticos que atrapan indistintamente macromoléculas y células debido a un sistema de apertura y cierre. La linfa así formada llega hasta vasos colectores que dirigen el flujo hacia los ganglios linfáticos regionales (drenantes, DLNs) para posteriormente incorporarse a vasos de mayor calibre y finalmente drenar al ducto torácico que incorporará la linfa ya filtrada al torrente sanguíneo a través de la vena subclavia, y de este modo cerrar el circuito de tránsito [3].

### Órganos linfoides secundarios

Los órganos linfoides secundarios comprenden, entre otros: el bazo, los LNs, amígdalas y las placas de Peyer (PP), todos involucrados en la generación de respuestas inmunes adaptativas contra antígenos transportados vía linfática (LNs) o sanguínea (bazo).

En particular, los LNs son órganos capsulados, en forma arriñonada y altamente organizados para montar respuestas inmunes adaptativas contra microorganismos, para ello son necesarias las interacciones antígenos-células. Se ha calculado que en ratón existen alrededor de 20-200 células T naïve específicas para un determinado complejo principal de histocompatibilidad-péptido (pMHC), por lo que las (muy escasas) probabilidades de interacción entre células presentadoras de antígenos (APC) y linfocitos específicos se incrementan notablemente en los órganos linfoides debido a la constante recirculación de células y a la llegada de antígenos vía linfática [4]. Una vez que se ha producido el encuentro entre ambos componentes cruciales, los LNs proporcionan todas las condiciones necesarias para una eficiente respuesta inmune con la generación de linfocitos de memoria, anticuerpos de alta afinidad y linfocitos T cooperadores efectores.

### **Estructura de ganglios linfáticos**

Para efectuar dichas respuestas inmunes es crucial que los LNs mantengan una micro anatomía finamente organizada. Histológicamente, se pueden distinguir tres áreas principales en los LNs: la corteza, la paracorteza y médula. Cada una de estas áreas alberga diferentes poblaciones celulares que en homeostasis y dependiendo de las señales inflamatorias y/o de daño tisular, constantemente interactúan entre ellas y migran de una zona a otra.

En la corteza, se localizan los linfocitos B agrupados en folículos y ante el encuentro con un antígeno, podrían experimentar una compleja reacción celular, denominada reacción de centro germinal (GC), dando como resultado células B de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos. Para que estos procesos de diferenciación celular sean óptimos, es de fundamental importancia la presencia de células dendríticas foliculares (FDCs) dentro del GC, éstas contribuyen a la selección de linfocitos B que hayan mejorado o no su afinidad por el antígeno luego de experimentar hipermutación somática en su BCR (*B cell receptor*). Idealmente, aquellas células saldrán del GC diferenciadas en células B de memoria o células plasmáticas secretoras de anticuerpos de alta afinidad. Macrófagos (*tingible body macrophage*, TBMs) especializados en la remoción de células apoptóticas que no fueron seleccionadas también se localizan dentro de los GCs.

Por debajo de la corteza se localiza la paracorteza del LN, en esta zona residen tanto células hematopoyéticas como linfocitos T, células dendríticas (DCs) convencionales y macrófagos, así como células no-hematopoyéticas o estromales, entre ellas, células fibroblásticas reticulares (FRCs), células del endotelio linfático (LECs) y células del endotelio sanguíneo (BECs).

La médula se localiza en la parte central y cóncava del LN (íleo) donde se encuentran los cordones y senos medulares delineados por las LECs. En esta zona se acumula la linfa que ha alcanzado el LN mediante vasos linfáticos aferentes. Durante el flujo linfático, la linfa se distribuye por el seno subcapsular y el seno medular para luego salir por los vasos linfáticos eferentes. En los cordones medulares, se encuentran las células que están próximas a salir del LN, por ejemplo: linfocitos activados, macrófagos, plasmablastos y células plasmáticas, etc. Estas células, se incorporarán a la circulación sanguínea y posteriormente pueden llegar al tejido infectado donde desempeñarán su función efectora.

### **Células estromales dentro del ganglio linfático**

Además de las poblaciones hematopoyéticas bien reconocidas dentro de los LNs, como: linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas, macrófagos, etc., existe un grupo de células no hematopoyéticas como las FRCs, BECs, LECs, pericitos (IAPs), células reticulares marginales (MRCs), y FDCs, todas ellas conforman la microarquitectura del LN cumpliendo tareas indispensables para el óptimo desempeño funcional de dichos órganos.

### **Células fibroblásticas reticulares**

Las FRCs, son un tipo de célula estromal presente principalmente en la paracorteza y médula de los LNs, rodeando a las vénulas del endotelio alto (HEVs) y delineando el seno cortical. Comprenden de un 20-50% de la población no-hematopoyética en los LNs [5, 6]. Durante mucho tiempo se pensó que esta población estromal sólo estaba involucrada en el soporte estructural de los LNs, sin embargo, recientemente varios autores han reportado importantes funciones inmunológicas asociadas a las FRCs.

De las primeras funciones inmunológicas que se le atribuyeron a este tipo celular destacan la secreción de citocinas, como IL-7, la cual es crítica para la supervivencia de linfocitos T naïve y DCs [6, 7]. Otras quimiocinas importantes para el reclutamiento de los linfocitos T y las DCs a su zona correspondiente en el LNs son CCL19 y CCL21, las cuales son secretadas primordialmente por FRCs contribuyendo a la compartimentalización y direccionamiento de linfocitos dentro de los LNs [8, 9].

Una de las vías para el tráfico de antígenos dentro de los LNs es mediante conductos formados por las FRCs. Estos conductos tienen un papel importante dentro de los LN, ya que proveen las vías por las cuales los antígenos, los linfocitos y las células presentadoras de antígeno migran en el LN coadyuvando al encuentro e interacción de complejos pMHC presentes en células presentadoras de antígeno (APCs) con linfocitos T específicos. Por otro lado, permiten la conducción e interacción de antígenos solubles en su conformación nativa con linfocitos B naïve [10–13]. Para que la interacción entre DCs y FRCs se dé, se sugiere que

la presencia de podoplanina en las FRCs juega un papel crucial, ya que su ligando, CLEC-2 se sobre expresa en DCs maduras propiciando su migración sobre la red de FRCs dentro del LN [14–16].

Aunque se pensó que las FRCs sólo tenían efecto sobre las células T debido a su localización, recientemente se ha demostrado de manera experimental utilizando un modelo donde eliminan a las FRCs, la importancia que éstas tienen para la sobrevivencia de los linfocitos B debido a la secreción del factor soluble, BAFF (*B cell growth factor B cell-activating factor*), descartando la idea que las FDCs fueran las únicas secretoras de dicho factor [17]. Otros estudios han reportado que en pacientes con enfermedad de injerto contra huésped se da un estado de inmunodeficiencia humoral y de no respuesta a vacunas a pesar de la posterior reconstitución exitosa de células hematopoyéticas, lo que sugiere que una población estromal estaría implicada en el estado patológico. Aunado a esto, se ha identificado un daño severo e irreversible en la estructura del LN, específicamente en FRCs y HEVs, quienes son eliminadas por células T CD8+. Uno de los mecanismos que genera la inmunodeficiencia en estos pacientes es la falta de interacción entre los linfocitos T y B facilitada por la red de FRCs en condiciones homeostáticas, dichas interacciones son cruciales para una óptima respuesta inmune humoral [18].

### **Células del Endotelio Sanguíneo**

Las células del endotelio sanguíneo (BECs) forman los vasos sanguíneos dentro de los LNs. Las HEVs son pequeñas venas post-capilares especializadas en permitir la entrada de los linfocitos desde la sangre hasta los LNs y con ello, el posible encuentro con su antígeno. En 1959, James Gowans fue el primero en demostrar que los linfocitos continuamente recirculan de la sangre a órganos linfoides y luego vuelven a la sangre, realizando este ciclo de una a dos veces al día en condiciones basales [19]. Cinco años más tarde, este mismo grupo demostró mediante la transfusión de linfocitos marcados radioactivamente que las vías de entrada de los linfocitos a los LNs es a través de vasos sanguíneos especializados, llamados HEVs [20, 21]. Se ha estudiado con mayor detalle la localización de las HEVs dentro del LN mediante microscopía intra vital, proponiéndose un árbol venular, el cual está compuesto por ramificaciones numeradas desde la uno (I) hasta la cinco (V), donde las HEVs se localizan en las ramas de la tres a la cinco (III-V) según el orden jerárquico determinado en este estudio [22].

La migración de los linfocitos tanto T como B naïve de la sangre al LN, se da por la unión de L-selectinas localizadas en la membrana de los linfocitos con las integrinas tipo mucinas en la membrana de las células endoteliales de las HEVs. Para que se dé el reconocimiento entre

ambas moléculas es indispensable que las integrinas tengan modificaciones en los residuos de carbohidratos de la molécula [23].

### **Células del Endotelio linfático**

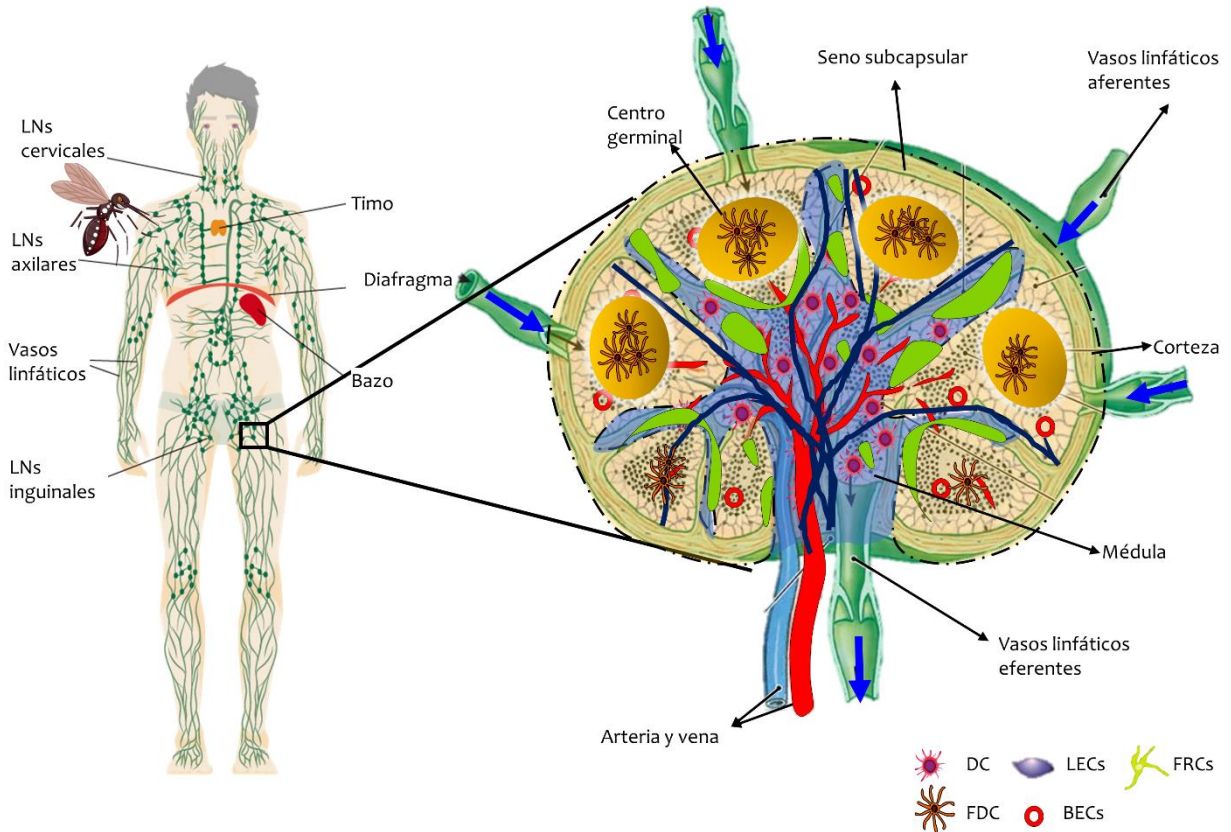
Por otro lado, los vasos linfáticos aferentes y eferentes están delineados por células endoteliales linfáticas y son otras de las vías importantes para la entrada y salida de antígenos y células provenientes de la periferia. La linfa entrante es liberada en el seno subcapsular del LN, se distribuye por el seno cortical y el seno medular, para luego dirigirse a través de los vasos linfáticos eferentes al ducto torácico y finalmente a la circulación sanguínea.

Si bien es cierto, que los vasos linfáticos comparten muchas de las características fenotípicas y morfológicas con los vasos sanguíneos, existen claras diferencias que los distinguen unos de otros. Las LECs están inmersas en el intersticio del LN y conectadas a la matriz extracelular por delgadas fibras elásticas (filamentos de anclaje) pero a diferencia de los vasos sanguíneos, no están sostenidas por una membrana basal ni por pericitos que les proporcionen soporte y con ello una morfología más definida. Otra diferencia que destacar es que las uniones intercelulares entre las células endoteliales linfáticas se encuentran dispersas y con menor densidad en comparación a las sanguíneas [24, 25].

### **Caracterización fenotípica de células estromales del ganglio linfático**

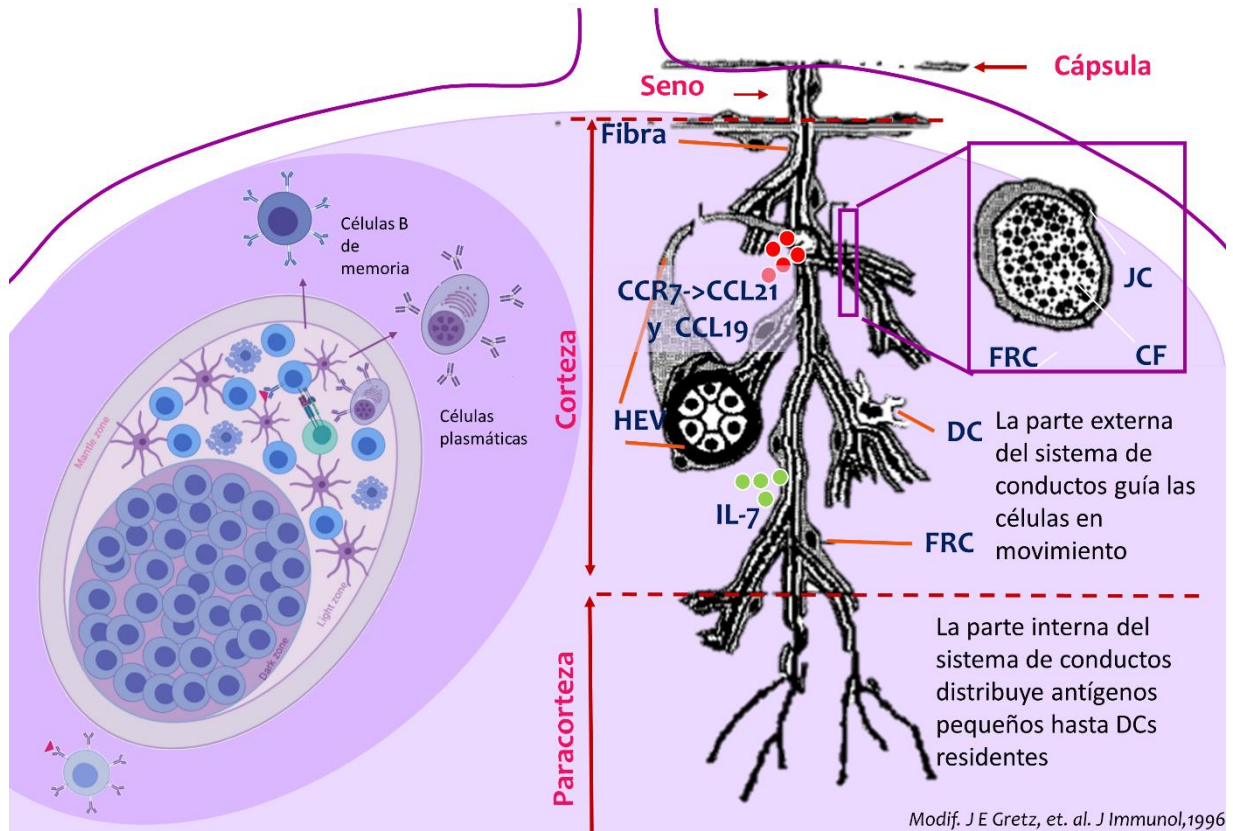
Muchos esfuerzos (especialmente recientes) se han realizado para la caracterización de las poblaciones estromales del LN. Los avances hasta el momento han permitido identificar estas células por su expresión de diferentes moléculas en la superficie o citoplasma celular. Mediante citometría de flujo se distinguen en base a su expresión o no de las siguientes moléculas: CD45, un marcador de células hematopoyéticas, CD31 (PECAM-1: *Platelet endothelial cell adhesion molecule*), y Podoplanina (PDPN, Gp38) [5–7]. Por lo tanto, las FRCs se definen como CD45<sup>-</sup> PDPN<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup>; las LECs como CD45<sup>-</sup> PDPN<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup>; las BECs como CD45<sup>-</sup> PDPN<sup>-</sup> CD31<sup>+</sup>; los pericitos como CD45<sup>-</sup> PDPN<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup>. A partir de la población de FRCs las células MadCAM<sup>+</sup> se definen como MRCs. Las FDCs comúnmente se identifican por su expresión de CD35, CD21, PDPN<sup>+/-</sup>, CD31<sup>-</sup>, FDC-M1, etc.

Convencionalmente, *in situ*, las FRCs se han identificado por expresar un antígeno citoplasmático que reconoce el anticuerpo ER-TR-7 (*Erasmus University Rotterdam-thymic reticulum-7*). Las LECs por su expresión de Lyve-1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor*) y las BECs por su expresión de CD31.



**Fig. 1. 1. Sistema linfático y microarquitectura de LNs.**

Los LNs son pequeños órganos distribuidos por todo el cuerpo y conectados entre sí por vasos linfáticos que transportan la linfa y a su vez antígenos y células desde tejidos periféricos como piel y mucosas. La micro anatomía del LN está finamente organizada en folículos de linfocitos B localizados en la corteza del LN, en la paracorteza se ubican los linfocitos T y DCs mientras que la médula está principalmente poblada por macrófagos, plasmablastos/células plasmáticas y células efectoras que serán liberadas a través del vaso linfático eferente. Las poblaciones de origen no hematopoyético que conforman el LN, incluyen FDCs importantes para la formación de los folículos y eventualmente los GCs. Las FRCs localizadas en la zona de células T, en la médula, delineando los folículos de linfocitos B y proporcionando las vías de tránsito tanto de DCs como de linfocitos mediada por la secreción de quimiocinas como CCL21 y CCL19. Los vasos linfáticos formados por las LECs delimitan el seno subcapsular y forman los senos linfáticos en la médula del LN. El árbol vascular se extiende desde la arteria, arteriolas, capilares y vénulas post capilares. Las HEVs se localizan en las ramificaciones III-V y actúan como puertas de entrada para los linfocitos que ingresan desde la sangre. Imagen izquierda modificada de uihere.com.



**Fig. 1. 2. Centro germinal y sistema de conductos de los LNs.**

El sistema de conductos es formado por fibras reticulares ricas en colágeno y envueltas por FRCs. Estos finos conductos se extienden desde el seno subcapsular donde continuamente hay un influjo de linfa que puede contener antígenos microbianos. La parte interna de los conductos transporta moléculas/antígenos pequeños menores a 70 kDa alcanzando zonas más profundas del LN como la paracorteza donde las DCs residentes capturan dichas moléculas/antígenos. La parte externa de los conductos de FRCs funciona como andamiaje para dirigir el movimiento de las células dentro del LN mediante la secreción de quimiocinas como CCL21 y CCL19 por la unión con su ligando CCR7 presente en células hematopoyéticas. Además, las FRCs secretan factores de supervivencia tanto para células B, BAFF, como para células T, IL-7. En la corteza del LN se llevan a cabo reacciones de GC las cuales se inician cuando el linfocito B reconoce su antígeno a través de su BCR lo que induce una expansión clonal mediante proliferación celular. Las células proliferantes, centroblastos, se distinguen histológicamente en la zona oscura del GC mientras que los centrocitos se ubican en la zona clara donde las clonas que han mejorado su afinidad por el antígeno son seleccionadas para su posterior diferenciación a células B de memoria o células secretoras de anticuerpos y las que no, experimentan muerte por apoptosis y son eliminadas por los TBMs.

## Virus dengue

El virus dengue (DENV) pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, es un virus envuelto, de RNA de cadena sencilla y de polaridad positiva. Tiene la capacidad de desarrollar cuadros patológicos en el humano tras su inoculación cutánea a través de mosquitos hembra, principalmente de la especie *Aedes aegypti* y con menor frecuencia de *A. albopictus*, considerados vectores de este virus. Cabe mencionar que estos mosquitos también son responsables de la diseminación de otros agentes virales como Chikungunya, Zika, virus de la fiebre amarilla, entre otros. Dado que el vector es clave en la adquisición de la enfermedad, la mayor prevalencia e incidencia de la enfermedad se da en zonas tropicales y



subtropicales del mundo, donde el mosquito encuentra las condiciones óptimas de temperatura, humedad y altura para su propagación y permanencia. Por lo tanto, se considera que alrededor de la mitad de la población mundial se encuentra en riesgo de contraer infección por dengue [26].

La infección por dengue puede desencadenar dos cuadros patológicos principales, dependiendo de la severidad del caso: fiebre por dengue (FD) y dengue grave (anteriormente conocido como fiebre hemorrágica por dengue) y llevar a complicaciones potencialmente mortales como el síndrome de shock por dengue (SSD). Las manifestaciones clínicas ante la FD duran alrededor de 4-8 días e incluyen: fiebre alta, dolor de cabeza, dolor retro-orbital y muscular. Los signos característicos comprenden, rash cutáneo, dolor abdominal, vómitos y sangrado de mucosas. La afectación que define el dengue grave son las manifestaciones hemorrágicas como el incremento en la permeabilidad vascular, que ocasiona extravasación del plasma y que lleva al SSD, desencadenando en la muerte del paciente. Dado que no hay tratamiento específico para esta enfermedad, al paciente se le proporcionan únicamente cuidados paliativos para controlar los signos y síntomas [27].

El DENV fue aislado en 1943 por Ren Kimura y Susumu Hotta y posteriormente de manera independiente por Albert B. Sabin y Walter Schlesinger. Desde entonces se han identificado cuatro serotipos, llamados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Estos serotipos tienen una homología genómica de alrededor del 65% y causan un cuadro clínico muy similar. Una vez que la persona ha adquirido la infección por un determinado serotipo y se recupera, adquiere inmunidad contra ese serotipo en particular. Sin embargo, se ha reportado que estos individuos tienen una mayor predisposición de desarrollar dengue grave ante un segundo encuentro con un serotipo diferente del virus [28, 29].

El virus tiene un diámetro aproximado de 50 nm y está constituido de tres proteínas estructurales: proteína de la cápside (C), proteína precursora de membrana (preM) y proteína de envoltura (E), así como siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 [27, 30].

Durante el ciclo de replicación viral, tanto la proteína E como la preM, están involucradas en la unión del virus a la membrana celular, el cual es el punto de partida para el inicio del ciclo [30]. Las proteínas NS5, NS3 y NS1 han sido utilizadas convencionalmente como indicativas de replicación viral activa.

## **ANTECEDENTES**

Hasta el momento, sabemos que la red de conductos de FRCs puede verse afectada ante algunas infecciones por microorganismos patógenos, principalmente por virus.

Los primeros reportes relacionando infecciones virales y la red de conductos de FRCs, se remontan al año de 1997 cuando describiendo la patología de la infección por el virus de Ébola en primates no humanos, ratones y cobayos se analizaron los LNs de dichas especies y sorprendentemente se notó que las FRCs son blanco de infección por el virus, primordialmente las FRCs que rodean las HEVs y las localizadas en el seno subcapsular de los LNs, las cuales se observaron degeneradas morfológicamente [31–35].

Más tarde en el 2000, un grupo de investigadores encontró una cercana asociación entre *Leishmania* y FRCs en LNs poplíteos de ratones C57BL/6 durante la fase crónica de infección. Estos autores proponen que las FRCs pudieran funcionar como células hospederas en la leishmaniasis persistente en un modelo *in vivo* [36].

En 2007, Rafi Ahmed y col. Describieron que una alta proporción de FRCs se infectaron con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) clona 13, el cual genera un cuadro crónico de infección, mientras que una mínima proporción se infecta con la LCMV Armstrong, que desarrolla un cuadro agudo. En el caso de la infección por clona 13, las FRCs se vieron afectadas por un mecanismo de citotoxicidad mediado por células T CD8+ y citocinas, resultando en la disfunción de la red de conductos dentro de órganos linfoides secundarios [37].

Retomando los estudios con virus hemorrágicos, en el año 2009, se reportó que las FRCs también resultaron dañadas ante infecciones por Filovirus, como el virus de Marburg y por Arenavirus, como el virus Lassa. Todos ellos, virus envueltos y de cadena sencilla de RNA (ssRNA). El virus Lassa, se encontró infectando FRCs en una variedad de tejidos linfoides como el GALT y el bazo de macacos a los 7 días post-infección (p.i.), mientras que a los 13-17 días p.i. el efecto no fue consistente, por lo que se sugiere podría tratarse de un evento transitorio. Ante la infección con el virus Lassa, las FRCs se observaron intactas morfológicamente y el daño en general fue menor comparado al mostrado con el virus de Ébola. Con respecto a los hallazgos en la infección con el virus de Marburg, el patrón de localización del virus sugiere que el virus está presente dentro de los conductos de FRCs más que infectando a las células mismas, ya que las estructuras virales no se encontraron en el citoplasma de las FRCs como en el caso del virus Ébola y Lassa [38].

También en el 2009, se encontró una co-localización del citomegalovirus murino con el marcador de FRCs, ER-TR-7, correlacionando con una morfología reticular, lo cual sugiere que las FRCs de bazo son de las primeras células a infectarse con el citomegalovirus. Además, a las 48 h p.i., se observó una desorganización en las regiones de linfocitos T y B, así como la pérdida de la positividad a ER-TR-7 en células infectadas [39].

## REFERENCIAS

- [1] Van den Broeck W, Derore A, Simoens P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J Immunol Methods* 2006; 312: 12–19.
- [2] Flajnik MF. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 438–453.
- [3] Swartz MA. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 50: 3–20.
- [4] Moon JJ, Chu HH, Pepper M, et al. Naive CD4+ T Cell Frequency Varies for Different Epitopes and Predicts Repertoire Diversity and Response Magnitude. *Immunity* 2007; 27: 203–213.
- [5] Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, et al. Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front Immunol* 2011; 2: 1–15.
- [6] Link A, Vogt TK, Favre S, et al. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 1255–1265.
- [7] Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, et al. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol* 2012; 13: 499–510.
- [8] Katakai T. Lymph Node Fibroblastic Reticular Cells Construct the Stromal Reticulum via Contact with Lymphocytes. *J Exp Med* 2004; 200: 783–795.
- [9] Malhotra D, Fletcher AL, Turley SJ. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: Partners in immunity. *Immunol Rev* 2013; 251: 160–176.
- [10] Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher L a., et al. Conduits Mediate Transport of Low-Molecular-Weight Antigen to Lymph Node Follicles. *Immunity* 2009; 30: 264–276.
- [11] Gretz JE, Norbury CC, Anderson AO, et al. Lymph-Borne Chemokines and Other Low Molecular Weight Molecules Reach High Endothelial Venules via Specialized Conduits While a Functional Barrier Limits Access to the Lymphocyte Microenvironments in Lymph Node Cortex. *J Exp Med* 2000; 192: 1425–1440.
- [12] Malhotra D, Fletcher AL, Turley SJ. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: Partners in immunity. *Immunol Rev* 2013; 251: 160–176.
- [13] Gretz JE, Kaldjian EP, Anderson AO, et al. Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. *J Immunol* 1996; 157: 495–499.

- [14] Astarita JL, Cremasco V, Fu J, et al. The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* 2015; 16: 75–84.
- [15] Acton SE, Astarita JL, Malhotra D, et al. Podoplanin-Rich Stromal Networks Induce Dendritic Cell Motility via Activation of the C-type Lectin Receptor CLEC-2. *Immunity* 2012; 37: 276–289.
- [16] Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, et al. Stromal Cell Networks Regulate Lymphocyte Entry, Migration, and Territoriality in Lymph Nodes. *Immunity* 2006; 25: 989–1001.
- [17] Cremasco V, Woodruff MC, Onder L, et al. B cell homeostasis and follicle confines are governed by fibroblastic reticular cells. *Nat Immunol* 2014; 15: 1–11.
- [18] Suenaga F, Ueha S, Abe J, et al. Loss of lymph node fibroblastic reticular cells and high endothelial cells is associated with humoral immunodeficiency in mouse graft-versus-host disease. *J Immunol* 2015; 194: 398–406.
- [19] Gowans JL. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J Physiol* 1959; 146: 54–69.
- [20] MARCHESI VT, GOWANS JL. The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 1964; 159: 283–290.
- [21] Girard J-P, Moussion C, Förster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 762–773.
- [22] von Andrian UH. Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice. *Microcirculation* 1996; 3: 287–300.
- [23] Mitoma J, Bao X, Petryanik B, et al. Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nat Immunol* 2007; 8: 409–418.
- [24] Leak L V. Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue-lymph interface. *Microvasc Res* 1970; 2: 361–91.
- [25] Gerli R, Ibba L, Fruschelli C. A fibrillar elastic apparatus around human lymph capillaries. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 181: 281–6.
- [26] WHO. Dengue and severe dengue. *WHO* 2019; 4.
- [27] Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 745–759.
- [28] Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: A prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand: I. The 1980

- outbreak. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 653–669.
- [29] Halstead SB, Udomsakdi S, Simasthien P, et al. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. *Yale J Biol Med* 1970; 42: 261–75.
- [30] Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 13–22.
- [31] Davis KJ, Anderson AO, Geisbert TW, et al. Pathology of experimental Ebola virus infection in African green monkeys: Involvement of fibroblastic reticular cells. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 805–819.
- [32] Steele KE, Anderson AO, Mohamadzadeh M. Fibroblastic reticular cells and their role in viral hemorrhagic fevers. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 423–435.
- [33] Steele KE, Anderson AO, Mohamadzadeh M. Fibroblastic reticular cells and their role in viral hemorrhagic fevers. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2009; 7: 423–435.
- [34] Gibb TR, Bray M, Geisbert TW, et al. Pathogenesis of Experimental Ebola Zaire Virus Infection in BALB/c Mice. *J Comp Pathol* 2001; 125: 233–242.
- [35] Steele K, Crise B, Kuehne A, et al. Ebola virus glycoprotein demonstrates differential cellular localization in infected cell types of nonhuman primates and guinea pigs. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 625–630.
- [36] Bogdan C, Donhauser N, Döring R, et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J Exp Med* 2000; 191: 2121–2130.
- [37] Mueller SN, Matloubian M, Clemens DM, et al. Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15430–15435.
- [38] Steel KE, Anderson AO, Mohamadzadeh M. Fibroblastic reticular cell infection by hemorrhagic fever viruses. *Immunotherapy* 2009; 1: 187–197.
- [39] Hsu KM, Pratt JR, Akers WJ, et al. Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J Gen Virol* 2009; 90: 33–43.

## JUSTIFICACIÓN

Resultados de nuestro laboratorio indican que el DENV infecta eficientemente a ratones BALB/c inmuno-competentes e induce la generación de GCs (PNA+) grandes lo que sugiere una remodelación en la microanatomía de los compartimentos de linfocitos B y T en los DLNs; lo cual, hasta el momento no ha sido estudiado. Por lo tanto, dilucidar en detalle la respuesta de linfocitos es de gran interés para entender los mecanismos celulares involucrados en la generación de las respuestas inmunes contra el DENV y eventualmente su repercusión en la inmunopatología de la enfermedad.

Así mismo, no se tiene ningún indicio del efecto que la infección por el DENV pudiera tener en células estromales de los LNs, específicamente sobre la red de conductos de FRCs, vasos sanguíneos y linfáticos. Dadas las manifestaciones hemorrágicas que se presentan en los casos de dengue severo es de gran interés abordar experimentalmente esta cuestión.

## HIPÓTESIS

La infección con el DENV provocará una reestructuración en la microarquitectura de los LNs, incluyendo cambios en los compartimentos de células B y T, así como en los componentes estromales como FDCs, FRCs, BECs y LECs.

---

## OBJETIVOS

### General

Evaluar *in vivo* e *in situ* cambios estructurales y funcionales en células hematopoyéticas (linfocitos T y B) y no hematopoyéticas (FDCs, FRCs, vasos linfáticos y sanguíneos) en ganglios linfáticos regionales (DLNs) ante la infección cutánea con DENV.

### Particulares

- 1) Identificación del DENV desde su entrada en la piel hasta su distribución en los DLNs.
- 2) Caracterización *in vivo* de la respuesta inmune de linfocitos T y B en DLNs ante la infección cutánea con DENV.
- 3) Análisis *in vivo* de la microarquitectura de las poblaciones estromales (FDCs, FRCs, LECs y BECs) de los DLNs, así como su integridad funcional después de la inmunización con DENV en piel.

---

## CAPÍTULO 2

### Identificación del virus Dengue desde su entrada en la piel hasta su distribución dentro de los ganglios linfáticos

#### Resumen

El virus dengue (DENV) infecta a los humanos a través de la piel. Los eventos tempranos durante la infección y las interacciones entre el DENV y las células inmunes y no inmunes cutáneas están recientemente bajo investigación. Hemos reportado que células dendríticas cutáneas (DCs), así como queratinocitos y fibroblastos dérmicos son permisivos para la infección por el DENV. Ahora, al inocular vía cutánea el DENV marcado fluorescentemente para “rastrearlo” en ratones inmunocompetentes, encontramos que se localiza principalmente en la dermis desde 1 hora después de la inoculación. Posteriormente, se localizó en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos drenantes (DLN) asociado con macrófagos CD169+, lo que sugiere que el virus viaja a través del flujo linfático. Sin embargo, la asociación del DENV con DCs CD11c+ en la paracorteza y en el borde de las zonas T:B sugiere que el DENV también podría ser transportado desde la piel al DLN por DCs. El DENV no se asoció con macrófagos F4/80+ ni con DCs DEC205+, pero también se encontró dentro de los folículos de linfocitos B luego de la inoculación cutánea. El DENV dentro de los folículos de células B podría afectar el desarrollo de la inmunidad humoral. De hecho, las respuestas de anticuerpos merecen un escrutinio muy cuidadoso ya que los anticuerpos neutralizantes de memoria son cruciales para contrarrestar las reinfecciones homotípicas, mientras que los no neutralizantes pueden facilitar la infección heterotípica por el DENV o incluso la infección por Zika, otro flavivirus. Desentrañar el viaje del DENV desde la piel, la linfa, hasta los compartimentos celulares dentro de los ganglios regionales, ayudará a comprender la enfermedad, su patología y tal vez cómo contrarrestarla.

**Palabras clave:** virus Dengue, piel, ganglios linfáticos, tejidos inmunes, Macrófagos, células dendríticas, folículos de células B.



## Introducción

El virus dengue (DENV) es un importante patógeno viral que afecta cada año a casi cuatrocientos millones de personas en todo el mundo [1]. En los últimos 50 años, la incidencia del dengue se ha incrementado hasta 30 veces principalmente en áreas tropicales y subtropicales causando graves problemas de salud pública [2]. El DENV desencadena una diversidad de manifestaciones clínicas, desde una infección asintomática en la mayoría de los casos, hasta una enfermedad febril leve o hasta una enfermedad hemorrágica potencialmente mortal como el dengue grave (SD) o el síndrome de choque por dengue (DSS) [3].

El DENV se transmite a los humanos cuando un mosquito hembra del género *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus* previamente infectado pica a una persona sana con el fin de alimentarse con ~ 4.2  $\mu$ l de sangre al succionar alrededor de 141s en la piel [4, 5]. Cuando el mosquito inserta la mitad (~ 0.9 mm) de la longitud total de la probóscide, se depositan alrededor de 50,000 unidades formadoras de placa de DENV en la dermis, donde se encuentra con una variedad de células inmunes y no inmunes residentes, incluidas las células dendríticas dérmicas (DCs), macrófagos (Mfs), linfocitos T, mastocitos, queratinocitos, fibroblastos, etc., así como vasos linfáticos y sanguíneos a través de los cuales las células migratorias viajan a los ganglios linfáticos (LNs) y llegan a la piel, respectivamente [6–9].

Si bien las respuestas regionales (cutáneas) a la entrada de DENV han sido objeto de intenso escrutinio [10–14], poco se sabe acerca de cómo exactamente el DENV alcanza los tejidos linfoides secundarios por medio de los vasos linfáticos (si es que lo hace) y a qué células podría estar asociado en cada uno de los compartimentos. Al infectar ratones inmunocompetentes a través de la piel, recientemente demostramos no solo una fuerte reacción del centro germinal (GC) en los ganglios linfáticos drenantes (DLNs), sino también la presencia de proteínas virales dentro de estos órganos [13]. Otros también han reportado proteínas virales (NS1, NS3, PrM y E) dentro de LNs tanto en humanos como en ratones, lo que sugiere que interacciones de antígenos (Ags) virales con células inmunes están ocurriendo en los LNs [13, 15, 16]. Hay poca información de los primeros eventos que ocurren en la piel durante/después de la entrada del DENV. Algunos autores han reportado que la saliva del mosquito induce un entorno inmunomodulador [17, 18]; por ejemplo, la regulación negativa de moléculas antivirales como el interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), IFN- $\gamma$ , algunos receptores de reconocimiento de patrones o incluso viremia sostenida, entre otros fenómenos, sugiriendo que dichos eventos coadyuvan al establecimiento de la infección [19, 20]. También se ha demostrado una infección productiva de fibroblastos, queratinocitos, DCs y células de Langerhans en la piel, pero no está claro como estas células podrían participar en la patología global de la enfermedad [10-12, 14, 21].

Las interacciones apropiadas entre Ags y células del sistema inmune son esenciales para desencadenar una respuesta inmune adaptativa eficiente en tejidos linfoides secundarios tales como los LNs. Para la mayoría de los Ag -incluidos los patógenos- no se sabe exactamente cómo alcanzan los LNs y luego los subcompartimentos dentro de estos, por ejemplo, los folículos de células B. La evidencia experimental sugiere que ciertos Ags libres podrían alcanzar los LNs directamente por el flujo linfático y luego distribuirse por el seno subcapsular (SCS) y medular o por medio de los conductos [22-25]. Estos Ags también podrían ser transportados a los LNs por las células centinelas provenientes de tejidos periféricos como la piel o las mucosas. Importantemente, estas diversas rutas de transporte de Ag dependen en gran medida del tamaño de los Ags [22].

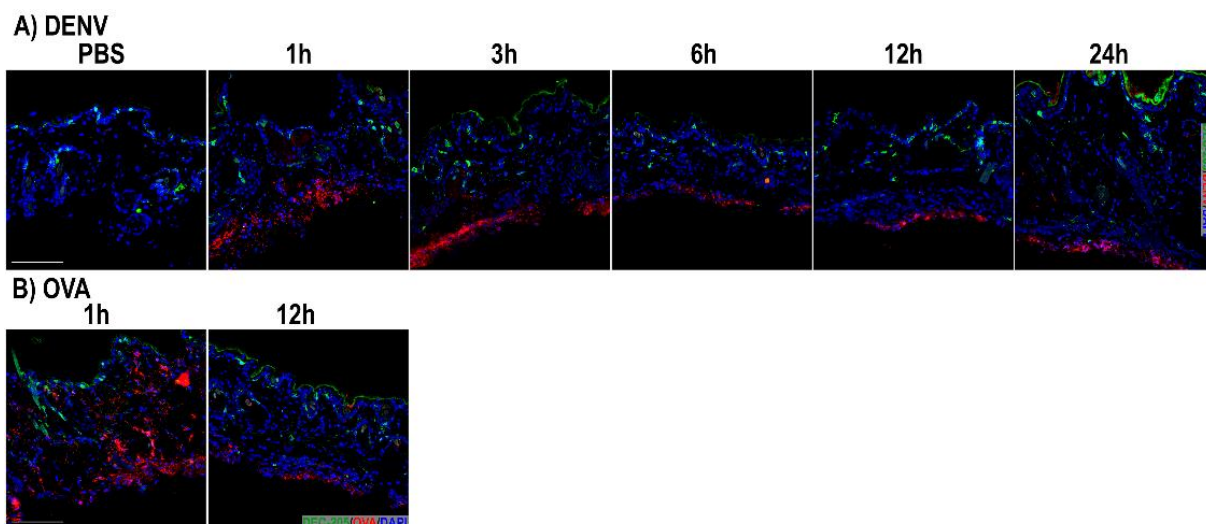
Sin embargo, no hay información hasta el momento sobre cómo el DENV podría alcanzar los DLN después de la infección cutánea, dónde exactamente podría localizarse el DENV dentro de los DLN (si lo hace), y si el primer contacto entre el DENV y las células inmunes podría influir en las respuestas inmunitarias posteriores, por ejemplo, la generación de anticuerpos neutralizantes o facilitadores.

En este trabajo, nos propusimos evaluar la ruta natural *in vivo* del DENV, desde su entrada a través de la piel hasta su llegada y distribución dentro de los DLNs (regionales); así como, su potencial asociación o no con algunas células presentadoras de antígeno (APC).

## Resultados

**El DENV se encuentra en la dermis profunda en tiempos tempranos post-inoculación y, por lo tanto, no está asociado con DCs epidérmicas DEC-205+**

Para evaluar la distribución del DENV en la piel tras la inoculación cutánea (intradérmica), utilizamos ratones inmunocompetentes y DENV marcado fluorescentemente. Evaluamos criosecciones de piel a la 1, 3, 6, 12 y 24 h después de la inoculación intradérmica de DENV y como control, evaluamos la distribución de OVA marcada fluorescentemente después de 1 h y 12 hpi. El DENV se encontró claramente en la base de la dermis en todos los tiempos evaluados y su presencia disminuyó con el tiempo. No se observaron asociaciones del DENV con DCs epidérmicas DEC-205+, probablemente porque DENV se encontró mucho más profundo que las células DEC-205+ que se encuentran localizadas más bien superficiales en la epidermis. A las 24 hpi, la piel se observó más gruesa que en los primeros tiempos analizados, lo que sugiere un reclutamiento de células al sitio de inoculación (Fig. 2.1A). No se detectó señal fluorescente roja en la piel de ratones inoculados sólo con PBS (Fig. 2.1A), mientras que la OVA marcada fluorescentemente se detectó claramente en la dermis a 1 h pero muy escasamente a las 12 hpi (Fig. 2.1B).

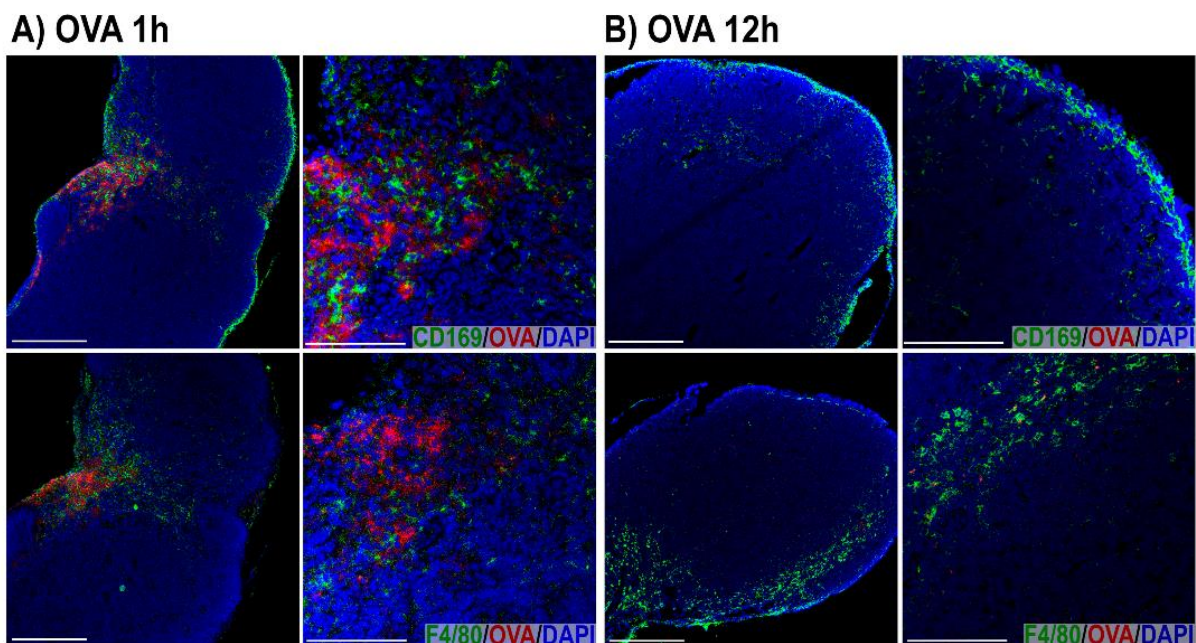


**Fig. 2. 1. La inoculación del DENV marcado fluorescentemente permite su identificación en la piel de ratones inmunocompetentes.**

Los ratones fueron cutáneamente inoculados con DENV marcado fluorescentemente (PKH-26, rojo) en la región inguinal y criosecciones de piel se analizaron después de 1, 3, 6, 12 y 24 hpi mediante microscopía confocal. Como controles, los ratones recibieron PBS u OVA marcada fluorescentemente (rojo). Las DCs DEC-205+ (verde) se localizan principalmente en la capa epidérmica en todas las condiciones experimentales. B) La OVA (rojo) se encontró en la dermis después de 1 hpi, pero se observó mucho menos a las 12 hpi, mientras que A) el DENV (rojo) se ubicó en la dermis profunda a partir de 1 hpi disminuyendo con el tiempo. En la piel de ratones inoculados con PBS no se detectó fluorescencia roja (imagen a la izquierda en A)). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). El estrato córneo exhibe cierta autofluorescencia a las 6 h y 24 hpi en A) y 12 hpi en B). Barra de escala, 300  $\mu$ m. Las imágenes son representativas de seis secciones de piel por grupo experimental.

### **La ovoalbúmina se encuentra en el seno medular de los LNs después de 1 h pero no a las 12 h post inoculación cutánea.**

La ovoalbúmina se ha utilizado como Ag modelo en algunos enfoques experimentales para describir la distribución de moléculas dentro del LN. Debido a su pequeño tamaño molecular, la OVA alcanza los LN rápidamente vía linfática. Utilizamos OVA fluorescente como molécula control y evaluamos su distribución después de 1 h y 12 hpi. A 1 hpi, la OVA se encontró en el seno medular asociado principalmente con Mfs CD169+ y mucho menos con Mfs F4/80+ (Fig. 2.2A). A las 12 hpi, sólo se detectó una escasa fluorescencia roja en las células F4/80+ (Fig. 2.2B).

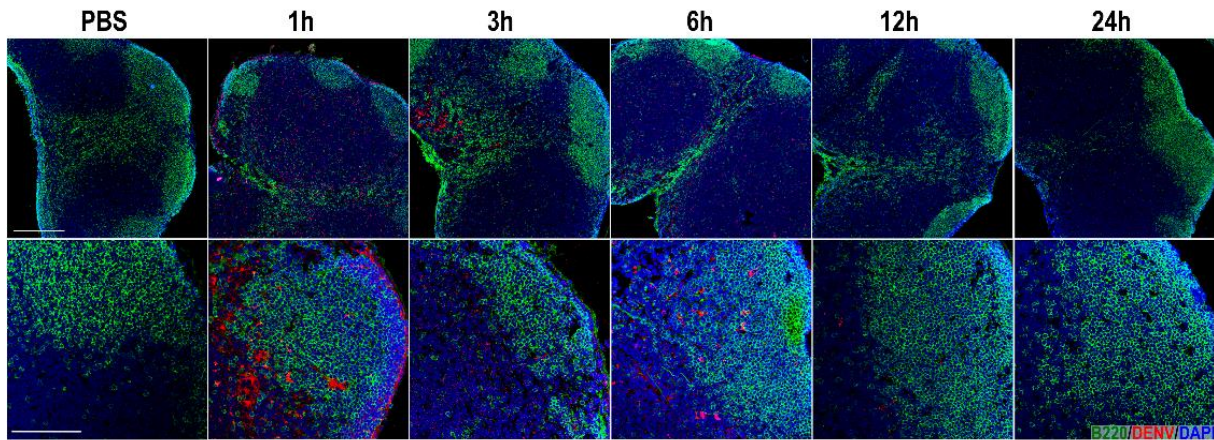


**Fig. 2. 2.** La inoculación del DENV marcado fluorescentemente permite su identificación en la piel de ratones inmunocompetentes.

Los DLNs de ratones inoculados cutáneamente con OVA marcada fluorescentemente (Alexa Fluor-555) se obtuvieron después de **A)** 1 hpi y **B)** 12 hpi. Mfs CD169+ (panel superior) y F4/80+ (panel inferior) se muestran en color verde mientras que los núcleos se observan en azul teñidos con DAPI. La OVA (rojo) se encontró claramente en el seno medular de los DLNs después de 1 hpi, pero no a las 12 hpi. La OVA parece estar contenida en Mfs del SCS pero no en Mfs F4/80+. Barra de escala, 300  $\mu$ m (imágenes de la izquierda) y 100  $\mu$ m (imágenes de la derecha). Las imágenes son representativas de seis DLNs por grupo experimental.

### El DENV alcanza los folículos de células B en el ganglio linfático desde 1 h después de la inoculación cutánea

Para determinar si el DENV se distribuye en los folículos de células B a tiempos tempranos después de la inoculación cutánea, obtuvimos DLNs de ratones después de 1, 3, 6, 12 y 24 hpi. Criosecciones de DLNs se marcaron con anticuerpo B220 para identificar los linfocitos B. El DENV marcado fluorescentemente en rojo se identificó claramente en la paracorteza, el SCS, el seno medular y en algunos folículos de células B (imágenes superiores en Fig. 2.3) a tiempos tempranos post inoculación. Para un examen más detallado de los folículos de células B, utilizamos un objetivo de mayor aumento (imágenes inferiores en Fig.2.3) observando que después de 1 hpi, pequeños cúmulos de DENV están presentes dentro de los folículos en aparente cercana asociación con células B. A las 3 hpi, se detectaron muy pocas asociaciones en los folículos, probablemente porque la mayoría del DENV fluorescente se observa en la zona medular. En contraste, a las 6 hpi aún encontramos células con morfología similar a macrófagos conteniendo el DENV aparentemente en el citoplasma y localizadas dentro de los folículos de células B. A las 12 h y 24 hpi no detectamos señal fluorescente del DENV *in situ* (Fig.2.3).



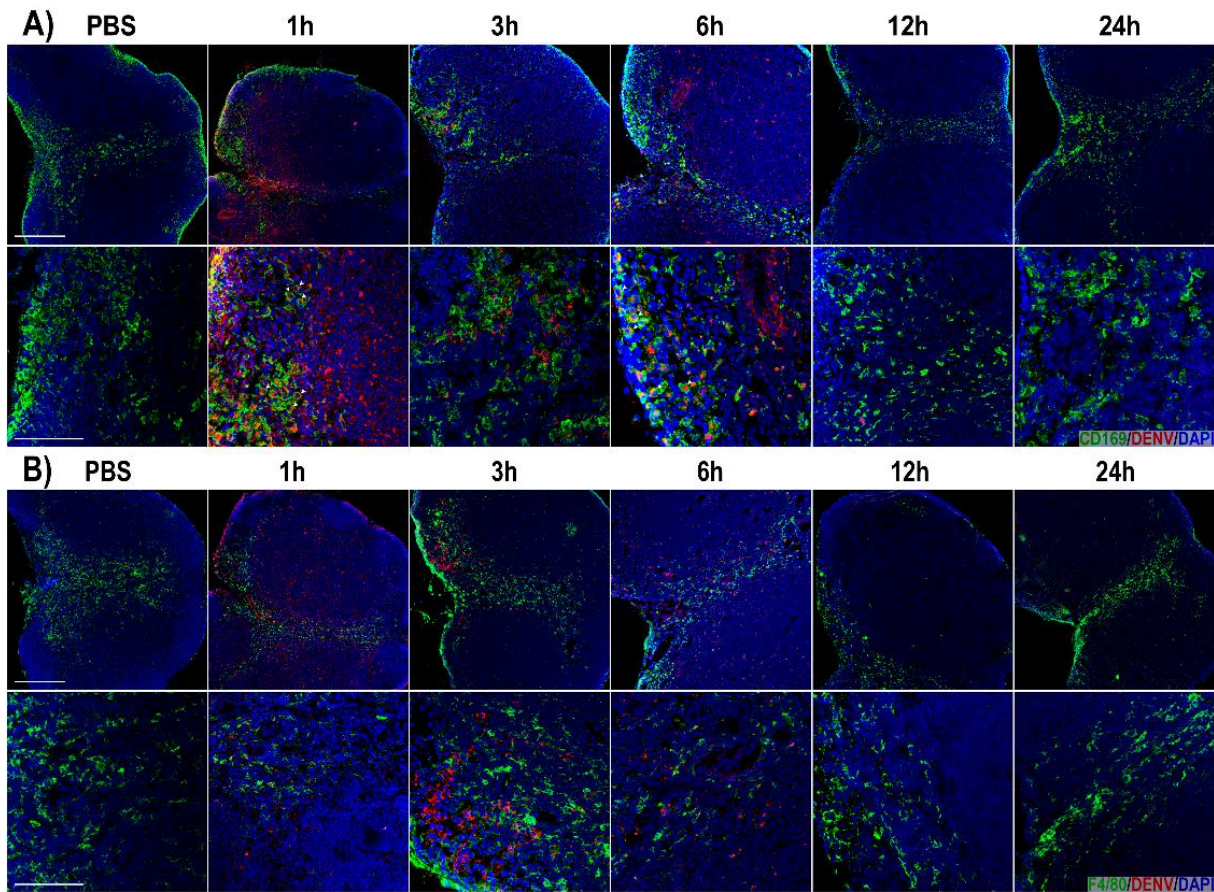
**Fig. 2. 3. DENV y células B en criosecciones de DLNs de ratones inoculados cutáneamente con DENV marcado fluorescentemente.**

Criosecciones de DLNs obtenidos después de 1, 3, 6, 12 y 24 h después de que los ratones fueron inoculados en la piel con DENV marcado fluorescentemente (PKH-26, rojo) se tiñeron con el anticuerpo B220 para detectar células B (verde). Mediante microscopia confocal encontramos al DENV (rojo) desde 1 h hasta 6 hpi en los folículos de células B (verde), a 1 hpi el DENV se encontró principalmente en áreas perifoliculares. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Como control, se analizaron secciones de DLNs de ratones inoculados con PBS y no se detectó fluorescencia roja (imágenes de la izquierda). Barra de escala = 300  $\mu\text{m}$  (imágenes superiores) y 100  $\mu\text{m}$  (imágenes inferiores).

### **El DENV se asocia diferencialmente con macrófagos CD169+ pero no con los F4/80+ dentro de los LNs**

Los Mfs son cruciales para la eliminación de agentes patógenos y se han clasificado según algunos marcadores y a su localización dentro de los LNs. Los Mfs ubicados en el seno medular, donde actividades altamente fagocíticas se llevan a cabo, se denominan Mfs medulares, mientras que los que delimitan el piso de SCS se llaman Mfs del SCS. Los Mfs medulares son CD169 + o F4/80+, mientras que los Mfs del SCS son CD169- [26]. Después de 1, 3, 6, 12 y 24 hpi cutánea de DENV evaluamos *in situ* en DLNs la posible implicación de los Mfs CD169+ o F4/80+ en la captura de DENV. Curiosamente, desde 1 hpi se observaron muchas células CD169+ conteniendo al DENV aparentemente en el citoplasma, principalmente en el seno medular y también en el SCS. El DENV también se encontró en áreas paracorticales en asociación con células CD169- (Fig.2.4A). Por el contrario, muy pocos Mfs F4/80+ se encontraron asociados con el DENV después de 1 hpi (Fig. 2.4B). Después de 3 hpi, la localización del DENV se encontró restringida principalmente al seno medular y a Mfs CD169+ (Fig. 2.4A). En este tiempo evaluado, el DENV estaba poco asociado con Mfs F4/80+. Interesantemente a mayor aumento a 3 hpi, observamos muchas células F4/80-, muy probablemente Mfs CD169+, conteniendo grandes cantidades de DENV (Fig. 2.4B). Después de 6 hpi, todavía detectamos la señal DENV asociada principalmente con Mfs CD169+ (Fig. 2.4A). En los últimos tiempos evaluados (12 y 24 hpi) no se detectó señal fluorescente roja.





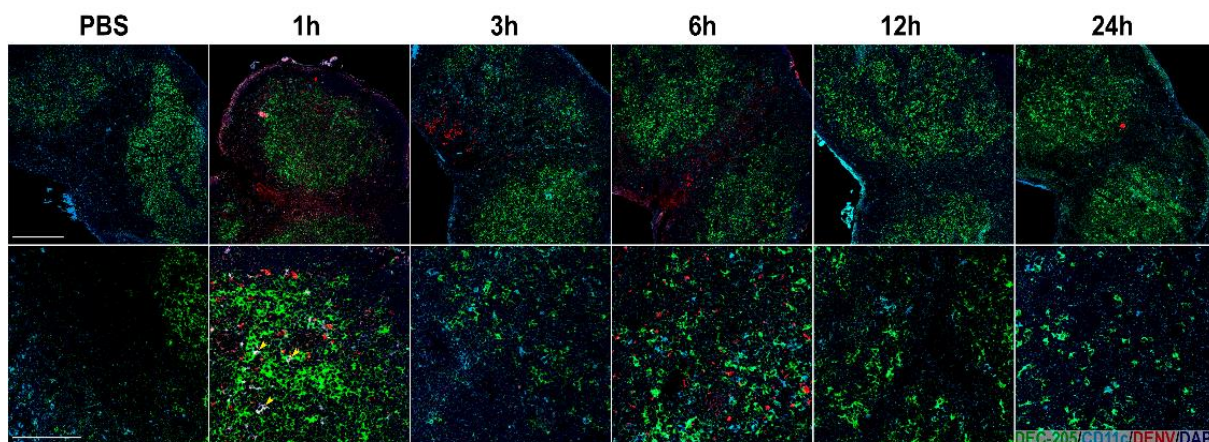
**Fig. 2. 4. DENV y macrófagos CD169+ o F4/80+ en LNs regionales.**

Los DLNs de ratones inoculados en la piel con PBS o DENV marcado fluorescentemente (PKH-26, rojo) se obtuvieron después de 1, 3, 6, 12 y 24 hpi. Criosecciones de DLNs se marcaron con anticuerpos monoclonales para identificar A) Mfs CD169+ o B) Mfs F4/80+ en verde. Los núcleos se tiñeron con DAPI como se observa en azul. Las preparaciones de tejido en las diferentes condiciones fueron evaluadas por microscopía confocal. **A)** El DENV se distribuyó en el SCS después de 1 hpi (borde amarillo) y principalmente en los senos medulares aparentemente en el citoplasma de Mfs CD169+ desde 1 h hasta las 6 hpi (puntas de flecha blancas, imágenes inferiores). **B)** Se encontraron muy pocas asociaciones del DENV marcado fluorescentemente en rojo con Mfs F4/80+ en las zonas medulares. No se detectó fluorescencia roja en ratones inoculados con PBS (imágenes de la izquierda). Barra de escala = 300  $\mu$ m [imágenes superiores en A) y B)] y 100  $\mu$ m [imágenes inferiores en A) y B)]. Las imágenes son representativas de seis LNs por grupo experimental.

### **Las DCs CD11c+ en los ganglios linfáticos regionales son DENV+ desde tiempos tempranos posteriores a la inoculación cutánea**

Las DCs migran desde los tejidos periféricos, como la piel y las mucosas, a los órganos linfoides secundarios, como los LNs. Debido a que el DENV ingresa a través de la piel, es muy probable que las DCs de la piel participen en el transporte del DENV de la piel hasta los DLNs. Por lo tanto, marcamos criosecciones de DLNs obtenidas después de 1, 3, 6, 12 y 24 h posteriores a la inoculación cutánea de DENV (fluorescentemente marcado), con los anticuerpos CD11c y DEC-205. Después de 1 hpi encontramos al DENV en estrecha asociación con las células CD11c+ pero no con las células DEC-205+ en la paracorteza de los

DLNs. A las 3 hpi, no encontramos al DENV en la paracorteza, ni asociado con células CD11c+ ni con células DEC-205+. Sin embargo, el DENV fluorescente rojo se localizó restringido a las áreas medulares. A las 6 hpi, el DENV se encontró asociado con algunas células CD11c+, pero no con las células DEC-205+. Como se mencionó anteriormente, el DENV ya no se detectó en LNs regionales a las 12 h ni a las 24 hpi (Fig. 2.5).



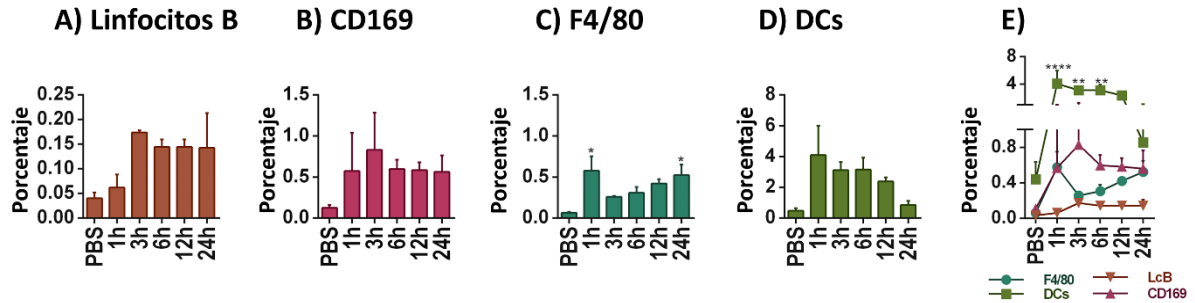
**Fig. 2. 5. DENV y DCs en ganglios linfáticos regionales.**

Los ratones inmunocompetentes se inocularon por vía intradérmica con DENV marcado fluorescentemente (rojo) y los DLNs se obtuvieron a 1, 3, 6, 12 y 24 hpi. Las DCs CD11c + se observan en azul claro, las DCs DEC-205+ en verde, mientras que los núcleos se observan en azul oscuro. El DENV se detectó desde 1 h hasta 6 hpi. Después de 1 hpi, el DENV (rojo) se localizó en la zona paracortical y se asoció claramente con DCs CD11c+ de color azul claro, las interacciones se observan en color blanco debido al traslape de los colores (imagen inferior, puntas de flecha amarillas indican DCs de color blanco). El DENV (rojo) no se asoció con DCs DEC-205+ (verdes). Las criosecciones de ratones inoculados con PBS no mostraron fluorescencia roja (imágenes de la izquierda). Barra de escala = 300  $\mu$ m (imágenes superiores) y 100  $\mu$ m (imágenes inferiores). Las imágenes son representativas de seis LNs por grupo experimental.

### **Análisis mediante citometría de flujo de células presentadoras de Ag y DENV en DLNs después de la inoculación cutánea**

Para una evaluación más cuantitativa de las APC asociadas al DENV, utilizamos suspensiones celulares de DLNs de ratones inoculados en la piel con DENV marcado fluorescentemente. Una proporción muy baja (0.06% a 0.17%) de células B fue positiva para DENV en todos los tiempos post inoculación evaluados (1 h-24 hpi). Esto podría deberse en parte al escaso número de células B específicas para el Ag, el DENV en este caso (Fig.2.6A). Los Mfs CD169+ también fueron positivos para el DENV, con un pico aparente (0,83%) a las 3 hpi; que se correlaciona bien con la localización medular observada *in situ* (Fig. 2.6B). Con respecto a los Mfs F4/80+, la proporción de células positivas varió de 0.3% a 0.57% a lo largo de la cinética completa, alcanzando el porcentaje mayor a 1 hpi (Fig. 2.6C). Las DCs se identificaron como células Gr-1-, MHC-II+ y CD11c+ y fueron la población DENV+ más abundante. La proporción media más alta (4%) de DCs DENV+ se observó a 1 hpi y fue disminuyendo con el tiempo (0,85%) hasta las 24 hpi (Fig.2.6D). Integramos todos los valores

en una gráfica (Fig. 2.6E) para comparar los porcentajes de todas las APC DENV+ evaluadas. Observamos que las DCs son las principales células DENV+, especialmente en los tiempos tempranos posteriores a la inoculación, lo que sugiere que estas células transportan DENV de la piel a los ganglios y/o son las principales células que capturan el DENV una vez que éste llega a los ganglios.



**Fig. 2. 6. Evaluación mediante citometría de flujo de células DENV+ en LNs regionales.**

Suspensiones celulares de DLNs obtenidos a 1, 3, 6, 12 y 24 h después de la inoculación del DENV fluorescentemente marcado (PKH-26, rojo) se incubaron con anticuerpos monoclonales para identificar células B (B220), Mfs (CD169 y F4/80) y DCs (CD11c). El porcentaje de cada población conteniendo al DENV se determinó cuando las células fueron dobles positivas. **A)** Se observó una proporción muy baja de células B DENV+ desde 1 h hasta 24 hpi. **B)** La cantidad de Mfs CD169+ DENV+ fue mayor que **C)** los Mfs F4/80+ DENV+ desde 1 h hasta 24 hpi. **D)** La proporción de DCs CD11c+ DENV+ fue más la más alta que la de todas las otras poblaciones analizadas, alcanzando el pico máximo a 1 hpi y disminuyendo con el tiempo. La gráfica en **E)** muestra los resultados integrados de todas las poblaciones de APCs analizadas durante la cinética post inoculación de DENV. Las barras en las gráficas representan la mediana  $\pm$  SEM de los porcentajes y se realizó un análisis de ANOVA, considerando \*  $p > 0.05$ , \*\*  $p > 0.01$ , \*\*\*\*  $p > 0.0001$ .

## Discusión

Si bien una variedad de células residentes de la piel puede entrar en contacto con el DENV luego de la picadura del mosquito (tema recientemente bajo intensa investigación), muy pocas células tienen la capacidad de capturar al DENV y transportarlo a través de los vasos linfáticos hasta los tejidos linfoides secundarios. Las DCs cutáneas pueden endocitar al DENV y migrar al área de DCs en los DLNs en donde los linfocitos T continuamente se encuentran recirculando y, por lo tanto, las probabilidades de que los LcT Ag-específicos hagan contacto con las DCs DENV+ incrementan notablemente [27]. Algunas células B también podrían interactuar con Ags del DENV en esta zona y desencadenar respuestas extrafoliculares o entrar en una reacción de GC [28, 29]. Otros probables eventos ocurriendo en los LNs son la captura y presentación de Ags de DENV por Mfs, ya sea en el SCS o en la zona paracortical y medular [30]. Por ende, los LNs son órganos cruciales para establecer respuestas inmunes adaptativas efectivas siendo fundamental las interacciones eficientes entre las células inmunes y los Ags. La llegada y distribución de los Ags dentro de los compartimentos de los LNs, ya sea de forma libre a través del flujo linfático o siendo



acarreados por DCs podría ser determinante para el tipo de respuesta inmune que se desencadenará. A continuación, discutimos algunas de estas posibilidades con respecto a la infección con el DENV en un contexto *in vivo*.

El DENV ingresa al huésped humano a través de la piel mientras los mosquitos se alimentan de sangre. Una vez que los mosquitos infectados localizan un huésped potencial, estos introducen su probóscide varias veces a través de la dermis y es durante este proceso que las glándulas salivales liberan el virus [31]. Es probable que las partículas virales interactúen en primera instancia con las diversas células de las capas epidérmica y dérmica. Sin embargo, tanto los primeros eventos durante la infección por el DENV así como las interacciones locales iniciales entre el DENV y los elementos del sistema inmune de la piel permanecen en gran parte inexplorados.

Al infectar *ex vivo* explantes de piel humana sana de muestras no cadavéricas, nuestro grupo demostró DCs cutáneas infectadas con el DENV [11]. También hemos identificado que los queratinocitos humanos y los fibroblastos dérmicos son permisivos para la infección por DENV y que responden secretando una amplia variedad de mediadores solubles que contribuyen a inducir un microambiente activado inmunológicamente y un estado antiviral [10, 11, 32]. Ahora, tras la inoculación cutánea del DENV marcado fluorescentemente y utilizando ratones inmunocompetentes, evaluamos la presencia del DENV y su localización tanto en la piel como en los DLNs mediante inmunofluorescencia *in situ*, así como en suspensiones celulares por FACS. En la piel, encontramos el virus localizado principalmente a través de la dermis después de 1 hora post-inoculación, luego el DENV se distribuyó profundamente en la piel. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se utiliza el DENV marcado con fluorescencia para evaluar su distribución *in vivo*.

Algunos reportes en humanos y en ratones han mostrado proteínas del DENV dentro de los LNs, tanto en la periferia como dentro de los folículos de células B [13, 16, 33-35]. La ubicación del virus dentro de los DLNs podría influir en los contactos tempranos con células del sistema inmune y consecuentemente en la respuesta inmune posterior. Sin embargo, hasta el momento no se ha explorado *in vivo* cómo el DENV alcanza los DLNs después de la infección cutánea. En el caso del virus de la estomatitis vesicular, se ha reportado cómo las partículas virales que ingresan a través de los tejidos periféricos se distribuyen dentro de los DLNs, identificando una población de Mfs en la base del SCS y en la médula de los LNs que capturan partículas virales minutos después de la inoculación subcutánea [30]. Del mismo modo que otros Ags que ingresan a través de la piel, el virus Bluetongue se transporta rápida y libremente por medio de la linfa hasta los DLNs en su huésped natural, la oveja [36].

Después de 1 h de la inoculación en la piel encontramos al DENV asociado con Mfs del seno subcapsular y medular, CD169+ y con DCs CD11c+ en el área paracortical de los DLNs. La asociación con estos dos tipos celulares se observó especialmente en los tiempos más tempranos (desde 1 h hasta 6 h) después de la inoculación cutánea. La rápida localización del DENV en el SCS de los DLNs es consistente con la posible llegada del virus en su forma libre a través de la linfa, además de que las DCs también podrían estar acarreado el virus [36]. En el modelo murino inmunodeficiente (ratones AG129 deficientes tanto en el receptor de interferones  $\alpha/\beta$  (IFN- $\alpha/\beta$ R<sup>-/-</sup>) como en el receptor  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>), se ha demostrado que los Mfs del SCS son importantes para controlar la propagación del DENV. Estos Mfs del SCS contenían la proteína NS1, lo que probablemente implica que están atrapando Ags del DENV o que están infectados *per se* [37]. En estos mismos ratones inmunodeficientes, después de la inoculación en el cojinete plantar se demostró que el DENV inicialmente se asocia a Mfs de los DLNs [38]. Como SIGN-R1, el homólogo murino de DC-SIGN humano, está altamente expresado en Mfs del SCS [39], es probable que el DENV esté infectando a estos Mfs en los LNs dado que DC-SIGN es una de las moléculas utilizadas por el DENV para ingresar a las células huésped [40].

Después de que los Mfs del SCS atrapan al DENV, estas células podrían translocar partículas virales unidas a la superficie a través de la base del SCS y hacer que los Ags del DENV estén disponibles para otras células, por ejemplo, células B migratorias en los folículos subyacentes. Aparentemente estos Mfs del SCS actúan como vigilantes contra muchos otros patógenos y son capaces de discriminar entre virus transportados por linfa y otras partículas de tamaño similar [30]. Los Mfs CD169+ en LNs son capaces de capturar virus acarreados por la linfa evitando su diseminación sistémica y podría guiar a los viriones capturados a través de la base del SCS para la eficiente activación de células B foliculares [30, 37].

El DENV asociado con DCs muy probablemente implica que el DENV está siendo transportado desde la piel a los DLNs por DCs. Nosotros y otros investigadores hemos encontrado DCs cutáneas infectadas con DENV en explantes de piel sana cadavérica y no cadavérica humana infectada *ex vivo* [11, 14, 21]. Por lo tanto, el DENV podría estar alcanzando DLNs también a través de DCs cutáneas. Recientemente, por citometría de flujo y usando ratones inmunodeficientes (ratones con IFN- $\alpha/\beta$  knockout [IFNAR]), se demostró que las DCs migratorias se infectan con el DENV en los DLNs tras la inoculación cutánea. Esto sugiere fuertemente que las DCs dérmicas pueden llevar al DENV a los ganglios regionales y muy probablemente iniciar la respuesta inmune adaptativa antiviral [14].

Las DCs son células centinelas especializadas que captan Ags en tejidos periféricos y viajan hasta la zona paracortical de los DLNs en donde células B que se encuentran migrando hacia los folículos pueden encontrarse con estos Ags [23, 27, 41]. Una característica distintiva de la

activación de linfocitos B específicos es la captura/adquisición de Ags (de manera específica) mediada por el BCR. Esto facilitará la posterior presentación de Ag de las células B a las células T para desarrollar respuestas de anticuerpos eficientes, respuestas dependientes de células T [42]. Las DCs pueden proveer a células B un acceso más amplio a los Ags, particularmente a los de gran tamaño o asociados con materiales particulados. Por último, a través de la presentación de Ag a las células T, las DCs podrían mantener funciones como plataformas celulares que facilitan la activación, la colocalización y la comunicación mutua de las células T y B específicas de Ag, cuya interacción puede conducir a respuestas óptimas de células T y B [41].

El seguimiento *in vivo* del DENV marcado con fluorescencia desde su entrada en la piel nos permitió conocer su localización en DLNs tan rápido como a 1 hpi en Mfs del seno subcapsular y medular, su asociación con DCs CD11c+ en el borde T: B y la presencia del DENV dentro de folículos de células B. Todos estos eventos hacen altamente plausible que células B específicas reconozcan el DENV y posibilita que reciban ayuda de las células T, estas interacciones celulares son necesarias para conducir respuestas de anticuerpos. A este respecto, vale la pena mencionar que las respuestas de anticuerpos anti-DENV necesitan un análisis muy cuidadoso, idealmente, estas respuestas deberían ser neutralizantes [43, 44]. Sin embargo, el posible impacto perjudicial de los anticuerpos no neutralizantes que facilitan la infección *in vivo* apenas comienza a dilucidarse, no sólo en las reinfecciones heterotípicas con DENV sino también en infecciones con otros flavivirus como el Zika [44-48].

En conjunto, estos datos sugieren que el DENV después de ser inoculado en la piel, llega a los ganglios linfáticos regionales al menos de dos formas, a través del flujo linfático, pero también transportado por células dendríticas. Conocer el tránsito del DENV desde la piel a los LN regionales nos permitirá una mejor comprensión de cómo se está alertando al sistema inmunitario y cuáles podrían ser las células que responden en cada etapa. Creemos que es de suma importancia entender la biología *in vivo* de estas respuestas celulares ante la entrada del DENV, no sólo para diseñar mejores modelos para estudiar las interacciones tempranas entre el DENV, las células residentes en la piel y las células de los LNs, sino también para comprender mejor la patología de DENV.

## Referencias

- [1] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496: 504–507.
- [2] WHO. Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020. 2012.
- [3] Sreaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, et al. New insights into the immunopathology

- and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 745–759.
- [4] Neville Clements A. *The Physiology of Mosquitoes*. Pergamon Press 1963.
- [5] Daniel TL, Kingsolver JG. Feeding strategy and the mechanics of blood sucking in insects. *J Theor Biol* 1983; 105: 661–677.
- [6] Ramasubramanian MK, Barham OM, Swaminathan V. Mechanics of a mosquito bite with applications to microneedle design. *Bioinspir Biomim* 2008; 3: 46001.
- [7] Styer LM, Kent KA, Albright RG, et al. Mosquitoes Inoculate High Doses of West Nile Virus as They Probe and Feed on Live Hosts. *PLoS Pathog* 2007; 3: e132.
- [8] Fehres CM, Garcia-Vallejo JJ, Unger WWJ, et al. Skin-Resident Antigen-Presenting Cells: Instruction Manual for Vaccine Development. *Front Immunol* 2013; 4: 157.
- [9] Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 289–301.
- [10] Bustos-Arriaga J, García-Machorro J, León-Juárez M, et al. Activation of the Innate Immune Response against DENV in Normal Non-Transformed Human Fibroblasts. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1420.
- [11] Limon-Flores AY, Perez-Tapia M, Estrada-Garcia I, et al. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. *Int J Exp Pathol* 2005; 86: 323–334.
- [12] David MS, Dimelza SP, Porfirio ND, et al. Innate Immune Responses In Ex Vivo Skin Explants Infected With Dengue Virus. *Front Immunol* 2015; 6: Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015-11th Congress of the Latin American Association of Immunology - 10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología.
- [13] Yam-Puc JC, García-Cordero J, Calderón-Amador J, et al. Germinal Center Reaction Following Cutaneous Dengue Virus Infection in Immune-Competent Mice. *Front Immunol* 2015; 6: 1–9.
- [14] Cerny D, Haniffa M, Shin A, et al. Selective Susceptibility of Human Skin Antigen Presenting Cells to Productive Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004548.
- [15] Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 416–424.

- 
- [16] Bhoopat L, Bhamarapravati N, Attasiri C, et al. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. *Asian Pacific J allergy Immunol* 1996; 14: 107–13.
- [17] Mores CN, Christofferson RC, Davidson SA. The Role of the Mosquito in a Dengue Human Infection Model. *J Infect Dis* 2014; 209: S71–S78.
- [18] Schneider BS, Higgs S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 400–408.
- [19] Cox J, Mota J, Sukupolvi-Petty S, et al. Mosquito Bite Delivery of Dengue Virus Enhances Immunogenicity and Pathogenesis in Humanized Mice. *J Virol* 2012; 86: 7637–7649.
- [20] McCracken MK, Christofferson RC, Chisenhall DM, et al. Analysis of early dengue virus infection in mice as modulated by *Aedes aegypti* probing. *J Virol* 2014; 88: 1881–9.
- [21] Wu S-JJ, Grouard-Vogel G, Sun W, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 2000; 6: 816–20.
- [22] Gretz JE, Norbury CC, Anderson AO, et al. Lymph-Borne Chemokines and Other Low Molecular Weight Molecules Reach High Endothelial Venules via Specialized Conduits While a Functional Barrier Limits Access to the Lymphocyte Microenvironments in Lymph Node Cortex. *J Exp Med* 2000; 192: 1425–1440.
- [23] Cyster JG. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat Immunol* 2010; 11: 989–996.
- [24] Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 15–27.
- [25] Carrasco YR, Batista FD. B Cells Acquire Particulate Antigen in a Macrophage-Rich Area at the Boundary between the Follicle and the Subcapsular Sinus of the Lymph Node. *Immunity* 2007; 27: 160–171.
- [26] Gray EE, Cyster JG. Lymph Node Macrophages. *J Innate Immun* 2012; 4: 424–436.
- [27] Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 1997; 156: 25–37.
- [28] MacLennan ICM. Germinal Centers. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 117–139.

- 
- [29] MacLennan ICM, Toellner K-M, Cunningham AF, et al. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 2003; 194: 8–18.
- [30] Junt T, Moseman EA, Iannacone M, et al. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 2007; 450: 110–114.
- [31] Platt KB, Linthicum KJ, Myint KS, et al. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57: 119–25.
- [32] Bustos-Arriaga J, Mita-Mendoza NK, Lopez-Gonzalez M, et al. Soluble mediators produced by the crosstalk between microvascular endothelial cells and dengue-infected primary dermal fibroblasts inhibit dengue virus replication and increase leukocyte transmigration. *Immunol Res* 2016; 64: 392–403.
- [33] Aye KS, Charngkaew K, Win N, et al. Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. *Hum Pathol* 2014; 45: 1221–1233.
- [34] 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.
- [35] Jessie K, Fong MY, Devi S, et al. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. *J Infect Dis* 2004; 189: 1411–1418.
- [36] Melzi E, Caporale M, Rocchi M, et al. Follicular dendritic cell disruption as a novel mechanism of virus-induced immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 113: E6238–E6247.
- [37] Fink K, Ng C, Nkenfou C, et al. Depletion of macrophages in mice results in higher dengue virus titers and highlights the role of macrophages for virus control. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2809–2821.
- [38] Prestwood TR, May MM, Plummer EM, et al. Trafficking and Replication Patterns Reveal Splenic Macrophages as Major Targets of Dengue Virus in Mice. *J Virol* 2012; 86: 12138–12147.
- [39] Geijtenbeek TBH. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* 2002; 100: 2908–2916.
- [40] Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceicao TM, et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev* 2015; 39: 155–170.

- 
- [41] Qi H. Extrafollicular Activation of Lymph Node B Cells by Antigen-Bearing Dendritic Cells. *Science* 2006; 312: 1672–1676.
- [42] MacLennan ICM, Gulbranson-Judge A, Toellner K-M, et al. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev* 1997; 156: 53–66.
- [43] Cedillo-Barrón L, García-Cordero J, Bustos-Arriaga J, et al. Antibody response to dengue virus. *Microbes Infect* 2014; 16: 711–720.
- [44] Yam-Puc JC, Cedillo-Barrón L, Aguilar-Medina EM, et al. The cellular bases of antibody responses during dengue virus infection. *Front Immunol* 2016; 7: 1–12.
- [45] Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, et al. Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science* 2010; 328: 745–748.
- [46] Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol* 2016; 17: 1102–1108.
- [47] Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, 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.
- [48] Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clin Transl Immunol* 2016; 5: e117

---

## CAPÍTULO 3

### Caracterización de la respuesta de linfocitos T y B en ganglios linfáticos regionales ante la infección cutánea con el virus Dengue

#### Resumen

El Dengue es un problema de salud a nivel mundial, que carece de tratamiento específico y de vacunas seguras disponibles al momento. Si bien el dengue grave está relacionado con anticuerpos preexistentes no neutralizantes contra el virus del dengue (DENV), el papel de las células T en la protección o en la patología, no está claro. Previamente, hemos demostrado la generación de centros germinales (GCs) PNA+ utilizando un modelo de infección cutánea con DENV en ratones inmunocompetentes. Ahora, evaluamos la activación y proliferación de linfocitos B y T en ganglios linfáticos drenantes (DLNs). Encontramos una drástica remodelación de los compartimentos internos de los DLNs, desde los 7 y 14 días post infección (dpi) con un notable agrandamiento en los folículos de linfocitos B, que ocupan casi la mitad del área total de los DLNs, en comparación con un  $\approx 24\%$  en condiciones basales. Observamos grandes grupos de células proliferantes (Ki-67+) dentro de los folículos de células B a los 14 dpi, representando aproximadamente el 33% de las células B en los DLNs, mientras que en ratones no infectados sólo representan el  $\sim 2\%$ . Además, dentro de los GCs notamos un reclutamiento importante de macrófagos fagocitando cuerpos apoptóticos. En contraste, el porcentaje del área paracortical así como la proporción de células T totales disminuyó a los 14-16 dpi, en comparación con los controles. Los linfocitos T Ki-67+ se encontraron dispersos y distribuidos al azar en la paracorteza, de manera muy similar que en los ratones no infectados. Mientras que la expresión de CD69 en células T CD4+ y CD8+ fue mínima, esta fue muy notable en las células B, representando 1764.7% de incremento respecto a los niveles basales a los 3 dpi. La aparente falta de respuestas de las células T no es atribuible a la muerte por apoptosis ya que no se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones no infectados. En este estudio demostramos la activación y proliferación masiva de células B en DLNs tras la infección por DENV. En gran contraste, encontramos que las respuestas de células T CD4+ y T CD8+ fueron muy pobres, casi ausentes.

#### Palabras clave

Virus dengue (DENV), proliferación de células B y T, activación de linfocitos, ganglios linfáticos, infección cutánea *in vivo*, ratones inmunocompetentes, TBMs.



## Introducción

El dengue es una enfermedad viral que afecta gran parte del territorio mundial y se manifiesta en una variedad de formas clínicas, que va desde una infección asintomática, un cuadro febril autolimitado conocido como fiebre por dengue (DF), hasta una enfermedad hemorrágica potencialmente mortal, el dengue grave (SD) [1]. El virus dengue (DENV 1-4) se transmite entre los humanos por una picadura del mosquito hembra del género *Aedes aegypti*. Debido a la amplia distribución del vector, más de la mitad de la población mundial está en riesgo, con un estimado de 96 millones de casos clínicos cada año y alrededor de 2,5% de las hospitalizaciones que terminan en la muerte de los pacientes [1, 2].

Desde las primeras epidemias reconocidas causadas por el DENV en la década de 1780 [3, 4], el estudio del DENV ha enfrentado enormes retos, tales como: la amplia gama de presentaciones clínicas, la co-circulación de cuatro serotipos diferentes de DENV en zonas endémicas, además de las recientes epidemias de otros flavivirus emergentes altamente relacionados (por ejemplo, virus Zika), la patología severa durante infecciones heterólogas y la falta de un modelo animal ideal para investigar la enfermedad. Además, la urbanización, el control deficiente del vector, el cambio climático y la evolución tanto del virus como del vector han contribuido en el incremento de 30 veces en la incidencia global durante los últimos 50 años [5].

En los casos severos, generalmente durante infecciones secundarias heterólogas, las manifestaciones hemorrágicas como la permeabilidad vascular, el sangrado, extravasación del plasma y la trombocitopenia comienzan una vez que la fiebre/viremia remite (5-7 días después de los primeros síntomas), lo que sugiere que la patología podría estar más relacionada con la respuesta inmune adaptativa que con la replicación viral [6]. Por lo tanto, se necesita urgentemente una mejor comprensión de la respuesta inmune desencadenada por el DENV en infecciones primarias y secundarias para un diseño más racional de fármacos antivirales y -especialmente- de vacunas seguras [7, 8].

Mientras que el papel de los anticuerpos neutralizantes protectores durante las reinfecciones homotípicas por el DENV ha sido bien establecido [9, 10], los anticuerpos no neutralizantes de reacción cruzada en infecciones heterotípicas han sido relacionados con la facilitación de la infección [11–13]. Las células que poseen receptores Fc $\gamma$  capturan partículas virales opsonizadas, fenómeno conocido como facilitamiento de la infección dependiente de anticuerpos (*antibody-dependent enhancement* [ADE]), contribuyendo así a la inmunopatología [14, 15]. Los mecanismos por los cuales se generan anticuerpos de diferentes afinidades, neutralizantes y no neutralizantes contra el DENV aún no se han dilucidado, especialmente con respecto a la diferenciación de células B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos

---

en los órganos linfoides, ya sea a través de reacciones de centro germinal (GC) o mediante respuestas extrafoliculares.

Para algunos patógenos virales como el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus sincitial respiratorio, el virus de influenza A o coronavirus, es bien conocida la participación crucial de las células T para la eliminación del virus [16–21]. Esto se produce por diversos mecanismos, tales como la producción de citocinas, la actividad citotóxica, desgranulación de células T CD8+ y la cooperación con las células B. Por el contrario, el papel de las células T en la resolución, control, protección y/o en la inmunopatología de la infección por el DENV no está claro hasta el momento [22, 23].

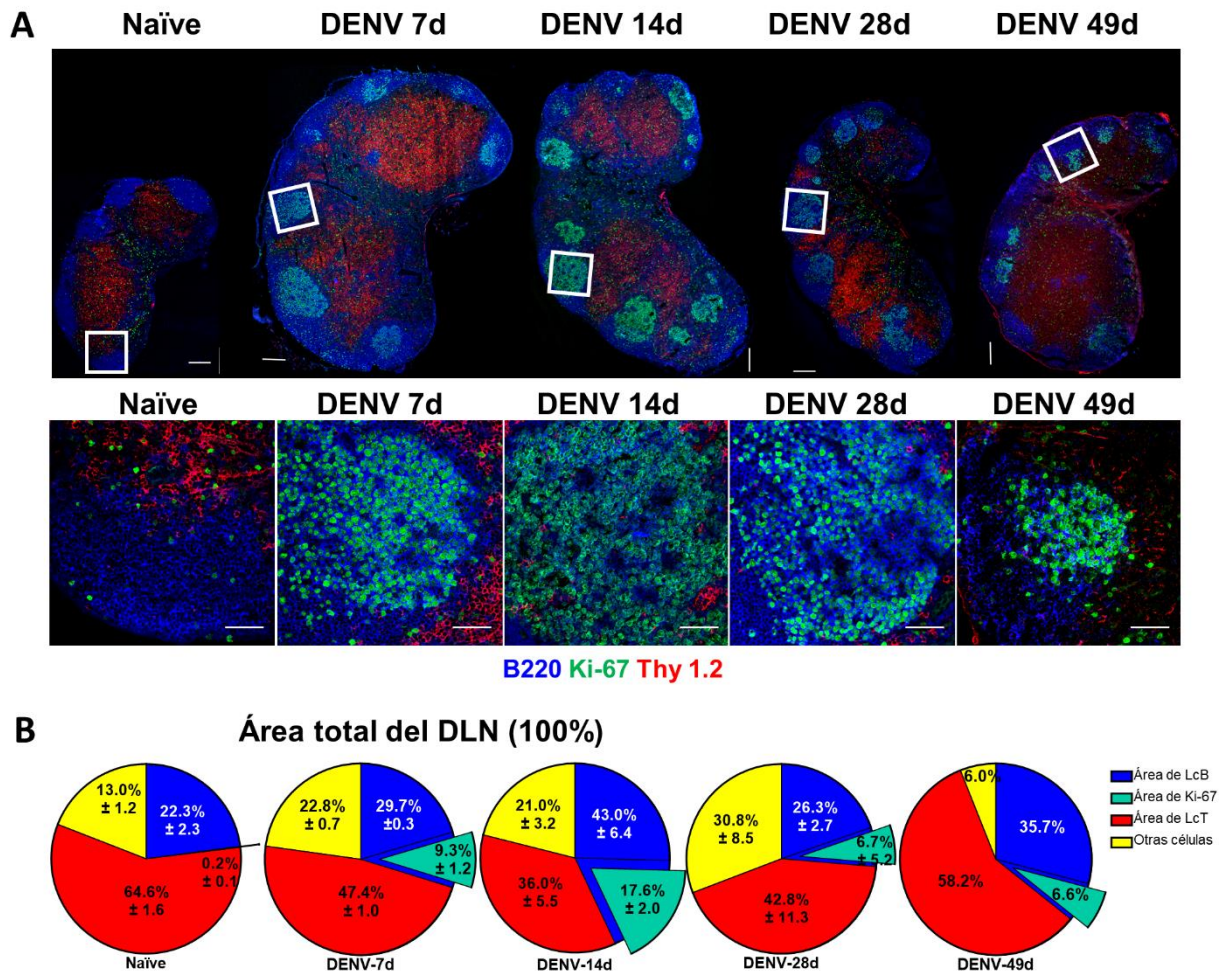
Usando un modelo *in vivo* de infección cutánea con el DENV en ratones inmunocompetentes, mostramos anteriormente la generación de GCs PNA+, la expresión de proteínas estructurales (E y PreM) y no estructurales (NS3) del DENV dentro de los ganglios linfáticos drenantes (DLNs) y la producción de anticuerpos específicos para DENV [24]. Ahora, evaluamos en mayor detalle la posible remodelación de los principales compartimentos dentro de los DLNs, también estudiamos la proliferación y activación en células B y lo extendimos al estudio en paralelo de las células T. Encontramos sorprendentes diferencias entre las respuestas de células B y T después de la infección con DENV, con una masiva activación temprana y vigorosa proliferación de células B dentro de los folículos, seguido de un notable reclutamiento de macrófagos especializados en remover cuerpos apoptóticos (Tingle Body Macrophages, TBMs) dentro de los GCs. Contrastantemente, observamos una respuesta muy pobre, casi ausente de linfocitos T durante el curso de la infección.

## Resultados

### **Después de la infección cutánea con DENV, los folículos de células B se expanden y albergan grandes grupos de células proliferantes, mientras que pocas células T proliferantes dispersas se localizan en la paracorteza del DLN**

Después de la infección cutánea con el DENV en ratones inmunocompetentes se induce un aumento en el tamaño de los DLNs y la formación de grandes GCs, como se reportó anteriormente [24]. Para evaluar en detalle los efectos de la inoculación cutánea con el DENV sobre los compartimentos de células B y T *in situ*, y la posible proliferación celular en cada compartimento, utilizamos el marcador de proliferación celular, Ki-67. Encontramos que el área folicular de células B aumenta después de 7 días de infección con el DENV, ocupando en ratones no infectados, un  $22.3\% \pm 2.3$  del área total de DLN y alcanzando un  $29.7\% \pm 0.3$  de los DLNs en animales infectados. El área de células B en los ratones infectados con DENV alberga muchas más células Ki-67+ que los folículos de animales sin infectar. Mientras que en estos últimos se encontraron muy pocos y pequeños agregados de células Ki-67+ ( $1.0\% \pm 0.7$ ); al día 7 p.i. una gran parte de los folículos estaba ocupada por células Ki-67+ ( $28.2\% \pm 4.5$ ). En contraste, la proporción del área total de células T (en la paracorteza) parece levemente disminuida en ratones infectados con DENV a los 7 días p.i, de  $64.6\% \pm 1.6$  a  $47.4\% \pm 1.0$ . Los DLNs de ratones inoculados con iDENV se comportaron muy similar al grupo control no infectado, pero la zona de Ki-67+ comenzó a aumentar desde el día 7 p.i. Sin embargo, a los 14 días después de la infección con el DENV, el área de células B en DLN está muy expandida, de  $22.3\% \pm 2.3$  en condiciones basales hasta alcanzar  $43.0\% \pm 6.3$  en animales infectados, conteniendo un mayor número de folículos proliferantes (Ki-67+) y donde las células Ki-67+ ocupan hasta  $42.0\% \pm 3.8$  del área folicular mientras sólo el  $1.0\% \pm 0.7$  en condiciones normales. En contraste, la zona paracortical (también llamada zona de LcT y de DCs) de los DLNs parece estar disminuyendo, de  $64.6\% \pm 1.6$  a  $36.0\% \pm 5.5$  a los 14 días p.i (Fig. 3.1A-B). Con el iDENV se observó un patrón muy similar con respecto a ambos compartimentos a este tiempo evaluado (Fig. 3.2A-B). Al analizar estos mismos compartimentos a tiempos más tardíos, 28 y 49 días p.i. con iDENV y DENV, encontramos una reducción en el tamaño total de los DLNs, al igual que de los folículos de linfocitos B, los cuales ocupan ahora un  $26.3\% \pm 2.7$  del área total a los 28 días. El área proliferante Ki-67+ del total del DLN también disminuyó considerablemente respecto al día 14, ocupando un  $6.7\% \pm 5.2$ . Sin embargo, las células B proliferantes aún ocupan un porcentaje importante del total del folículo,  $29.3\% \pm 6.5$  comparado con  $1\% \pm 0.7$  en los controles sin infectar. Notablemente a los 49 días p.i. con DENV aún se observan varios folículos Ki-67+ y estas zonas dentro de los folículos representan un  $6.6\%$  del total del DLN y un  $18.8\%$  del área folicular. A estos mismos tiempos, el área de células T comienza a incrementar nuevamente ocupando un  $42.8\% \pm 11.3$  a

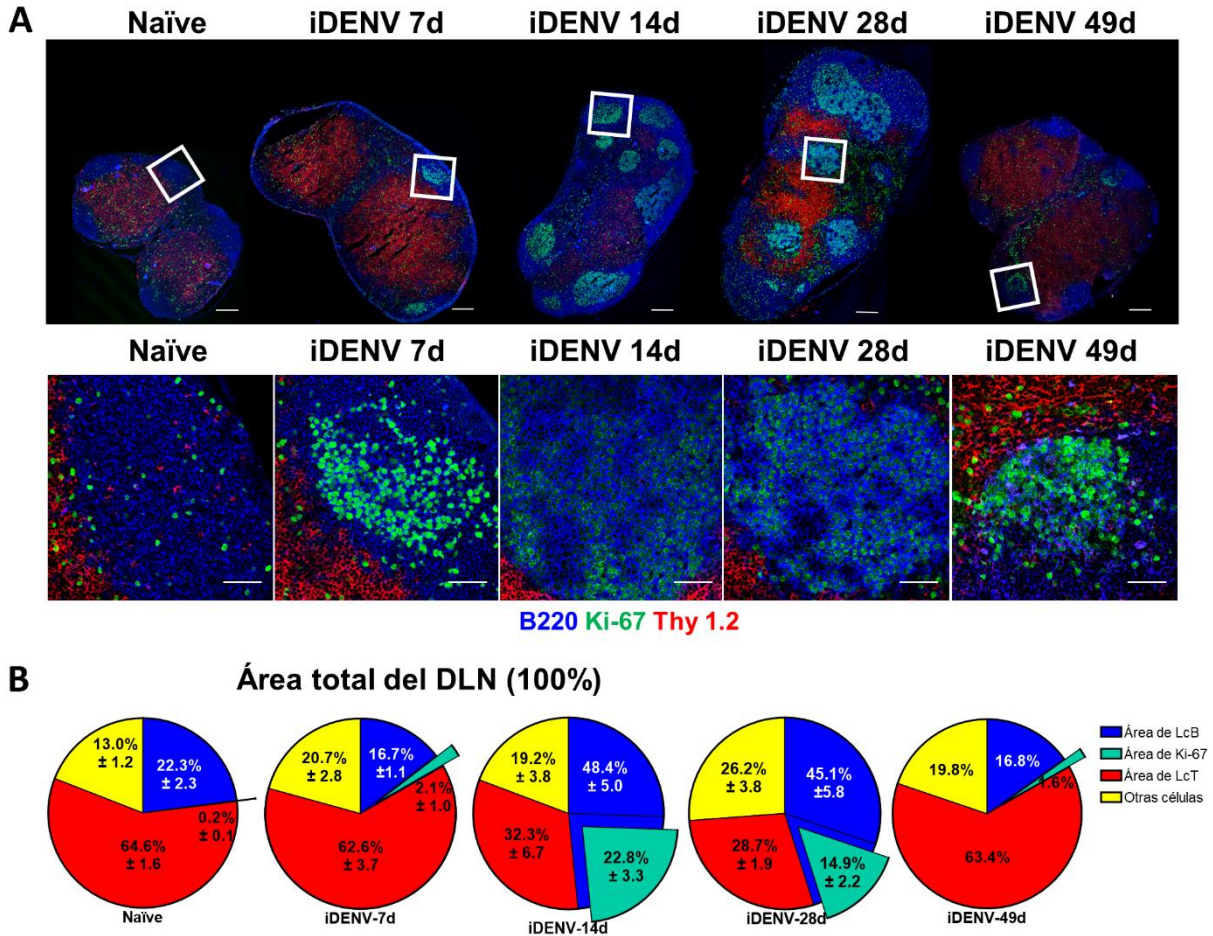
los 28 días p.i. y un 58.2% a los 49 días (Fig. 3.1A-B). Cabe resaltar que tras 28 días p.i. con el iDENV, tanto el área folicular, como el área proliferante se mantienen significativamente incrementados representando  $45.1\% \pm 5.8$  y  $14.9 \pm 2.2$ , respectivamente. Esta última, representa un tercio ( $34.0\% \pm 7.1$ ) del total del folículo. A los 49 días p.i. con el iDENV, se observa que la respuesta proliferativa decae casi a niveles basales (Fig. 3.2A-B). Por lo tanto, el DENV replicante despierta una respuesta más temprana que se contrae más rápido, pero perdura hasta tiempos tardíos de la infección en comparación al iDENV. Esto se evidencia tanto en el número de folículos Ki-67+, el porcentaje del área proliferante a partir del área total del DLN y a partir del área folicular (Fig. 3.3A-E).



**Fig. 3. 1. Organización de los compartimentos de células T y B en DLNs después de la infección cutánea con el DENV.**

Los ratones se infectaron cutáneamente con  $6 \times 10^4$  PFU de DENV en la región inguinal y se retaron al día 7. Criosecciones de DLNs fueron marcadas para determinar la presencia de linfocitos T (Thy 1.2, rojo), linfocitos B (B220, azul) y un marcador de proliferación (Ki-67, verde). **A** Los paneles superiores representan imágenes panorámicas de DLNs de ratones no infectados (ratones inoculados con PBS libre de endotoxina) y de ratones inoculados con DENV, mientras que los paneles inferiores ilustran aumentos de las regiones indicadas. El DENV indujo un aumento en el tamaño de los DLNs principalmente a los 7 y 14 días p.i. en comparación con los ratones no infectados, la zona de células B se expandió desde los 7 días p.i. pero principalmente al día 14 p.i. debido a una gran cantidad de células proliferantes dentro de los folículos.

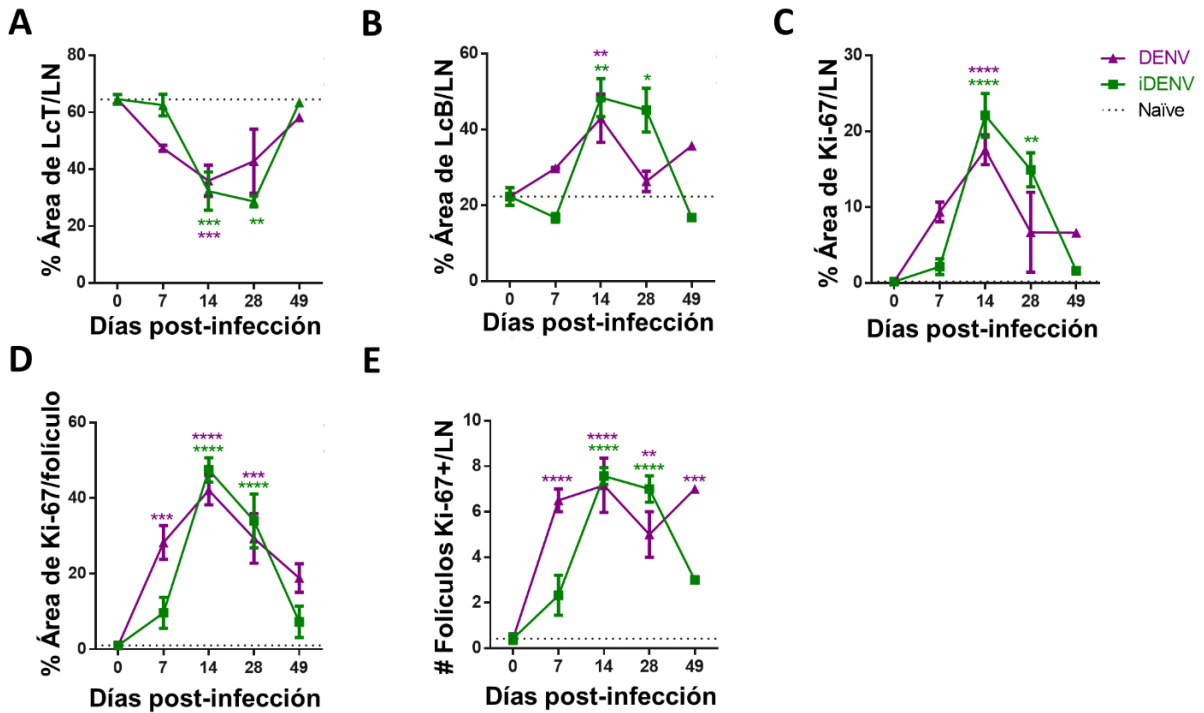
Los DLNs de ratones control contienen escasas células Ki-67+ en los folículos de células B. A los 28 y 49 días p.i. el área folicular disminuye, pero aún alberga importante actividad proliferativa hasta los 49 días p.i. Barras de escala en paneles superiores, 200  $\mu\text{m}$  y en paneles inferiores, 50  $\mu\text{m}$ . **B** Los gráficos circulares muestran la proporción de las áreas ocupadas por células B, T y Ki-67+ respecto al área total del DLN. Los datos en cada segmento representan la media  $\pm$  SEM. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con 3 DLNs.



**Fig. 3. 2. Organización de los compartimentos de células T y B en DLNs después de la inmunización cutánea con el iDENV.**

Los ratones se inocularon cutáneamente con  $6 \times 10^4$  PFU de iDENV en la región inguinal y se retaron al día 7. Criosecciones de DLNs fueron marcadas para determinar la presencia de linfocitos T (Thy 1.2, rojo), linfocitos B (B220, azul) y un marcador de proliferación (Ki-67, verde). **A** Los paneles superiores representan imágenes panorámicas de DLNs de ratones no infectados (ratones inoculados con PBS libre de endotoxina) y de ratones inoculados con iDENV, mientras que los paneles inferiores ilustran magnificaciones de las regiones indicadas. El iDENV indujo un aumento en el área folicular principalmente al día 14 y 28 p.i. Se observó una gran cantidad de células proliferantes dentro de los folículos al día 14 y 28 p.i. disminuyendo para el día 49. Barras de escala en paneles superiores, 200  $\mu\text{m}$  y en paneles inferiores, 50  $\mu\text{m}$ . **B** Los gráficos circulares muestran la proporción de las áreas ocupadas por células B, T y Ki-67+ respecto al área total del DLN. Los datos en cada segmento representan la media  $\pm$  SEM. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con 3 DLNs.





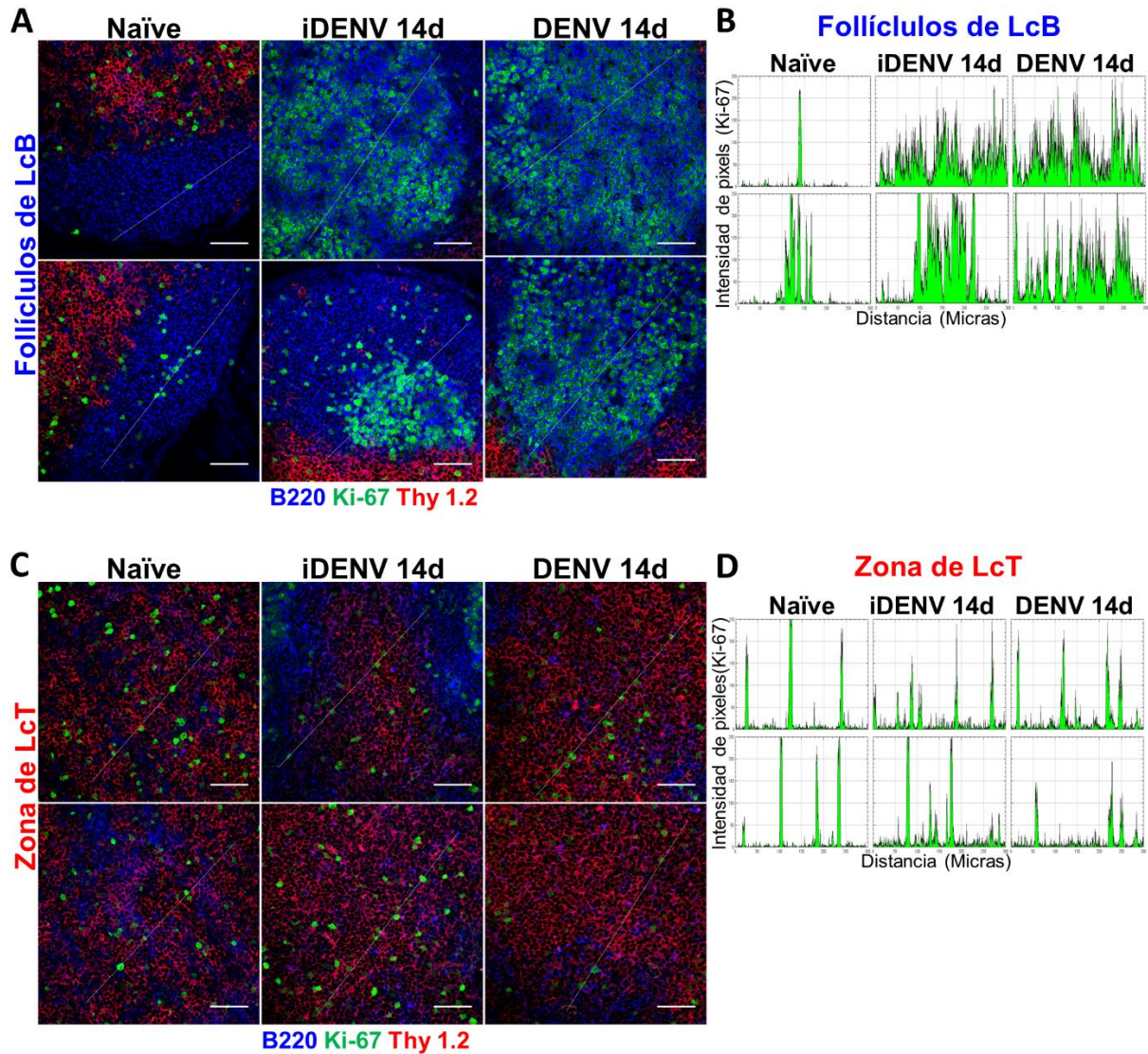
**Fig. 3. 3. Análisis semicuantitativo in situ de los DLNs después de la inoculación cutánea con el iDENV y el DENV.**

Los ratones se inocularon con  $6 \times 10^4$  PFU de iDENV y DENV en la región inguinal y se retaron al día 7. Criosecciones de DLNs fueron marcadas para determinar la presencia de linfocitos T (Thy 1.2), linfocitos B (B220) y un marcador de proliferación (Ki-67). Se determinaron las ROIs manualmente con el software ImageJ (NIH) y luego se obtuvieron los porcentajes de cada compartimento. Las gráficas muestran el área absoluta ( $\mu\text{m}^2$ ) y porcentaje a partir del área total del DLN ocupada por las células T (A-B), B (C-D) y Ki-67 (E-F). El número de folículos Ki-67+ por DLN (G) y la proporción de células proliferantes del área folicular (H) incrementa significativamente desde los 7 días p.i con DENV y hasta los 14 días con el iDENV. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con 3 DLNs. Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni para la comparación múltiple entre grupos, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  y \*\*\*\*  $P < 0.001$ .

Para analizar con mayor detalle la distribución de las células proliferantes individuales en cada compartimento (de células T y B) en los DLNs, utilizamos un mayor aumento. Las células Ki-67+ dentro de los folículos de ratones no infectados fueron muy escasas, y cuando se encontraron fue en pequeños grumos, estos contenían menos de 15 células (en promedio) por folículo. En contraste, la innumerable cantidad de células proliferantes Ki-67+ dentro de los folículos de ratones inoculados con iDENV y DENV fue muy prominente a los 14 días p.i. (Fig. 3.4A). Esta intensa proliferación hace indistinguible la zona clara de la oscura, ya que toda el área del GC, está ocupada por células proliferantes. Al analizar imágenes individuales en gráficos bidimensionales de intensidad de píxeles a lo largo de  $300 \mu\text{m}$  de longitud, observamos alrededor de 3 a 5 picos de base ancha en ratones inoculados con iDENV y DENV, lo que indica un patrón de agrupamiento de las células proliferantes en este compartimento. Cabe destacar que las áreas oscuras observadas en estos perfiles a través de

---

la longitud analizada donde los picos disminuyen, aparentemente corresponden a TBMs fagocitando células apoptóticas (Ver Fig.3.5; Fig.3.4B). Concomitantemente, analizamos zonas paracorticales donde se encuentran los linfocitos T y las células dendríticas. Se ha reportado que, ante ciertas infecciones cutáneas con otros virus, como el virus del herpes simple, agrupados de células T CD8+ y T CD4+ están presentes en la paracorteza, lo que sugiere expansión clonal [25]. Sin embargo, no observamos agrupaciones de células T proliferantes en áreas paracorticales de los DLNs de ratones infectados con el DENV (14 días p.i.). En cambio, encontramos pocos núcleos Ki-67+ dispersos con una distribución aparentemente aleatoria que mostraba un patrón muy similar al de los ratones control, inoculados con PBS (Fig. 3.4C). Los perfiles de intensidad de fluorescencia de iDENV y DENV revelaron picos únicos de longitud corta, indicativos de células individuales y cada uno con intensidad de fluorescencia variable a través de la longitud de 300  $\mu\text{m}$  analizada (Fig. 3.5D).



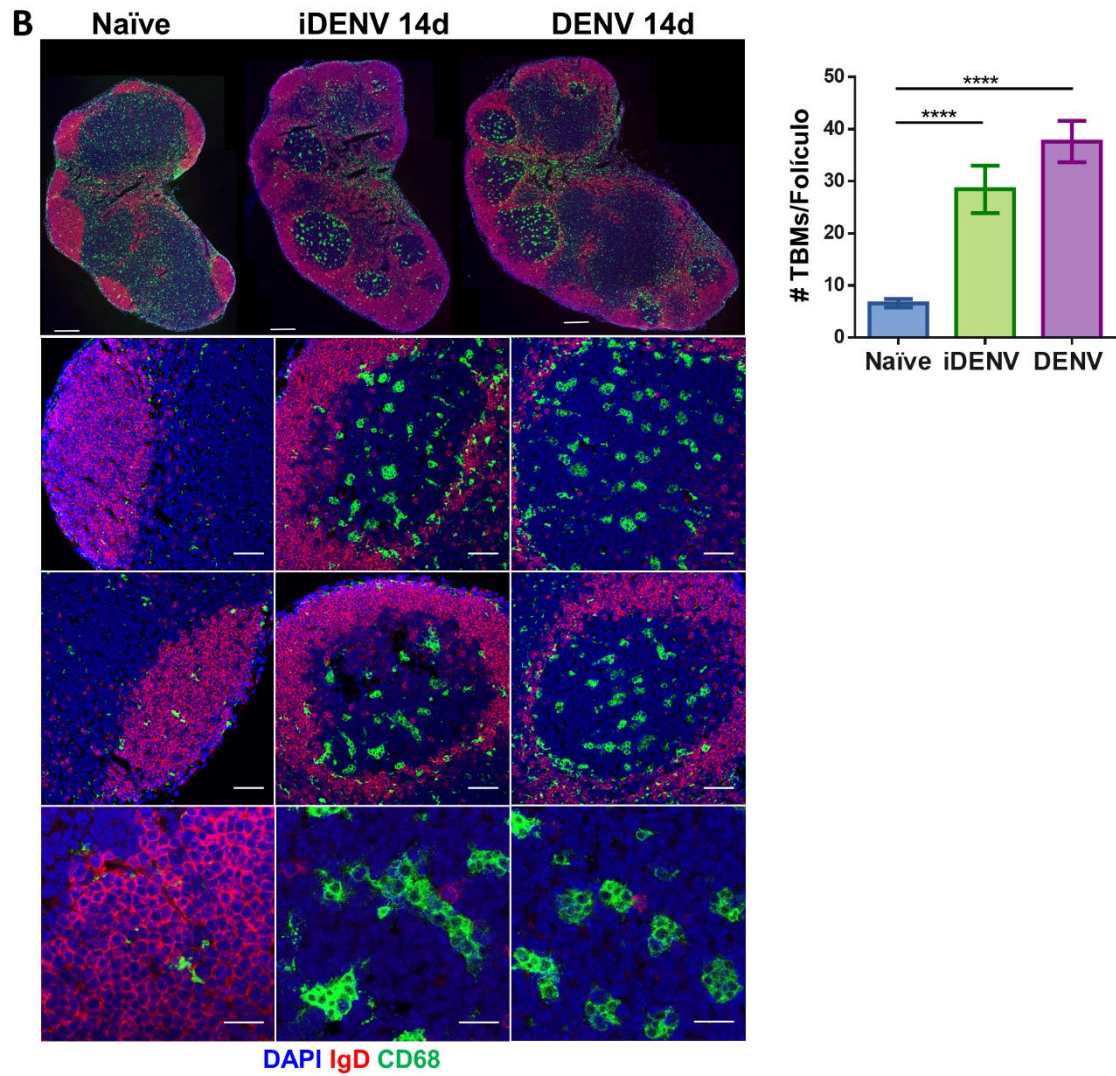
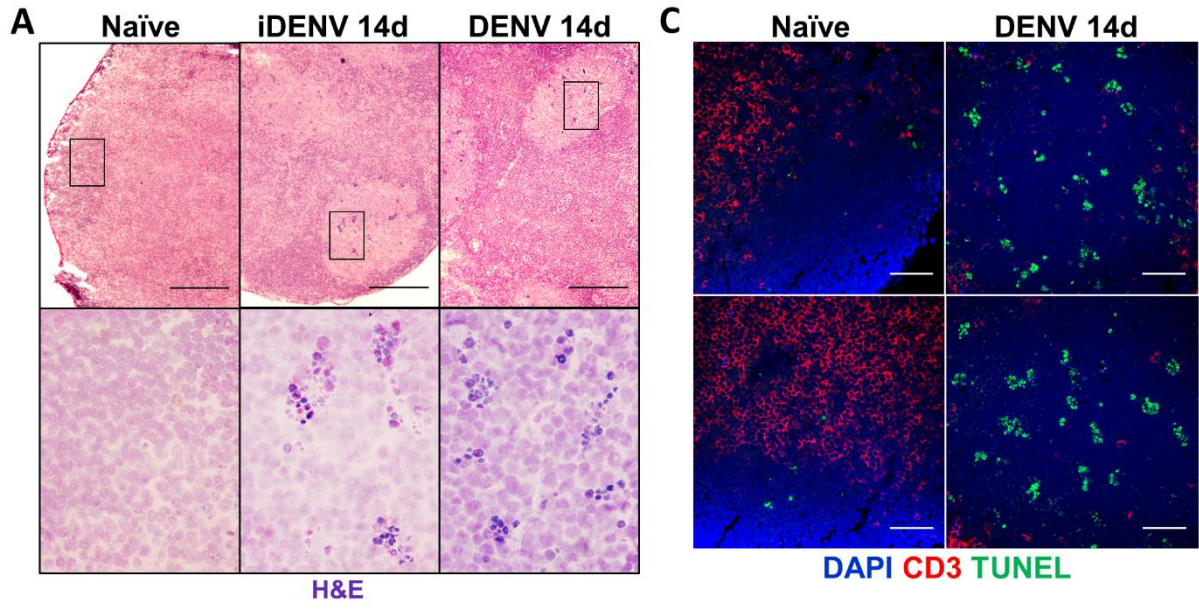
**Fig. 3. 4. Distribución de células proliferantes en los folículos de células B y en el área paracortical (células T).**

Los ratones se infectaron como en la Fig. x. Las imágenes de microscopía confocal muestran células B (B220, azul), células T (Thy 1.2, rojo) y células Ki-67+ (verde). **A** Agrupados grandes de células Ki-67+ dentro de los folículos de células B se inducen por la inoculación del iDENV y del DENV, en comparación con las muy escasas células individuales proliferantes en los DLNs de los ratones control. **B** Los perfiles de la intensidad de fluorescencia generados a partir de las imágenes en A, el eje Y representa la intensidad de los píxeles y el eje X, 300  $\mu\text{m}$  de distancia (líneas blancas en A). Se observan picos anchos de alta intensidad inducidos por la inoculación con el iDENV y con el DENV, mientras que en ratones inoculados con PBS se observan picos estrechos, que indican células individuales. **C** Las imágenes de microscopía confocal de las áreas paracorticales/Thy 1.2+ muestran una distribución dispersa de células individuales proliferantes (Ki-67+) después del tratamiento con el iDENV y con el DENV, con un patrón muy similar al de los ratones no inmunizados. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ . **D** Los perfiles de intensidad de fluorescencia corresponden a las líneas blancas diagonales en C. El iDENV y el DENV no muestran patrones de intensidad de fluorescencia diferentes en comparación con el control. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con tres DLNs.



### La inoculación cutánea de DENV induce un reclutamiento masivo de TBMs dentro de los GCs

Los TBMs representan una subpoblación altamente especializada dentro de los GC, estos macrófagos son cruciales para la eliminación de las células B apoptóticas durante la reacción de GC [55]. Como parte de la evaluación histológica de los DLNs ante la infección cutánea por DENV, realizamos tinciones con hematoxilina y eosina (H&E) y notamos muchos núcleos condensados, aparentemente "agrupados" en conjuntos separados definidos, lo que sugiere que macrófagos probablemente están fagocitando varios cuerpos apoptóticos (Fig. 3.5A). Para corroborar que las células involucradas eran TBMs con cuerpos apoptóticos dentro de los GC inducidos por DENV, se marcaron criocortes de DLNs usando CD68 como marcador de pan-macrófagos e IgD para identificar folículos de células B naïve. También realizamos el ensayo de TUNEL para demostrar células apoptóticas dentro de los GCs (Fig. 3.5C). En los DLNs de ratones control inoculados con PBS, encontramos muy pocos y pequeños macrófagos CD68+ dentro de los folículos no reactivos (IgD+). En estos animales control, la mayoría de los macrófagos CD68+ se observaron pequeños y ampliamente dispersos en áreas medulares y en la zona de células T (Fig. 3.5B). En contraste, los DLNs de ratones inmunizados con el iDENV y con el DENV presentaron folículos grandes y reactivos (IgD-negativos) indicando una reacción de GC en curso. La distribución de macrófagos grandes CD68+ ahora se limitó notablemente a los GC, mientras que algunos estaban en las áreas medulares y en la zona de células T. Esto se observa más claramente en las vistas panorámicas a menor aumento y sugiere un reclutamiento masivo de TBMs en los GCs 14 días después de la infección con DENV (Fig. 3.5B). Dentro de estos amplios GCs, encontramos un gran número de TBM grandes CD68+ que representan  $37.6 \pm 4.0$  por folículo en ratones infectados con el DENV y  $28.5 \pm 4.5$  en ratones inoculados con el iDENV, en comparación con sólo  $6.6 \pm 0.8$  de ellos en DLNs de ratones control.

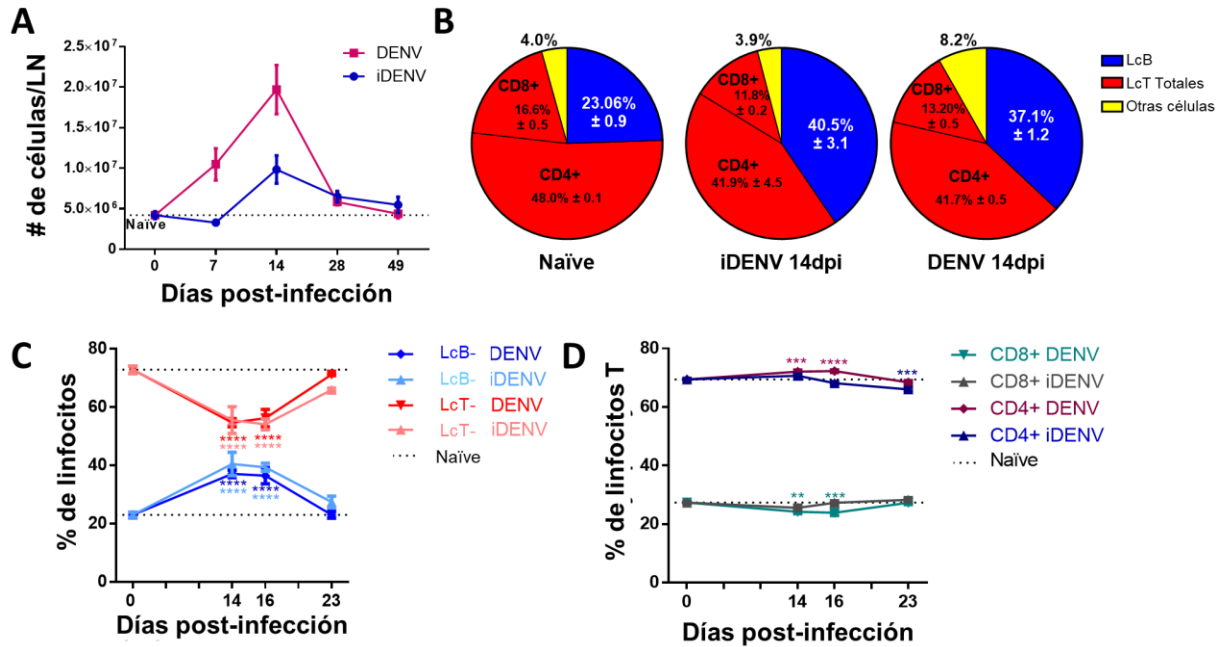


**Fig. 3. 5. Los TBMs se reclutan abundantemente dentro del GC ante la infección cutánea con el DENV.**

Los ratones se inocularon con DENV, iDENV o PBS, como en la Fig. 3.1 y se analizaron al día 14. **A** Criosecciones de DLNs se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Clásicamente, los núcleos con cromatina condensada (tinción más oscura) representan cuerpos apoptóticos, éstos se ubicaron dentro de los GCs de DLNs de ratones inmunizados con iDENV y DENV, mientras que en folículos naïve se observaron muy pocas o ninguna célula apoptótica. Barras de escala en el panel superior, 200  $\mu\text{m}$ ; aumentos, 60x. **B** Las imágenes de microscopía confocal muestran DLNs con folículos de células B naïve (áreas positivas para IgD, rojo), macrófagos (CD68+, verde) y núcleos (DAPI, azul). GCs grandes (zonas negativas para IgD) son inducidos por la inoculación del iDENV y del DENV y contienen un gran número de grandes TBMs CD68+, en comparación con muy pocos y pequeños macrófagos CD68+ en folículos naïve (IgD+) de los DLNs de ratones control. Barras de escala en el panel superior, 200  $\mu\text{m}$ , paneles centrales, 50  $\mu\text{m}$  y panel inferior, 20  $\mu\text{m}$ . **C** Las imágenes de microscopía confocal muestran la distribución de células apoptóticas TUNEL+ en grupos separados dentro de áreas foliculares después de la inmunización con DENV, mientras que se ven muy pocas células TUNEL+ en los folículos de ratones no inmunizados. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ . Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes realizados en 3 DLN. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para la comparación múltiple, \* P <0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001 y \*\*\*\* P <0.0001.

### **Análisis de linfocitos B y T por citometría de flujo multiparamétrica.**

A continuación, cuantificamos la celularidad total de los DLNs a los 7, 14, 28 y 49 días p.i. así como las proporciones de linfocitos B como de linfocitos T CD4+ y CD8+ en suspensiones de células de DLNs mediante citometría de flujo multiparamétrica. La celularidad total de los DLNs incremento significativamente desde los 7 dpi alcanzando su pico máximo a los 14 dpi. A los 28 y 49 días p.i. de DENV los números de células totales en los DLNs retornaron niveles similares a los basales. Los DLNs de ratones inoculados con el iDENV incrementaron su celularidad hasta los 14 días p.i. pero ésta fue menor en comparación a los números alcanzados con el DENV (Fig. 3.6A). Consistente con el análisis *in situ*, encontramos porcentajes de linfocitos B incrementados durante la infección con el DENV, mientras que en los DLNs de ratones no infectados la proporción de células B fue de 23.06%  $\pm$  0.9, en ratones inmunizados con iDENV fue de 40.5%  $\pm$  3.1 y en ratones infectados con DENV fue de 37.1%  $\pm$  1.2 (14 días p.i., Fig. 3.6B). Observamos un patrón muy similar a los 16 días p.i., y estas proporciones retornaron a niveles casi basales a los 23 días p.i. (Fig. 3.6C). Aunque el porcentaje de células T totales se reduce a los 14 y 16 días p.i., la proporción de las subpoblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+ únicamente cambia ligeramente con respecto al grupo control de ratones inoculados con PBS. Sin embargo, estos últimos cambios muestran diferencias estadísticamente significativas en comparación con los ratones control a los 14 y 16 días p.i. (Fig. 3.6D).



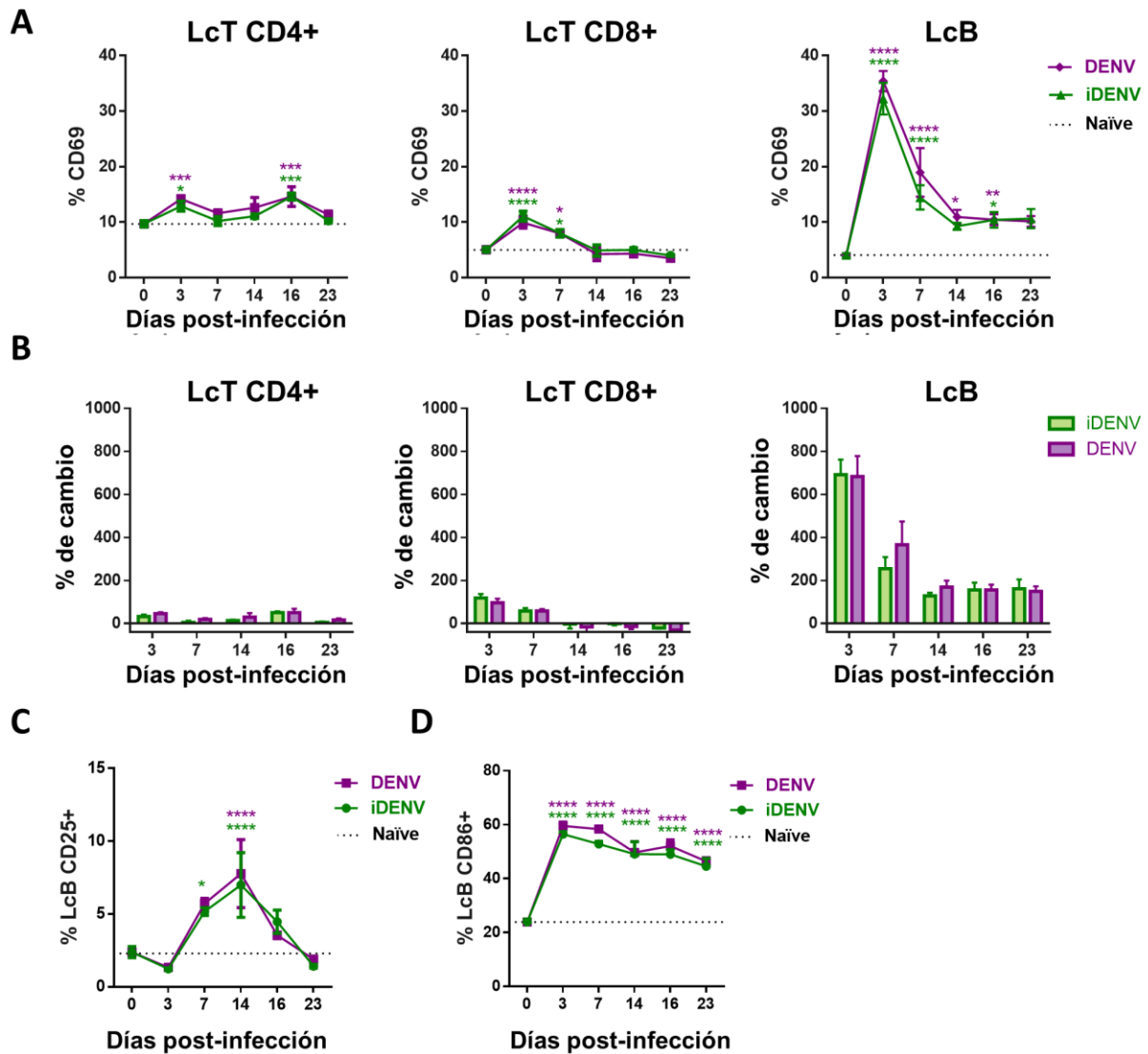
**Fig. 3. 6. Análisis de las suspensiones celulares de linfocitos B y T por citometría de flujo multiparamétrica.**

Los ratones se infectaron como en la Fig. 3.1 y se analizaron a los 14, 16 y 23 días p.i. Se obtuvieron suspensiones de células individuales de DLNs y se marcaron con anticuerpos monoclonales contra B220, CD3, CD4 y CD8. **A** Los gráficos circulares muestran la media  $\pm$  SEM de la proporción de cada subpoblación a partir de las células totales del DLN a los 14 días p.i. **B** La mayor proporción de linfocitos B se observa a los 14 días p.i. mientras que las células CD3 + disminuyen al mismo tiempo. A los 23 días p.i. la proporción de ambas poblaciones vuelve a niveles basales. **C** A los 14 y 16 días p.i., la proporción de linfocitos T CD4+ aumentó muy ligeramente en comparación con los controles, mientras que la población CD8 + disminuyó después del tratamiento con DENV. Los porcentajes se seleccionaron a partir de las células CD3+. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con cuatro ratones cada uno. Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni para la comparación múltiple entre grupos, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  y \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### Activación diferencial de células B y T durante la infección con el DENV

Durante la infección con el DENV, la activación de células inmunes se ha estudiado principalmente en sangre periférica de pacientes infectados, pero esto podría no reflejar exactamente los procesos celulares que realmente ocurren dentro de los órganos linfoides secundarios [26]. Nosotros evaluamos la expresión del marcador de activación CD69 en linfocitos de los DLNs de los tres grupos experimentales. Observamos que, en comparación con los ratones no infectados ( $6.6\% \pm 0.3$ ), tanto iDENV ( $10.7\% \pm 0.3$ ) como DENV ( $11.8\% \pm 1.7$ ), provocaron cierta expresión de CD69 en las células T CD4+ desde tiempos tempranos después de la inmunización. Este perfil de expresión de CD69 en células T CD4+ se mantiene hasta 16 días p.i. En comparación, la expresión de CD69 en células T CD8+ muestra un incremento a los 3 y 7 días p.i. pero no parece cambiar después a lo largo del estudio. En contraste, las células B mostraron una temprana y fuerte sobre expresión de CD69 desde los 3 días p.i. disminuyendo con el tiempo, pero sin alcanzar los niveles basales a lo largo de la

cinética analizada. Por lo tanto, las células B CD69+ incrementan desde niveles muy bajos,  $1.9\% \pm 0.4$  en condiciones basales hasta alcanzar la máxima expresión,  $35.4\% \pm 1.8$  al día 3 después de la infección con el DENV (Fig. 3.7A). Este aumento representa el 683.0% de cambio a los 3 días p.i. con respecto a la expresión basal. En comparación, las células T CD4+ simplemente muestran 84,3% de cambio en comparación con las células de los animales no infectados y las células T CD8+ alcanzan sólo un 48,0% de cambio a los 16 días p.i. (Fig. 3.7B). Al mismo tiempo, analizamos la expresión de otros marcadores asociados a la activación celular, como el CD25 y el CD86. Los linfocitos B no muestran cambios respecto al control ( $2.3\% \pm 0.4$ ), en la expresión de CD25 al día 3 p.i. con DENV, pero incrementan la expresión de esta molécula para el día 7, 14 y 16 p.i. alcanzando el pico máximo ( $7.7\% \pm 2.3$ ) a los 14 días (Fig. 3.7C). Por el contrario, los linfocitos B incrementan temprana y significativamente la expresión de CD86 en comparación a la expresión basal ( $23.9\% \pm 1.0$ ) desde el día 3 ( $59.5\% \pm 1.4$ ) y se mantiene incrementada hasta los 23 días ( $46.4\% \pm 1.3$ ) después de la inoculación con DENV. Un patrón muy similar se observó ante la inoculación con el iDENV (Fig. 3.7D).



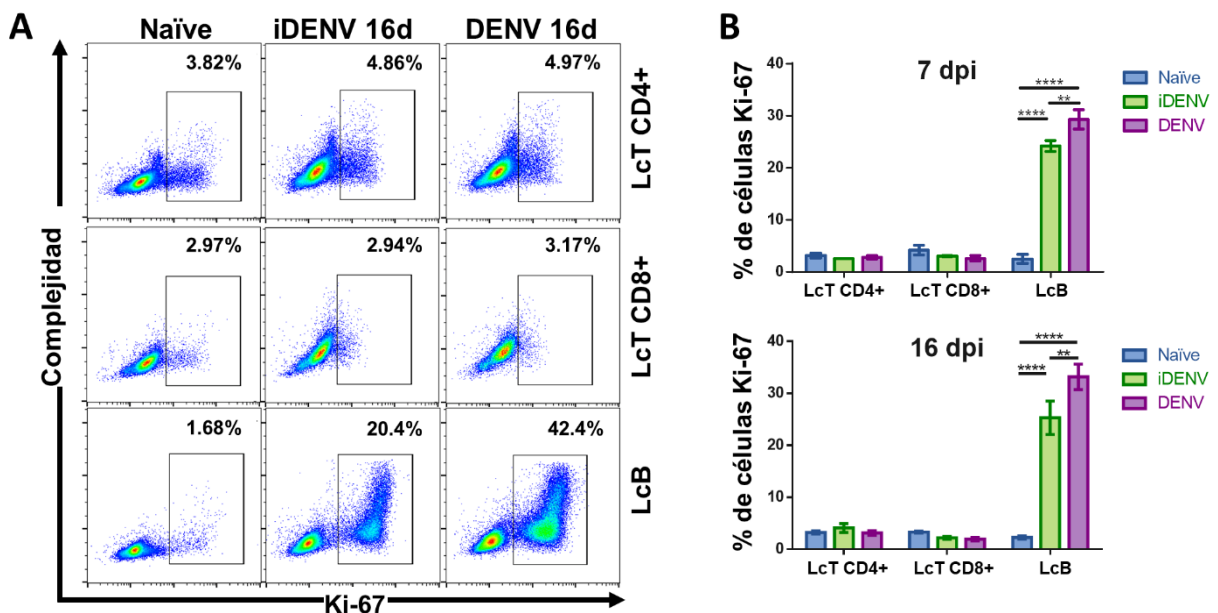
**Fig. 3. 7. La inoculación cutánea con DENV activa a los linfocitos B mucho más que a los linfocitos T.**

Las suspensiones celulares de DLNs de ratones control e inmunizados con iDENV y DENV se analizaron por citometría de flujo después de 3, 7, 14, 16 y 23 días p.i. El marcaje se realizó con anticuerpos monoclonales, B220, CD3, CD4, CD8, CD69, CD25 y CD86 según se indica. **A** Las gráficas representan los porcentajes de linfocitos activados (CD69+) a partir de las poblaciones CD3+ CD4+, CD3+ CD8+ y B220+. Se observa un ligero aumento en la expresión de CD69 en ambas subpoblaciones de células T a los 3 días p.i. y a los 16 días (LcT CD4+) después de la inoculación con el iDENV y el DENV. En los mismos tiempos evaluados, las células B expresaron CD69, pero en un grado mucho mayor que las células T. **B** El porcentaje de cambio (con respecto a la expresión basal) de CD69 en ratones inmunizados con iDENV y DENV muestra una intensa sobreexpresión de este marcador en las células B. Por el contrario, se observan cambios menores para las células T. **C** Los linfocitos B (B220+) incrementan significativamente la expresión de CD25 a los 14 días p.i. de iDENV y DENV, mientras que la expresión de CD86 (**D**) se observó incrementada desde los 3 días p.i. y se mantuvo así hasta los 23 días p.i. Los datos son representativos de dos experimentos independientes en 3 DLNs. La significancia estadística se determinó con la prueba de ANOVA de dos vías y la de Bonferroni para la comparación múltiple, \* P <0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001 y \*\*\*\* P <0.001.



### Las células B de los DLNs pero no las células T muestran una respuesta proliferativa masiva ante la infección cutánea con el DENV

También quisimos evaluar con un enfoque cuantitativo la respuesta proliferativa de linfocitos en los DLNs ante la infección cutánea con el DENV. Por lo tanto, medimos la expresión nuclear de la proteína Ki-67 mediante citometría de flujo multiparamétrica en linfocitos B y en linfocitos T CD4+ y CD8+ (Fig. 3.8A-B). Un porcentaje basal muy bajo de células B están proliferando en DLNs de ratones no infectados,  $2.27\% \pm 0.3$ , este porcentaje se eleva drásticamente hasta  $33.1\% \pm 2.4$  con el DENV y  $25.3\% \pm 3.2$  con el iDENV al día 16 p.i. En el caso de los linfocitos T, no encontramos ni siquiera una reacción proliferativa menor al DENV en las células T CD4+, con  $3.1\% \pm 0.4$  en ratones infectados con el DENV en comparación con el  $4.1\% \pm 0.8$  en ratones inoculados con iDENV y  $3.2\% \pm 0.3$  en animales no infectados. Del mismo modo, no vimos ningún incremento (respecto a los niveles basales) en la proliferación de linfocitos T CD8+ después de 16 días de infección con el DENV, con  $3.3\% \pm 0.2$  en ratones sanos frente a  $2.2\% \pm 0.3$  y  $2.0\% \pm 0.3$  de células T CD8+ después de 16 días de inmunización con iDENV y DENV, respectivamente. A tiempos más tempranos después de la infección (7 días p.i.), encontramos un patrón muy similar donde las células B, pero no las células T muestran una potente proliferación (Fig. 3.8A-B).



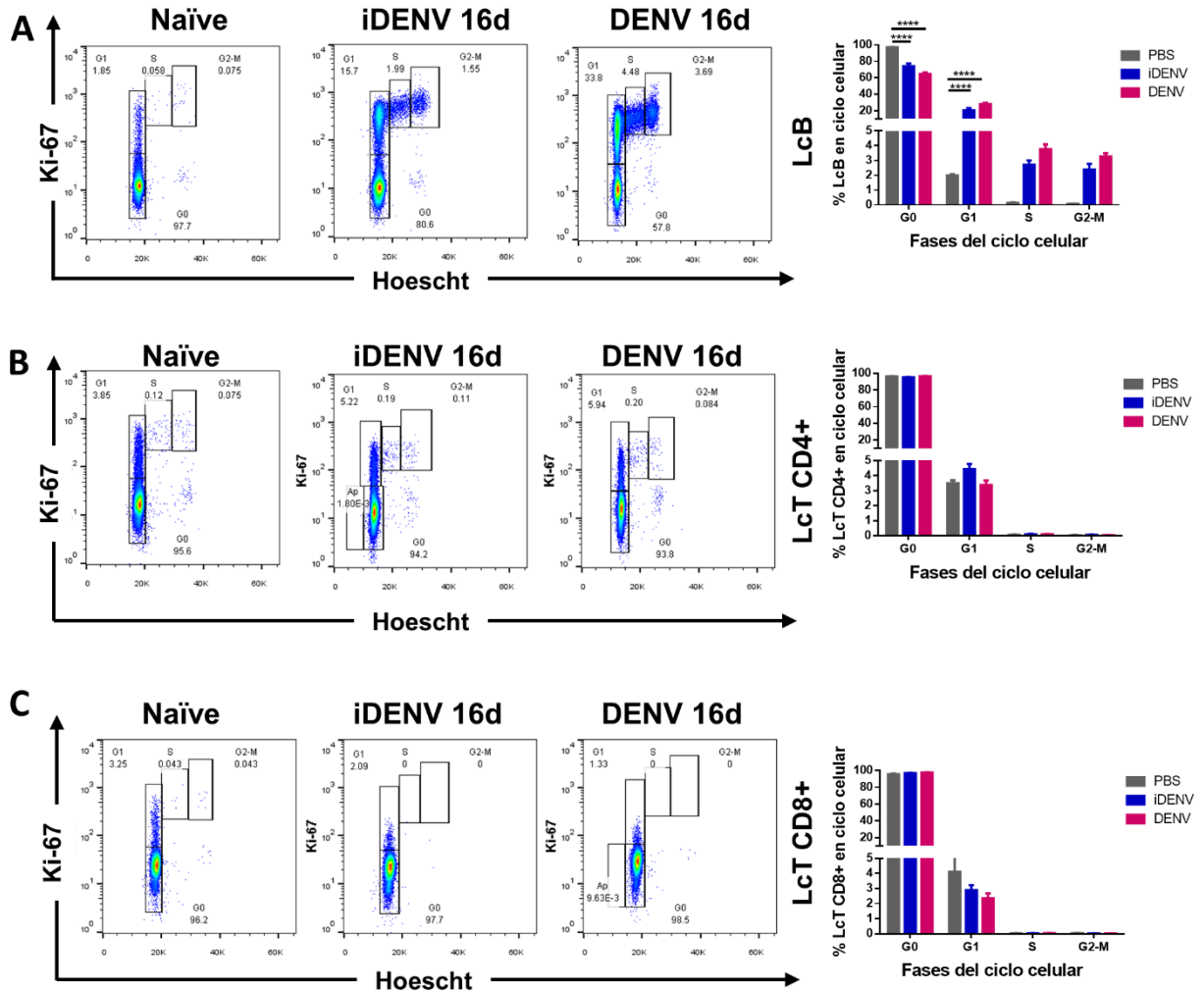
**Fig. 3. 8. DENV induce una fuerte proliferación en los linfocitos B, pero no en los linfocitos T de los DLNs.**

Suspensiones celulares de los DLNs se obtuvieron después de 7 y 16 días después de la inoculación cutánea con DENV, iDENV y PBS libre de endotoxina y se marcaron como en la Fig. x. Se realizó la permeabilización nuclear para la detección de la proteína Ki-67. Los diagramas de puntos de citometría de flujo muestran la aparición de una abundante población Ki-67+ en las células B (B220+) pero no en las células T CD4+ ni en las CD8+ después de la inoculación con iDENV y DENV.

Las gráficas de barras en B representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de células Ki-67+ donde se evidencia una proliferación masiva de células B, pero no de células T, tanto a los 7 como a los 16 días p.i. Dos experimentos independientes fueron agrupados y graficados. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni para la comparación múltiple, \* P <0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001 y \*\*\*\* P <0.001.

Para analizar en detalle la proliferación de los T y B ante la inmunización con el DENV, determinamos las fases del ciclo celular de los linfocitos. Evaluamos la expresión de Ki-67 al mismo tiempo que teñimos el DNA con el colorante fluorescente Hoechst. Con esta metodología podemos identificar las células en fase quiescente (G0) y activa del ciclo celular (G1, Síntesis [S], G2-M). Mientras que en ratones inoculados con PBS estéril, la proporción de células en fases activas del ciclo celular es muy baja (G1: 2.0%  $\pm$  0.08; S: 0.1%  $\pm$  0.4 y G2-M: 0.09  $\pm$  0.008), después de 16 días p.i cutánea con DENV, una proporción muy importante de linfocitos B, entran en fase G1 (27.86%  $\pm$  1.7 ), S (3.8%  $\pm$  0.3) y G2-M (3.3%  $\pm$  0.2). Al mismo tiempo la proporción de las células quiescentes disminuye (64.5%  $\pm$  2.0) respecto al control (97.0%  $\pm$  0.3; Fig. 3.9A). En contraste, ni las células T CD4+ ni las CD8+ muestran ningún cambio significativo en ninguna fase del ciclo celular evaluada en comparación a las células de los animales control (Fig. 3.9B-C).



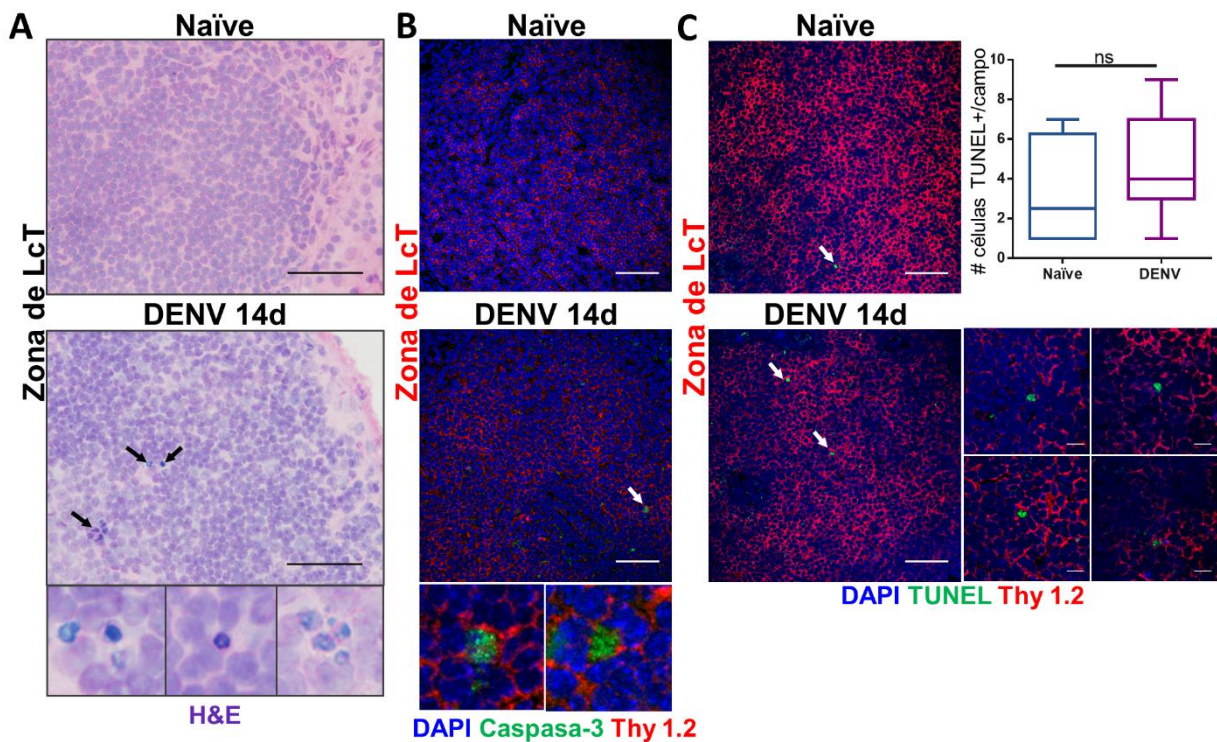


**Fig. 3. 9. DENV induce la entrada de los linfocitos B en fases activas del ciclo celular, pero los linfocitos T permanecen en fase quiescente.**

Suspensiones celulares de los DLNs se obtuvieron después de 16 días después de la inoculación cutánea con DENV, iDENV y PBS libre de endotoxina y se marcaron como en la Fig. x. Se realizó la permeabilización nuclear para la detección de la proteína Ki-67 y la tinción del DNA con Hoechst. Los diagramas de puntos de citometría de flujo muestran las diferentes fases del ciclo celular G0 (Ki-67-, 2n), G1 (Ki-67+, 2n), S (Ki-67+, 2n~4n) y G2-M (Ki-67+, 4n). n=cromosoma haploide. A Una mayor proporción de linfocitos B ingresan a fases activas del ciclo celular, G1, S y G2-M ante la inoculación cutánea con DENV a los 16 días p.i. Al mismo tiempo, la mayoría de los linfocitos T CD4+ (B) y T CD8+ (C) permanecen en fase quiescente (G0) y muy pocos en fase G1. Las gráficas de barras en cada subpoblación representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a los 16 días p.i cutánea de iDENV y de DENV. Dos experimentos independientes fueron agrupados y graficados. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni para la comparación múltiple, \* P <0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001 y \*\*\*\* P <0.001.

**Las células T de DLNs no parecen experimentar apoptosis tras la inoculación cutánea con el DENV**

Para evaluar si la falta de proliferación de células T es debido a que los linfocitos están experimentando apoptosis, analizamos criosecciones de DLNs de ratones infectados y de ratones control para buscar los característicos cuerpos apoptóticos. Encontramos algunos cuerpos apoptóticos en la zona de células T de ratones infectados con DENV, en comparación con los ratones control donde no se identificaron cuerpos apoptóticos (Fig. 3.10A). Para evaluar este fenómeno con un enfoque más específico, buscamos caspasa-3 activa *in situ*, una enzima clave en la ejecución de la apoptosis. Además, otro sello distintivo de la apoptosis es la fragmentación del DNA, el cual puede evidenciarse mediante el ensayo TUNEL. Por lo tanto, realizamos ambas técnicas en los DLNs de ratones control, así como en los infectados con DENV para buscar células apoptóticas en toda la paracorteza del ganglio (área Thy 1.2+). Encontramos muy pocos linfocitos T que expresan caspasa 3 activa durante la infección (Fig. 3.10B). Así mismo, se encontraron escasas células T apoptóticas TUNEL+ en la paracorteza de los DLNs de ratones infectados con DENV. En ambos casos, los porcentajes no mostraron diferencias estadísticamente significativas comparados con los ratones no infectados (Fig. 3.10C).



**Fig. 3. 10. Las células T no parecen experimentar apoptosis significativa después de la inoculación cutánea con DENV.**

Los DLNs regionales se congelaron después de los tratamientos correspondientes. A Criosecciones de los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las flechas negras en las imágenes, así como los aumentos, indican cuerpos apoptóticos. Barras de escala, 50  $\mu$ m. B Inmunofluorescencia en secciones de tejido para detectar caspasa-3 activa (verde) en el área paracortical (Thy 1.2, rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, azul). Los aumentos en la parte inferior muestran a las células T caspasa 3+ en tejido infectado con DENV. C Las flechas blancas y los aumentos a la derecha indican células T (Thy 1.2, rojo) con DNA fragmentado *in situ* (TUNEL+, verde). Barras de escala, 50  $\mu$ m y 10  $\mu$ m (en

aumentos mayores). El número de células apoptóticas después de la infección con DENV no fue significativamente diferente a las de los DLNs de ratones control inoculados con PBS. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba *t* de Student de dos colas no pareada.

## Discusión

Dado que uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo del dengue grave es la previa respuesta inmune contra el DENV y teniendo en cuenta que los linfocitos T y B son los responsables de la especificidad y la memoria del sistema inmune adaptativo, es concebible que pudieran estar implicados en la inmunopatología del DENV [13, 27, 28]. Sin embargo, su probable papel protector frente al patológico durante la enfermedad aún no se comprende completamente, especialmente con respecto a los linfocitos T [22, 23, 29]. Esto se debe en parte a que las células T específicas para el DENV representan una proporción muy baja de células circulantes durante la fase aguda (mediana 0.75%, media 2.3% [30]; sin respuesta, hasta 0.1% y 2.5% [6]; 0.02–2.5% [31]), cuando comienzan los síntomas severos. Por el contrario, se ha reportado que una forma diferenciada de células B, los plasmablastos, se encuentran incrementados hasta 1000 veces y que constituyen hasta el 30% del total de PBMCs, en algunos casos incluso imitando una leucemia de células plasmáticas durante la infección aguda con el DENV [32–34]. La mayoría de estos plasmablastos (70%) reconocen al DENV [32] y son de reacción cruzada contra otros serotipos [35], lo que revela la importante participación de las células B.

La mayor parte de las investigaciones realizadas en la infección con el DENV se ha realizado en células de sangre periférica de pacientes infectados, en este estudio nosotros evaluamos los ganglios linfáticos regionales (DLNs) como órganos linfoides cruciales, que han evolucionado para facilitar los posibles encuentros entre antígenos y linfocitos antígeno-específicos presentes en muy baja frecuencia [36]. Utilizando un modelo previamente establecido de infección cutánea con DENV en ratones inmunocompetentes [24], mediante el análisis *in situ*, así como por el análisis de células individuales, encontramos una respuesta proliferativa casi ausente de células T, tanto CD4+ como CD8+, ante la infección con el DENV (medida por la expresión de Ki-67). A este respecto, se ha documentado en pacientes una falta de expansión de células T, proliferación deteriorada, defectos en la producción de IFN- $\gamma$  y una subóptima desgranulación de células T en la fase aguda de la enfermedad, algunos reportes atribuyen la pobre respuesta de estas células a apoptosis [6, 31, 37]. Para explorar esta última posibilidad en nuestro modelo, evaluamos la muerte celular en DLNs mediante tres enfoques diferentes, pero no encontramos un aumento significativo en la proporción de células T apoptóticas ante la infección con el DENV en comparación con los controles no infectados, lo que sugiere que la apoptosis podría no ser el determinante principal en la aparente falta de respuesta de las células T.

De acuerdo al análisis del transcriptoma en células T de pacientes infectados con DENV, se ha reportado una desregulación de los genes relacionados a la señalización del TCR provocando una deteriorada producción de IFN- $\gamma$  por las células T así como de la expresión de CD69 de una manera dependiente del TCR [38]. Este hecho podría ser relevante para explicar la (casi) falta de respuesta de las células T en nuestro modelo, ya que nosotros tampoco observamos un incremento en la expresión de CD69 en las células T durante la infección con el DENV. Otros autores han demostrado *in vitro* una notable disminución de la proliferación de células T debido a defectos en células accesorias presentes en PBMCs (durante la enfermedad aguda por dengue), aparentemente relacionados con el bajo suministro de citocinas como IL-2 e IL-7 [39]. Siendo las células dendríticas (DCs) blanco de infección y de replicación por el DENV [40] quizá pudieran verse afectadas en su capacidad para activar a las células T naïve. Esto se ha confirmado *in vitro*, pero sólo en ciertas subpoblaciones de DCs o utilizando una muy alta multiplicidad de infección (MOI) [41, 42].

Existen otras posibilidades para explicar las respuestas casi ausentes de células T, por ejemplo, la falta de disponibilidad de antígeno *in vivo*, pero dado que hemos encontrado previamente la presencia de DENV en DCs en la paracorteza del DLN poco después de la inoculación cutánea del DENV marcado fluorescentemente, esta opción podría ser descartada [43]. Otra posibilidad es la sobreexpresión de moléculas inhibitoras tales como PD-1, LAG-3 y CTLA-4, de hecho, se han encontrado aumentadas tanto a nivel de proteína como en los transcriptomas de células T durante la infección con DENV [38]. Por otro lado, las moléculas co-estimuladoras en células dendríticas se han visto disminuidas después de la infección *in vitro* con DENV [42], todos estos eventos podrían afectar la óptima activación de células T por las células presentadoras de antígenos (APC). Como no observamos aumento en la proliferación ni en la activación de las células T CD4+ y T CD8+ después de la inoculación con el iDENV y el DENV, y dado que los linfocitos T no son un blanco de replicación del DENV [44], podemos inferir que la replicación de DENV no está desencadenando directamente la falta de respuesta de las células T.

Ciertos marcadores de activación en linfocitos han sido determinados o bien en PBMCs de pacientes con dengue o después de la estimulación *in vitro* con DENV, algunos incluso han sido considerados como predictivos de los casos graves, por ejemplo, CD69 [26, 38, 45]. Nosotros hemos encontrado un importante aumento de la expresión de CD69 en células B desde los 3 hasta los 23 días después de la infección cutánea con el DENV. En contraste, las células T sólo mostraron una mínima expresión de CD69 en comparación con las condiciones basales, y esta fue mucho menor cuando la comparamos con la sobreexpresión de CD69 por las células B. Se ha reportado también la desregulación de CCR7 en células T durante la infección con DENV [38] y junto con la baja expresión de CD69 que nosotros observamos,

podría sugerir que las células T podrían no estar siendo retenidas en los DLNs, ya que se sabe que CD69 participa previniendo que los linfocitos abandonen los ganglios linfáticos [46].

Notablemente, encontramos un gran aumento en el área ocupada por células B proliferantes dentro de los folículos, así como en el número de agrupados de Ki-67+ en folículos de los DLNs. Dado que la proporción de células B en la sangre de los pacientes con DENV es leve o no aumenta sustancialmente, existe la posibilidad de que las células B se retengan en los órganos linfoides [35, 47, 48]. La idea de la proliferación de células B en los órganos linfoides durante la infección natural está respaldada por el hecho de que se encuentran numerosos plasmablastos en la circulación de pacientes infectados con DENV [32, 35]. De acuerdo con la idea de la retención de linfocitos, nosotros encontramos CD69 altamente expresado en células B de DLNs. CD69 bloquea la salida de linfocitos de los ganglios linfáticos, presumiblemente permitiéndoles más tiempo para su diferenciación [46].

La gran proporción de células B experimentando activación y proliferación en los ganglios linfáticos sugiere una activación policlonal, BCR-independiente, del mismo modo que se ha reportado con otros virus [49]. El hecho de que las células B expresen y respondan a través de receptores innatos tales como TLRs (por ejemplo, un agonista del TLR-7 más IL-2 e IL-6 induce la proliferación en células B naïve y la producción de IgM e IgG *in vitro* [50]) lo cual apoya la idea de la activación policlonal, quizás en las primeras etapas. De hecho, la activación policlonal de células B inducida por el DENV y evidenciada por la producción de IgM e IL-6 se ha demostrado *in vitro*, aparentemente mediada por CD81 (un agente entrecruzador del CD19 y del BCR) [45]. Se han encontrado antígenos del DENV dentro de folículos en tejido linfóide humano (post mortem) [51], y nosotros encontramos al DENV marcado fluorescentemente dentro de folículos de células B en DLNs 1 h después de su inoculación en la piel [43], esto es indicativo de que los antígenos de DENV están disponibles para las células B.

En otro estudio, la baja proporción de hipermutación somática en los genes de los anticuerpos de pacientes durante la fase aguda de la infección DENV, condujo a los autores a proponer que las células B experimentan una activación “tipo innata” y una reacción extrafolicular en las etapas tempranas de la infección primaria [52]. Como previamente reportamos la generación de grandes GCs en los DLNs después de la infección cutánea con el DENV y ahora una tasa enorme de proliferación dentro de los folículos de células B, nos hace considerar más bien la posibilidad de que la maduración y/o diferenciación de las células B a través de la reacción de GC pudieran estar alteradas. Vale la pena mencionar que la compartimentalización clásica de los GCs en zona clara y zona oscura es indistinguible en este modelo de la infección con DENV, probablemente debido a la gran expansión de células B proliferantes dentro de los folículos tras la infección con el DENV. Es de destacar que junto

con la extensa proliferación de células B, encontramos numerosos TBMs conteniendo gran cantidad de células apoptóticas, presentes exclusivamente en el área de proliferación de células B (zona oscura). Esto fue detectado por histología y confirmado por el ensayo de TUNEL. Normalmente, la mayoría de TBMs (75%) habría de aparecer en la zona clara [53, 54]. De hecho, se ha reportado la presencia de TBMs en tejido linfoide humano en los casos de muerte por DENV [51].

En resumen, encontramos una temprana y fuerte activación y proliferación de células B en DLN, que se acompaña de un impresionante reclutamiento de TBMs dentro del GC después de la infección cutánea con el DENV, esto, y las respuestas muy pobres de células T observadas, correlacionan en cierta medida con los hallazgos en humanos infectados naturalmente. Creemos que estas observaciones contribuyen a comprender mejor la respuesta inmune fundamental desencadenada por el DENV. Estudios más detallados no sólo sobre la diferenciación de células B a través del estudio de la microanatomía del GC, sino también de la maduración de la afinidad, la selección y la producción de anticuerpos protectores y anticuerpos no neutralizantes y células de memoria, son de gran interés y adecuados para realizar en este modelo *in vivo*. Del mismo modo, la probable función de las células T en esta importante infección viral se puede evaluar simultáneamente.

## Referencias

- [1] WHO. Dengue and severe dengue. *WHO* 2019; 4.
- [2] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496: 504–507.
- [3] Dick OB, San Martín JL, Montoya RH, et al. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87: 584–593.
- [4] Rush B. *An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780*. Medical In. Philadelphia, PA: Prichard and Hall, [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Medical+Inquiries+and+Observations&author=AB+Rush&publication\\_year=1789&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Medical+Inquiries+and+Observations&author=AB+Rush&publication_year=1789&) (1789).
- [5] WHO. *Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020*. Geneva: WHO Press, <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Global+strategy+for+dengue+prevention+and+control#8> (2012).
- [6] Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, et al. T Cell Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: Are Cross-Reactive T Cells Suboptimal? *J Immunol* 2006; 176: 3821–

3829.

- [7] Arkin F. Dengue researcher faces charges in vaccine fiasco. *Science* (80- ) 2019; 364: 320.
- [8] Chatterjee P. Dengvaxia researcher charged. *Lancet Infect Dis* 2019; 19: 584–585.
- [9] Buddhari D, Aldstadt J, Endy TP, et al. Dengue Virus Neutralizing Antibody Levels Associated with Protection from Infection in Thai Cluster Studies. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: 1–10.
- [10] Sabin AB. Research on Dengue during World War II 1. *Am J Trop Med Hyg* 1952; 1: 30–50.
- [11] Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 2004; 113: 946–951.
- [12] Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: A prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand: I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 653–669.
- [13] Burke DS, Scott RM, Johnson DE, et al. A Prospective Study of Dengue Infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 172–180.
- [14] Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* 1970; 42: 350–62.
- [15] Halstead SB, O'Rourke EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* 1977; 265: 739–741.
- [16] Slütter B, Pewe LL, Kaech SM, et al. Lung airway-surveilling CXCR3hi Memory CD8+ T cells are critical for protection against influenza A virus. *Immunity* 2013; 39: 939–948.
- [17] Ndhlovu ZM, Kanya P, Mewalal N, et al. Magnitude and Kinetics of CD8+ T Cell Activation during Hyperacute HIV Infection Impact Viral Set Point. *Immunity* 2015; 43: 591–604.
- [18] Yap KL, Ada GL, McKenzie IFC. Transfer of specific cytotoxic T lymphocytes protects mice inoculated with influenza virus. *Nature* 1978; 273: 238–239.
- [19] Cannon MJ, Stott EJ, Taylor G, et al. Clearance of persistent respiratory syncytial virus infections in immunodeficient mice following transfer of primed T cells. *Immunology* 1987; 62: 133–8.
- [20] Channappanavar R, Fett C, Zhao J, et al. Virus-Specific Memory CD8 T Cells Provide

- Substantial Protection from Lethal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J Virol* 2014; 88: 11034–11044.
- [21] Taylor PM, Askonas BA. Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. *Immunology* 1986; 58: 417–420.
- [22] Rivino L. T cell immunity to dengue virus and implications for vaccine design. *Expert Rev Vaccines* 2016; 15: 443–453.
- [23] Malavige GN, Ogg GS. T cell responses in dengue viral infections. *J Clin Virol* 2013; 58: 605–611.
- [24] Yam-Puc JC, García-Cordero J, Calderón-Amador J, et al. Germinal Center Reaction Following Cutaneous Dengue Virus Infection in Immune-Competent Mice. *Front Immunol* 2015; 6: 1–9.
- [25] Hor JL, Whitney PG, Zaid A, et al. Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4+ and CD8+ T Cell Activation to Localized Viral Infection. *Immunity* 2015; 43: 554–565.
- [26] Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, et al. Early CD69 Expression on Peripheral Blood Lymphocytes from Children with Dengue Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 1999; 180: 1429–1435.
- [27] Graham RR, Juffrie M, Tan R, et al. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. Studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 412–419.
- [28] Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: A prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 40–51.
- [29] Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 745–759.
- [30] Friberg H, Bashyam H, Toyosaki-Maeda T, et al. Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans. *Sci Rep* 2011; 1: 1–9.
- [31] Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003; 9: 921–927.
- [32] Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, et al. Rapid and Massive Virus-Specific



- Plasmablast Responses during Acute Dengue Virus Infection in Humans. *J Virol* 2012; 86: 2911–2918.
- [33] Gawoski JM, Ooi WW. Dengue fever mimicking plasma cell leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1026–7.
- [34] Balakrishnan T, Bela-Ong DB, Toh YX, et al. Dengue Virus Activates Polyreactive, Natural IgG B Cells after Primary and Secondary Infection. *PLoS One* 2011; 6: e29430.
- [35] Garcia-Bates TM, Cordeiro MT, Nascimento EJM, et al. Association between Magnitude of the Virus-Specific Plasmablast Response and Disease Severity in Dengue Patients. *J Immunol* 2013; 190: 80–87.
- [36] Flajnik MF. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 438–453.
- [37] Dung NTP, Duyen HT Le, Thuy NT Van, et al. Timing of CD8 + T Cell Responses in Relation to Commencement of Capillary Leakage in Children with Dengue. *J Immunol* 2010; 184: 7281–7287.
- [38] Chandele A, Sewatanon J, Gunisetty S, et al. Characterization of Human CD8 T Cell Responses in Dengue Virus-Infected Patients from India. *J Virol* 2016; 90: 11259–11278.
- [39] Mathew A, Kurane I, Green S, et al. Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. *J Immunol* 1999; 162: 5609–15.
- [40] Wu S-JJ, Grouard-Vogel G, Sun W, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 2000; 6: 816–20.
- [41] Cerny D, Haniffa M, Shin A, et al. Selective Susceptibility of Human Skin Antigen Presenting Cells to Productive Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004548.
- [42] Nightingale ZD, Patkar C, Rothman AL. Viral replication and paracrine effects result in distinct, functional responses of dendritic cells following infection with dengue 2 virus. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 1028–1038.
- [43] Marcial-Juárez E, Yam-Puc JC, Cedillo-Barrón L, et al. Travelling with Dengue: From the Skin to the Nodes. In: Aparecida Sperança M (ed) *Dengue - Immunopathology and Control Strategies*. London, UK: IntechOpen Limited, pp. 27–42.
- [44] Blackley S, Kou Z, Chen H, et al. Primary Human Splenic Macrophages, but Not T or B Cells, Are the Principal Target Cells for Dengue Virus Infection In Vitro. *J Virol* 2007; 81: 13325–13334.

- 
- [45] Correa ARV, Berbel ACER, Papa MP, et al. Dengue virus directly stimulates Polyclonal B cell activation. *PLoS One* 2015; 10: 1–20.
- [46] Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075011.
- [47] Nivarthi UK, Tu HA, Delacruz MJ, et al. Longitudinal analysis of acute and convalescent B cell responses in a human primary dengue serotype 2 infection model. *EBioMedicine* 2019; 41: 465–478.
- [48] Jampangern W, Vongthoung K, Jittmittraphap A, et al. Characterization of atypical lymphocytes and immunophenotypes of lymphocytes in patients with dengue virus infection. *Asian Pacific J allergy Immunol* 2007; 25: 27–36.
- [49] Jellison ER, Guay HM, Szomolanyi-Tsuda E, et al. Dynamics and magnitude of virus-induced polyclonal B cell activation mediated by BCR-independent presentation of viral antigen. *Eur J Immunol* 2007; 37: 119–128.
- [50] Glaum MC, Narula S, Song D, et al. Toll-like receptor 7-induced naive human B-cell differentiation and immunoglobulin production. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 224–230.e4.
- [51] Aye KS, Charngkaew K, Win N, et al. Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. *Hum Pathol* 2014; 45: 1221–1233.
- [52] Godoy-Lozano EE, Téllez-Sosa J, Sánchez-González G, 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.
- [53] Hardie DL, Johnson GD, Khan M, et al. Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments within germinal centers. *Eur J Immunol* 1993; 23: 997–1004.
- [54] MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 117–139.
- [55] Flemming W. Studien über Regeneration der Gewebe. *Arch mikr Anat* 1885; 24: 50–91.

---

## CAPÍTULO 4

### Remodelación de las poblaciones estromales de ganglios linfáticos ante la infección cutánea con el virus Dengue

#### Resumen

Los ganglios linfáticos (LNs) son órganos altamente especializados en la generación de respuestas inmunes adaptativas. Para ello es indispensable el encuentro entre células del sistema inmune y microorganismos que han traspasado las barreras físicas como la piel y mucosas. Las células fibroblásticas reticulares (FRCs) forman un sistema de conductos para la distribución intranodal de antígenos pequeños y constituyen el andamiaje para el tráfico de linfocitos y células dendríticas. Las células endoteliales forman vasos linfáticos por donde se distribuyen antígenos solubles y células dendríticas migratorias. Los vasos sanguíneos permiten la entrada de linfocitos naïve desde la circulación sanguínea hasta el parénquima de los LNs a través de las vénulas del endotelio alto (HEVs). Nos propusimos estudiar el posible remodelamiento que las células estromales y endoteliales experimentan ante la infección cutánea con el virus dengue (DENV). Encontramos una expansión importante de la red de células dendríticas foliculares ocupando toda el área de los centros germinales, sin la clásica compartimentalización en zona clara y oscura. La vasculatura linfática se encontró extendida principalmente en la zona medular del LN manteniéndose así hasta tiempos tardíos p.i., esto provocó una mayor distribución de antígenos solubles vía linfática. Las FRCs desregularon la expresión del marcador reticular ER-TR-7, sin embargo, la compartimentalización de las áreas foliculares y paracorticales, así como la producción de la quimiocina CCL21 y el andamiaje para el tráfico de células acarreadoras de antígenos particulados grandes se mantuvo intacta. La vasculatura sanguínea también sufrió un expansión del árbol vascular con el incremento en el número de vasos sanguíneos, por lo tanto, mayor cantidad de azul de Evans fue retenido en los LNs de ratones infectados con DENV. Cabe destacar que se encontró hemorragia en LNs de ratones infectados con DENV 10 días p.i., esto se evidenció con la presencia abundante de eritrocitos en el parénquima del LN, fuera de los vasos sanguíneos donde normalmente se localizan en ratones no infectados. La remodelación de las células estromales observada en LNs nos ayuda a comprender mejor la respuesta inmune inducida por el DENV de una manera integral. Así también, este modelo de infección *in vivo* nos permitiría indagar en detalle en el mecanismo de inducción de hemorragia que aún permanece sin ser revelado.

**Palabras clave:** Virus dengue (DENV), células dendríticas foliculares (FDCs), células fibroblásticas reticulares (FRCs), células del endotelio linfático (LECs), células del endotelio sanguíneo (BECs), microarquitectura, ganglios linfáticos

## Introducción

Organismos especializados tales como mamíferos vertebrados poseen un repertorio enormemente diverso de receptores de linfocitos T (*T cell receptor; TCR*) y linfocitos B (*B cell receptor; BCR*) capaces de reconocer una gran variedad de antígenos durante el trascurso de la vida [1]. Los órganos linfoides secundarios (SLOs) han emergido evolutivamente para facilitar y proveer el sitio de encuentro entre escasas clonas y sus respectivos antígenos [2]. Además, los SLOs también constituyen un nicho donde procesos altamente especializados se llevan a cabo, tales como generación de células secretoras de anticuerpos (de alta afinidad idealmente), células de memoria y de células T efectoras.

Los ganglios linfáticos (LNs) colectan la linfa conteniendo potenciales patógenos desde tejidos periféricos como la piel y mucosas, mediante vasos linfáticos. De acuerdo con el tamaño de los antígenos, estos se distribuyen a través del seno subcapsular (SCS), la médula y/o finos conductos dentro de los LNs [3]. Las células fibroblásticas reticulares (FRCs) envuelven fibras de colágeno, formando así los conductos que permiten la llegada de pequeñas moléculas desde el SCS hasta la paracorteza, donde las células dendríticas (DCs) asociadas al sistema de conductos de FRCs capturan estos antígenos [4]. La parte externa del conducto dirige la migración de linfocitos que ingresan desde la sangre a través de las vénulas del endotelio alto (HEV) delineadas por células del endotelio sanguíneo (BECs). Los antígenos más grandes se transportan desde el SCS hasta los senos medulares mediante vasos linfáticos formados por células del endotelio linfático (LECs). Todos los componentes tanto de origen hematopoyético como estromal son indispensables para propiciar respuestas inmunes eficientes.

Poco se sabe hasta el momento del impacto que los microorganismos pudieran tener sobre la microarquitectura de los LNs y como esto pudiera poner en riesgo la inmunocompetencia del individuo. Por ejemplo, se ha reportado que el virus de la coriomeningitis linfocítica infecta las FRCs, desorganiza la microarquitectura y daña la distribución de antígenos a través de conductos [5]. Por otra parte, se ha demostrado que las células estromales se pierden progresivamente durante la infección con *leishmania donovani* [6]. Y el citomegalovirus tiene como blanco de infección a células estromales de bazo [7].

Previamente demostramos la generación de centros germinales (GCs) PNA<sup>+</sup> en ganglios linfáticos drenantes (DLNs) ante la infección cutánea con DENV. Ahora nos enfocamos en describir los cambios morfológicos y funcionales en las células estromales de los LNs que se inducen por la infección cutánea con el virus dengue (DENV). Encontramos una importante expansión de la red de células dendríticas foliculares (FDCs) ocupando todo el CG. Las FRCs disminuyen la expresión del marcador reticular ER-TR-7 y tanto la red vascular linfática

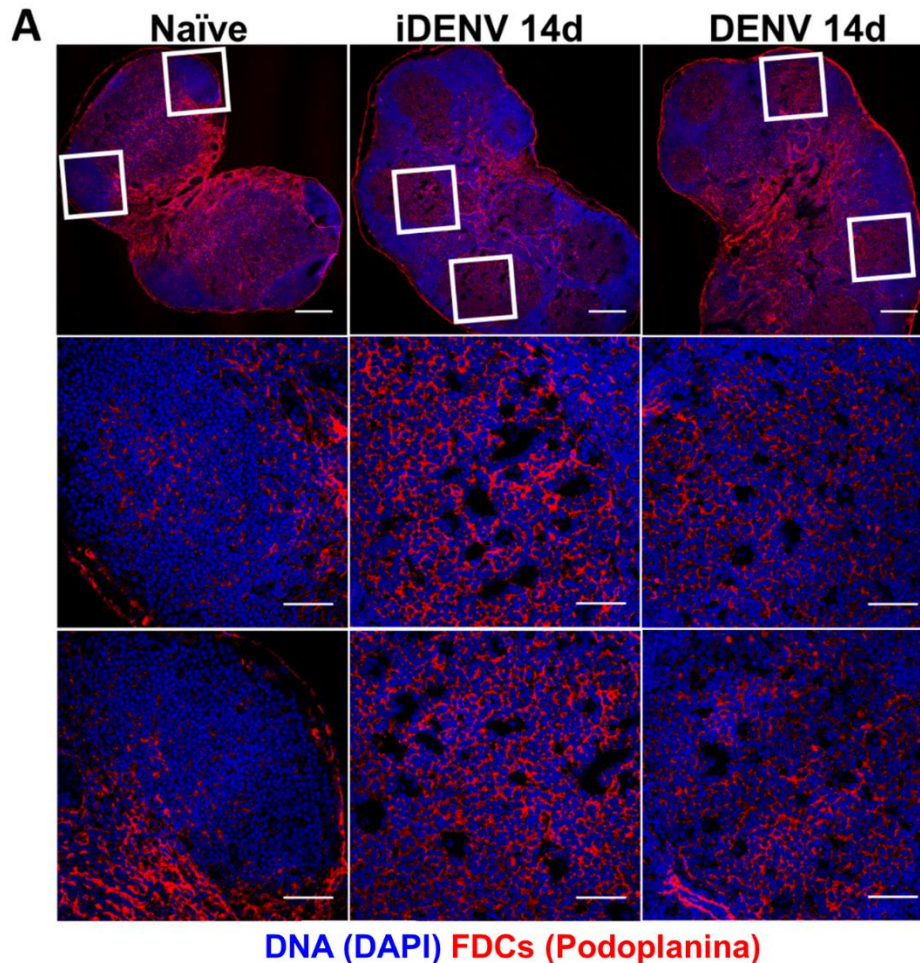
---

como sanguínea se expanden notablemente hasta tiempos tardíos post infección con el DENV. La morfología de las LECs y las BECs se observa alterada y se encontró hemorragia *in situ* en los LNs.

## Resultados

### La red de FDCs se expande en los GCs inducidos por la inoculación cutánea con el DENV

Las FDCs son un componente indispensable para la organización de los folículos y los GCs en SLO [8]. Dado que observamos que las células proliferantes (zona oscura) ocupaban toda el área del GCs, quisimos evaluar la presencia de FDCs quienes normalmente definen la zona clara del GC. Criosecciones de DLNs de ratones sanos e inmunizados con DENV se tiñeron con Podoplanina, una molécula altamente expresada en células estromales de SLO y dentro de folículos, define a las FDCs. Encontramos que las FDCs en folículos de ratones inmunizados con el DENV y con el iDENV se presentaron altamente expandidas y con mayor intensidad de fluorescencia. Las FDCs forman una red amplia que ocupa toda el área de los GCs comparada con los ratones no infectados donde la red de FDCs es muy discreta. Por lo tanto, los GCs en DLNs no muestran la clásica compartimentalización (zona clara y oscura) bajo la inoculación con el DENV. Esto se demuestra tanto por la proliferación (zona oscura, Fig. 3.) como por la distribución de FDCs (zona clara, Fig. 4.1A).



**Fig. 4. 1** Las FDCs se expanden en los folículos de los DLNs debido a la inoculación cutánea con DENV.

Las FDCs se expanden en los folículos de los DLNs debido a la inoculación cutánea con DENV. Los ratones se infectaron cutáneamente con  $6 \times 10^4$  PFU de DENV en la región inguinal y se retaron al día 7. Criosecciones de DLNs fueron marcadas para determinar la presencia de FDCs (Podoplanina+, rojo) en folículos de linfocitos B y los núcleos (DAPI, azul). **A** Los paneles superiores representan imágenes panorámicas de DLNs de ratones no infectados (ratones inoculados con PBS libre de endotoxina) y de ratones inoculados con iDENV y DENV y analizados 14 días p.i. Los paneles inferiores ilustran aumentos de las regiones foliculares indicadas. El DENV indujo una expansión de las FDCs, en comparación con los ratones no infectados, las cuales ocuparon toda el área de los GCs a los 14 días p.i. Los folículos de linfocitos B de ratones control contienen escasas células Podoplanina+. Barras de escala en paneles superiores, 200  $\mu\text{m}$  y en paneles medio e inferior, 50  $\mu\text{m}$ . Los datos son representativos de dos experimentos independientes con 3 DLNs.

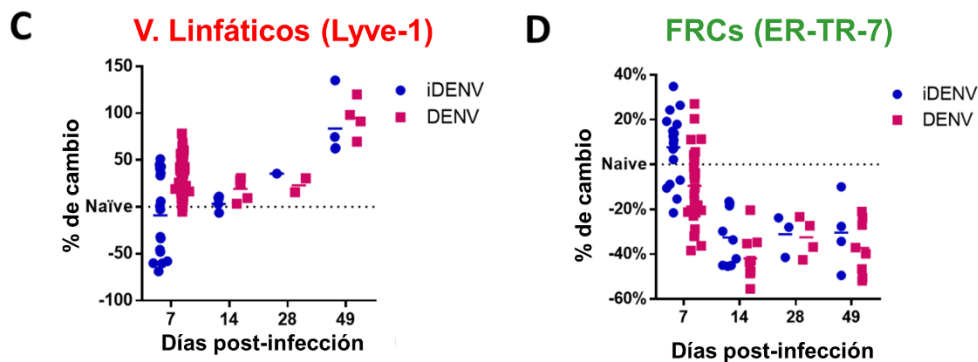
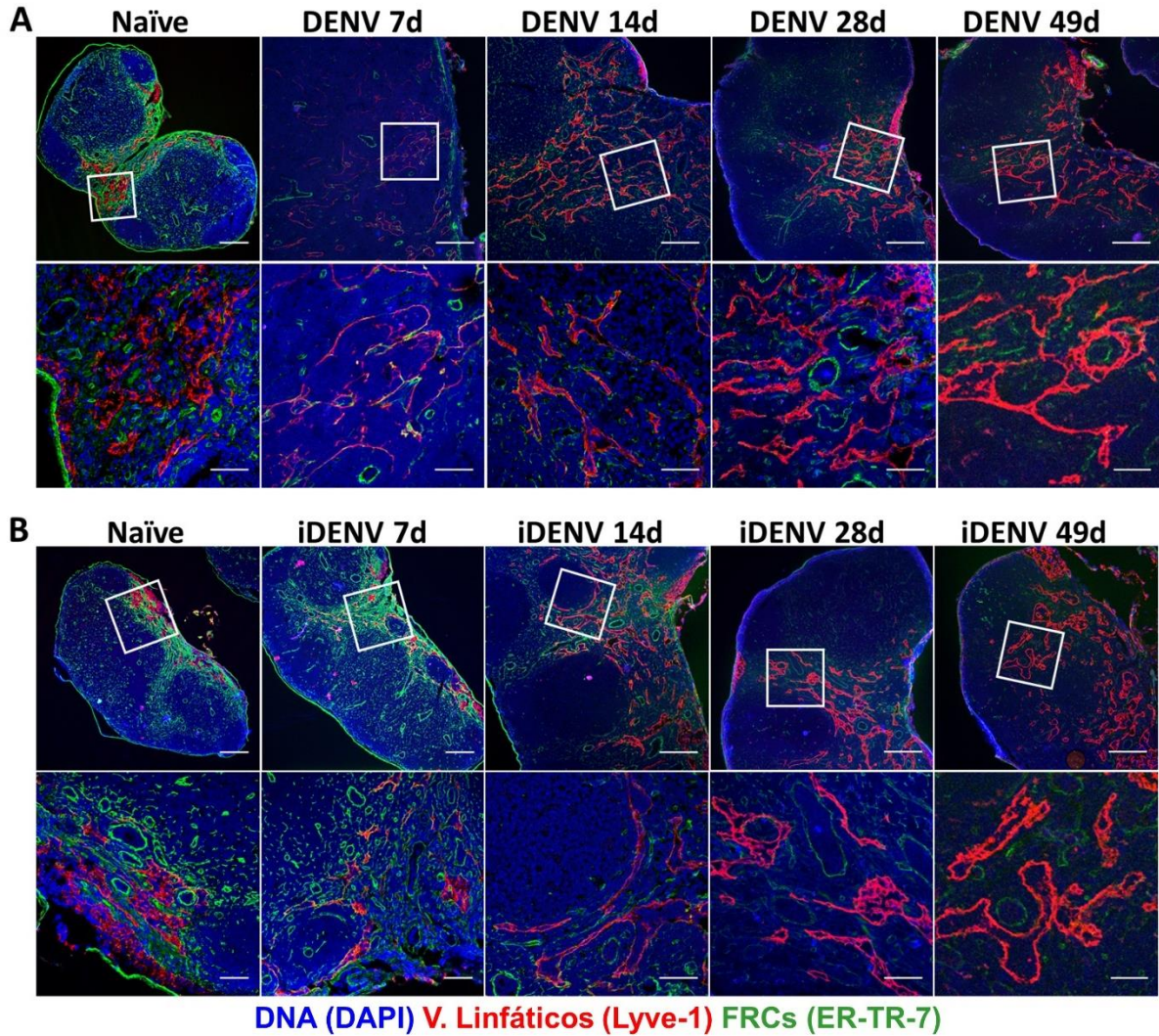
### **El DENV induce la expansión de la vasculatura linfática en la zona medular de los DLNs que perdura hasta tiempos tardíos**

Las LECs forman los vasos y senos linfáticos en LNs, nosotros quisimos evaluar los posibles cambios que el DENV induce en la vasculatura linfática desde tiempos tempranos (7 días) hasta tardíos (49 días) después de la infección cutánea. Para ello, teñimos criosecciones de DLNs con Lyve-1 (Receptor 1 de hialuronano endotelial del vaso linfático, *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) para identificar las LECs al mismo tiempo que evaluamos la estructura de las FRCs mediante la expresión de ER-TR-7 (*Erasmus University Rotterdam* -

---

*thymic reticulum antibody 7*). Observamos que después de 7 días de la infección con el DENV, las LECs se observaron alteradas morfológicamente, ya que se presentaron vasos filamentosos, delgados y distribuidos por el parénquima del DLN, mientras que en condiciones basales, estos se localizan restringidos a la médula de los LNs (Fig. 4.2A). La organización de las FRCs también se observó alterada en comparación a los DLNs control, con la desregulación en la expresión de ER-TR-7 (Fig. 4.2A y D). La densidad de la vasculatura linfática se observó notablemente aumentada en la médula de los DLNs y la intensidad de expresión de Lyve-1 en comparación a la expresión basal, también aumentó con el tiempo, desde los 7 días hasta tiempos tardíos después de la infección (Fig. 4.2A y C). Al mismo tiempo, la intensidad media de fluorescencia de ER-TR-7 disminuye respecto al basal. El iDENV también induce un efecto similar tanto en vasos linfáticos como en FRCs desde los 14 días p.i. cutánea (Fig. 4.2B). Esta expansión vascular, sugiere que el DENV podría estar induciendo linfangiogénesis en LNs.





**Fig. 4. 2. Vasos linfáticos en DLNs de ratones inmunizados con DENV.**

Los ratones se infectaron cutáneamente como en Fig. 4.1. Criosecciones de DLNs se marcaron fluorescentemente para determinar la distribución y morfología de las LECs (Lyve-1, rojo), FRCs (ER-TR-7, verde) y núcleos (DAPI, azul). **A** Los paneles superiores representan imágenes panorámicas de DLNs de ratones no infectados (ratones inoculados con PBS libre de endotoxina) y de ratones inoculados con DENV, analizados al día 7, 14, 28 y 49 después de la inoculación cutánea. Los paneles inferiores ilustran aumentos de las regiones medulares indicadas. El DENV induce una alteración en la morfología de las LECs al día 7 y a los 14, 28 y 49 días la vasculatura linfática se observa expandida. **C** La intensidad media de



fluorescencia de Lyve-1 incrementa con el tiempo respecto a la de los DLNs de ratones no infectados. **A y D** La red de FRCs disminuye la expresión del marcador ER-TR-7 desde el día 7 y hasta tiempos tardíos de la infección. **B** Se muestran criosecciones de DLNs de ratones inoculados con iDENV a los 7, 14, 28 y 49 días y de ratones no infectados. Los vasos linfáticos se encuentran expandidos desde los 14 hasta los 49 días y las FRCs muestran alterada la expresión de ER-TR-7. Barras de escala en paneles superiores, 200  $\mu\text{m}$  y en paneles inferiores, 50  $\mu\text{m}$ . Los datos son representativos de dos experimentos independientes con 5 DLNs.

### Antígenos solubles se distribuyen en mayor cantidad por la vasculatura linfática expandida en DLNs de ratones infectados con DENV

Para evaluar la integridad de los vasos linfáticos en DLNs de ratones infectados con DENV, inoculamos vía cutánea un antígeno soluble de bajo peso molecular (~45,000 daltons), en ratones previamente inmunizados con DENV (Fig. 4.3A). Encontramos que la OVA se distribuye rápidamente por el seno subcapsular y medular de los LNs, tanto en ratones sanos como en los que fueron infectados con el DENV. Sin embargo, dada la expansión de la vasculatura linfática y eventualmente el agrandamiento de los senos medulares, la OVA se distribuyó en mayor cantidad por los vasos linfáticos de los DLNs de ratones infectados (Fig. 4.3B). Esto se evidenció por la co-localización de la OVA con el marcaje para Lyve-1 y la mayor intensidad media de fluorescencia de la OVA presente en ratones infectados (Figura 4.3C). También quisimos determinar si la expansión de las LECs estaba dada por un efecto directo del virus sobre estas células. Por lo tanto, infectamos *in vitro* células adherentes de DLNs, y buscamos la expresión de la proteína no estructural de DENV, NS5 en células CD31 (LECs y BECs). Observamos una tasa de infección baja, y las células NS5+ no fueron positivas para CD31, sugiriendo que tanto las LECs como las BECs, no son susceptibles de infección por el DENV (Figura 4.3D).

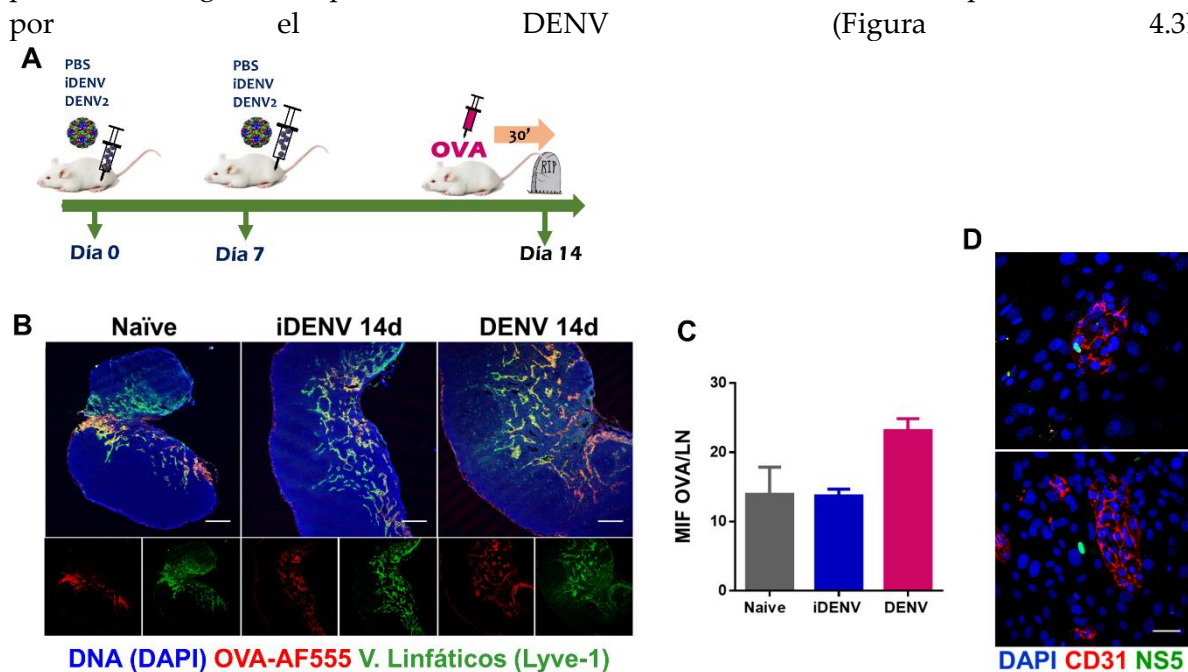


Fig. 4. 3. Distribución de antígenos solubles por vasos linfáticos después de la infección cutánea con DENV.

Distribución de antígenos solubles por vasos linfáticos después de la infección cutánea con DENV. **A** Los ratones se infectaron cutáneamente como en Fig. 4.1 durante 14 días y posteriormente se inocularon con 5  $\mu$ g de OVA-AF555 15 min antes del sacrificio. Se obtuvieron criosecciones de DLNs que se marcaron para la identificación de LECs (Lyve-1, verde) y núcleos (DAPI, azul). **B** Los paneles superiores representan imágenes panorámicas de DLNs de ratones no infectados (ratones inoculados con PBS libre de endotoxina) y de ratones inmunizados con iDENV y DENV y posteriormente inoculados con OVA-AF555 al día 14 p.i. Los paneles inferiores ilustran los marcajes separados (canales individuales) en cada condición. La OVA-AF555 se distribuye exclusivamente por vasos linfáticos de los DLNs en todas las condiciones analizadas, pero en mayor cantidad en la vasculatura expandida de los ratones infectados con DENV. Barras de escala, 200  $\mu$ m. **C** Se cuantificó la intensidad media de fluorescencia (MFI) por DLN de la OVA-AF555 en las tres condiciones experimentales, con una mayor intensidad en animales infectados. **D** Se obtuvo una suspensión celular de un pool de LNs de ratones sin tratamiento previo y después de 24h se infectaron (5 MOI) las células adherentes del cultivo. Se identificaron células infectadas (NS5) y células endoteliales (CD31). Aparentemente las células CD31 no son susceptibles de infección por el DENV. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

### **La remodelación en la estructura de las FRCs no impacta en la secreción de CCL21 ni en la distribución de antígenos por conductos.**

Dado que la red de FRCs se encontró desorganizada después de la infección con DENV, quisimos evaluar si estos cambios impactan a nivel funcional, tanto en la secreción de la quimiocina CCL21, como en la integridad de los conductos de FRCs. Por lo tanto, evaluamos la expresión de CCL21 en criocortes de DLNs, después de 14 días de la infección cutánea con DENV. Encontramos que en DLNs de ratones infectados incrementa el marcaje para CCL21 en comparación al control sin infectar (Fig. 4.4A). Lo cual se evidenció también en el análisis semicuantitativo de la intensidad media de fluorescencia de CCL21 (Fig. 4.4B).

Por otra parte, para evaluar el transporte de antígenos pequeños y solubles mediante los conductos de FRCs, inoculamos una solución de FITC (389.38 Da) en ratones inmunizados previamente con DENV. La solución de FITC se distribuyó rápidamente en el DLN y se localizó en el seno subcapsular y medular principalmente y a través de los finos conductos que se aprecian por debajo del seno subcapsular en todas las condiciones evaluadas (Fig. 4.4C). La cuantificación *in situ* de la intensidad media de fluorescencia, no muestra cambios de la intensidad de fluorescencia en los ratones infectados o inmunizados con iDENV respecto a los animales no infectados (Fig. 4.4D).

Se ha reportado que las células migratorias utilizan como andamiaje para su movimiento dentro del LN, la parte externa de los conductos que están recubiertos por FRCs. Finalmente, nos propusimos evaluar la distribución de antígenos grandes particulados (microesferas de látex de 1  $\mu$ m de diámetro) dentro del DLN. Inoculamos vía cutánea las partículas en ratones infectados y no infectados y evaluamos su localización dentro del ganglio 48 horas p.i. de dichas partículas. En ratones control, las partículas se localizaron principalmente en la zona de linfocitos T (TCZ), en pequeños grumos. Sin embargo, en los ratones inmunizados con iDENV y DENV las partículas se localizaron tanto en la TCZ como en las regiones interfoliculares del DLN y en grupos más grandes sugiriendo que las partículas podrían estar llegando acarreadas por células dendríticas. También pudimos observar dichas partículas en el seno subcapsular, lo que podría indicar que también llegan libres por vía linfática y probablemente son capturadas por macrófagos del seno subcapsular (Fig. 4.4E). La cuantificación por zonas muestra que hay mayor arribo de células cargadas con microesferas en ratones previamente infectados con DENV y en los inoculados con iDENV (Fig. 4.4F).

---

Cabe mencionar que en DLNs que muestran una mayor desorganización estructural y no se definen claramente los folículos, se localizaron menos partículas en el parénquima del DLN (tercer panel, Fig. 4.4E).

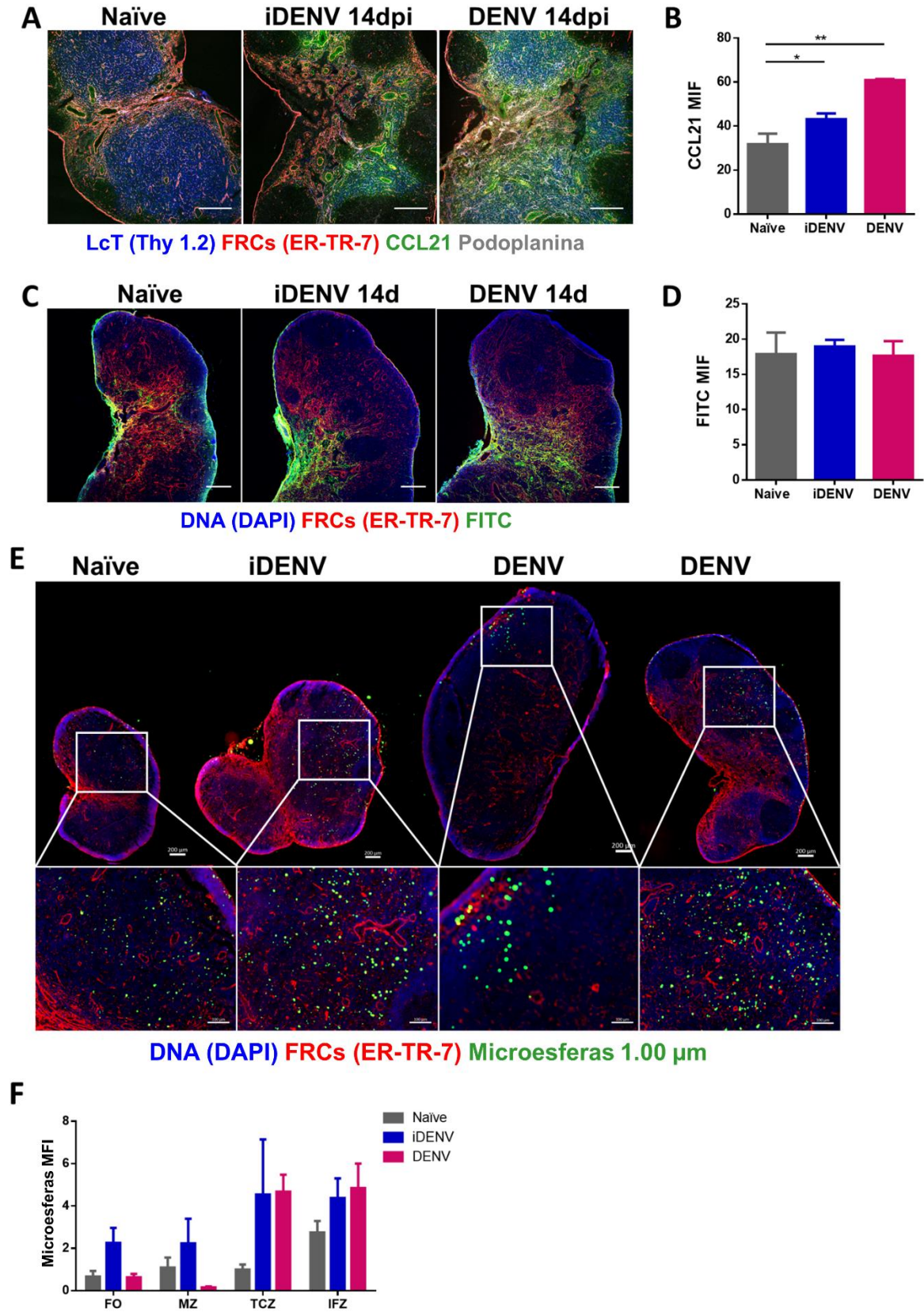


Fig. 4. 4. Evaluación de la secreción de CCL21 in situ y la integridad de los conductos de FRCs.

**A** Los ratones se infectaron cutáneamente como en Fig. 4.1 durante 14 días. Se obtuvieron criosecciones de DLNs que se marcaron para la identificación de células T (Thy 1.2, azul), FRCs (ER-TR-7 [rojo] y Podoplanina [gris]) y CCL21 (verde). Observamos que la producción de CCL21 (verde) por células FRCs se incrementa significativamente por la inmunización con iDENV y DENV a los 14 días p.i. Barras de escala, 200  $\mu\text{m}$ . **B** La gráfica muestra un incremento significativo en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CCL21 en los DLNs de los ratones inmunizados con iDENV y DENV comparado con los DLNs de los ratones sin infectar. **C** Los ratones se infectaron como en Fig. X y se inocularon vía cutánea con una solución saturada de FITC 1 hora antes de su sacrificio. Se obtuvieron criosecciones de DLNs y se tiñeron con ER-TR-7 para identificar la red de FRCs y con DAPI para teñir los núcleos. Observamos que el FITC se distribuye por el seno subcapsular y medular del DLN y por debajo del seno subcapsular en finos conductos con un patrón similar en todas las condiciones analizadas. **D** La intensidad media (MFI) de FITC en ratones inmunizados con DENV no es diferente de la encontrada en DLNs de ratones control. **E** Los ratones se inocularon al día 0 con DENV, iDENV o PBS, el día 12 se inocularon con  $\approx 5.4 \times 10^6$  microesferas fluorescentes de  $1 \mu\text{m}$  vía cutánea y se sacrificaron al día 14 p.i. de DENV. Se obtuvieron criosecciones que se tiñeron para identificar FRCs (ER-TR-7) y núcleos (DAPI). Las microesferas se distribuyen en mayor cantidad en ratones inmunizados con iDENV y DENV en comparación con el control. Algunos DLNs con aparente mayor alteración en la red de FRCs (tercer panel) contiene pocas microesferas. Los paneles inferiores muestran magnificaciones de las áreas señaladas. **F** Se cuantificó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las microesferas fluorescentes en los diferentes compartimentos del DLNs, folículos (FO), zona medular (MZ), zona de linfocitos T (TCZ) y zona interfolicular (IFZ). Las microesferas se alojan preferentemente en la zona IFZ y en la TCZ en todas las condiciones, pero una mayor cantidad de microesferas están presentes en ratones inmunizados con el iDENV y DENV. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

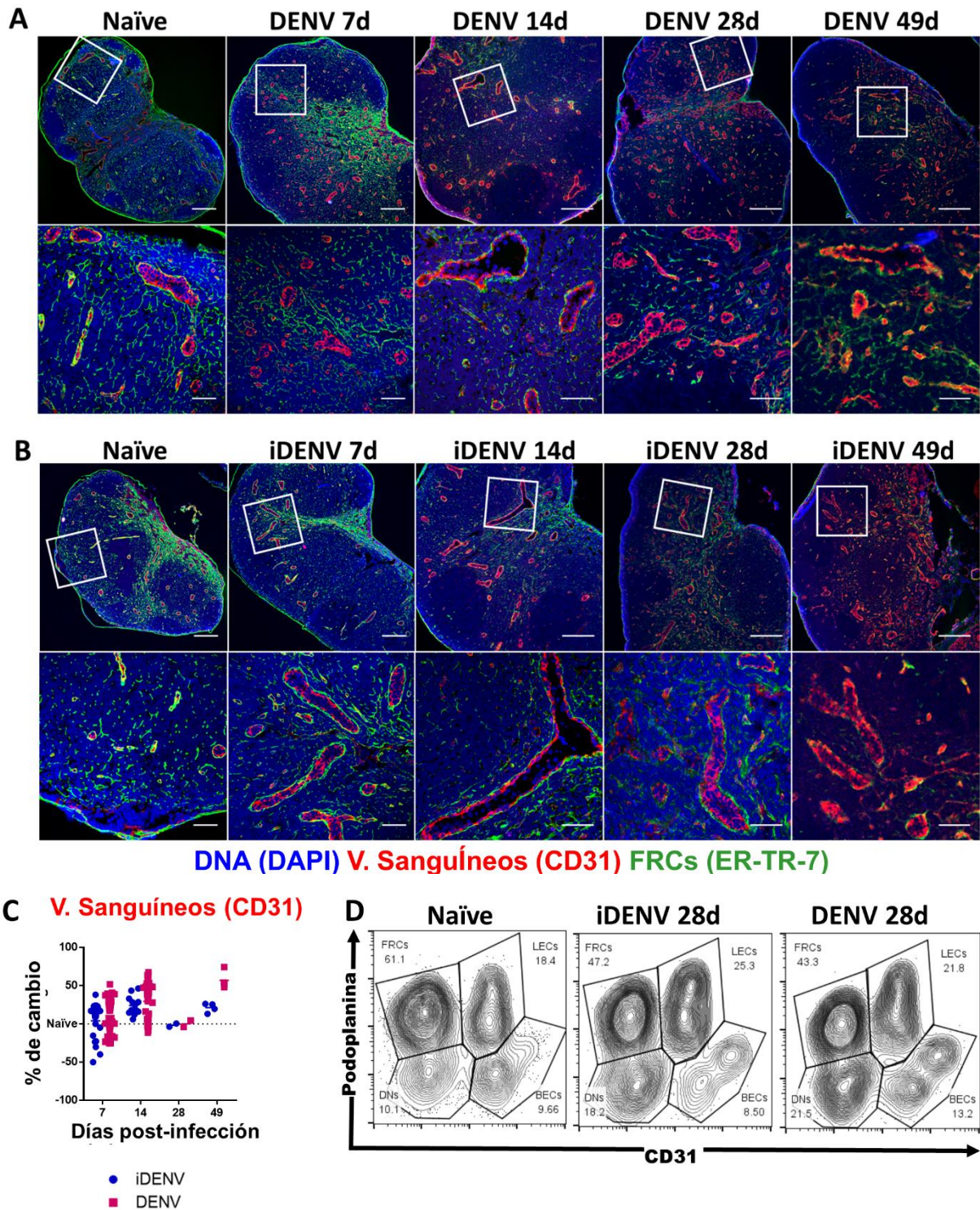
## El DENV induce un remodelamiento y un aumento en la vascularización sanguínea en DLNs

Debido a que en los casos severos de DENV se presentan manifestaciones hemorrágicas, quisimos evaluar la morfología y la distribución de los vasos sanguíneos formados por las BECs en LNs. Marcamos fluorescentemente los vasos sanguíneos (CD31) en criocortes de DLNs de ratones sanos e infectados con DENV después de 7, 14, 28 y 49 días p.i. Encontramos que en comparación con los vasos sanguíneos de los ratones control, los capilares encontrados en los DLNs de ratones infectados se presentaron muy expandidos, y las FRC perivasculares que en condiciones basales les brindan soporte a los vasos estuvieron ausentes a los 7 días p.i. de DENV. Las BECs se apreciaron alteradas morfológicamente a los 14 días en comparación al control (Fig. 4.5A, véase a mayor aumento). También observamos, un mayor número de capilares vasculares en su clásica forma anular a los 14, 28 días y se mantienen incrementados hasta después de 7 semanas de la infección en comparación al control (Fig. 4.5A). Como se mencionó anteriormente, la red de FRCs aparentemente desregula la expresión de ER-TR-7 en condiciones de infección (Fig. 4.5A). El DENV sin la capacidad replicante también indujo la expansión de la vasculatura sanguínea en DLNs a tiempos tardíos p.i., pero no indujo las alteraciones morfológicas encontradas con el DENV (Fig. 4.5B). La intensidad media de fluorescencia en la expresión de CD31 aumento respecto al control principalmente desde los 14 días en adelante (Fig. 4.5C). Evaluamos mediante citometría de flujo, las poblaciones estromales del ganglio linfático (CD45-) mediante la expresión de Podoplanina y CD31. Correspondiente con el análisis *in situ*, encontramos la proporción de BECs incrementada a los 28 días p.i. interesantemente se pueden distinguir dos poblaciones con diferente expresión de CD31 en ratones inmunizados con iDENV y

---

DENV en comparación al control donde la población de BECs es más homogénea. Al mismo tiempo, se encontró la proporción de LECs incrementada en ratones inoculados con DENV en comparación a los ratones no infectados. La proporción de FRCs disminuyó en ratones inmunizados en comparación con los ratones sanos (Fig. 4.5D).





**Fig. 4. 5. Remodelamiento en la vasculatura sanguínea inducida por el DENV.**

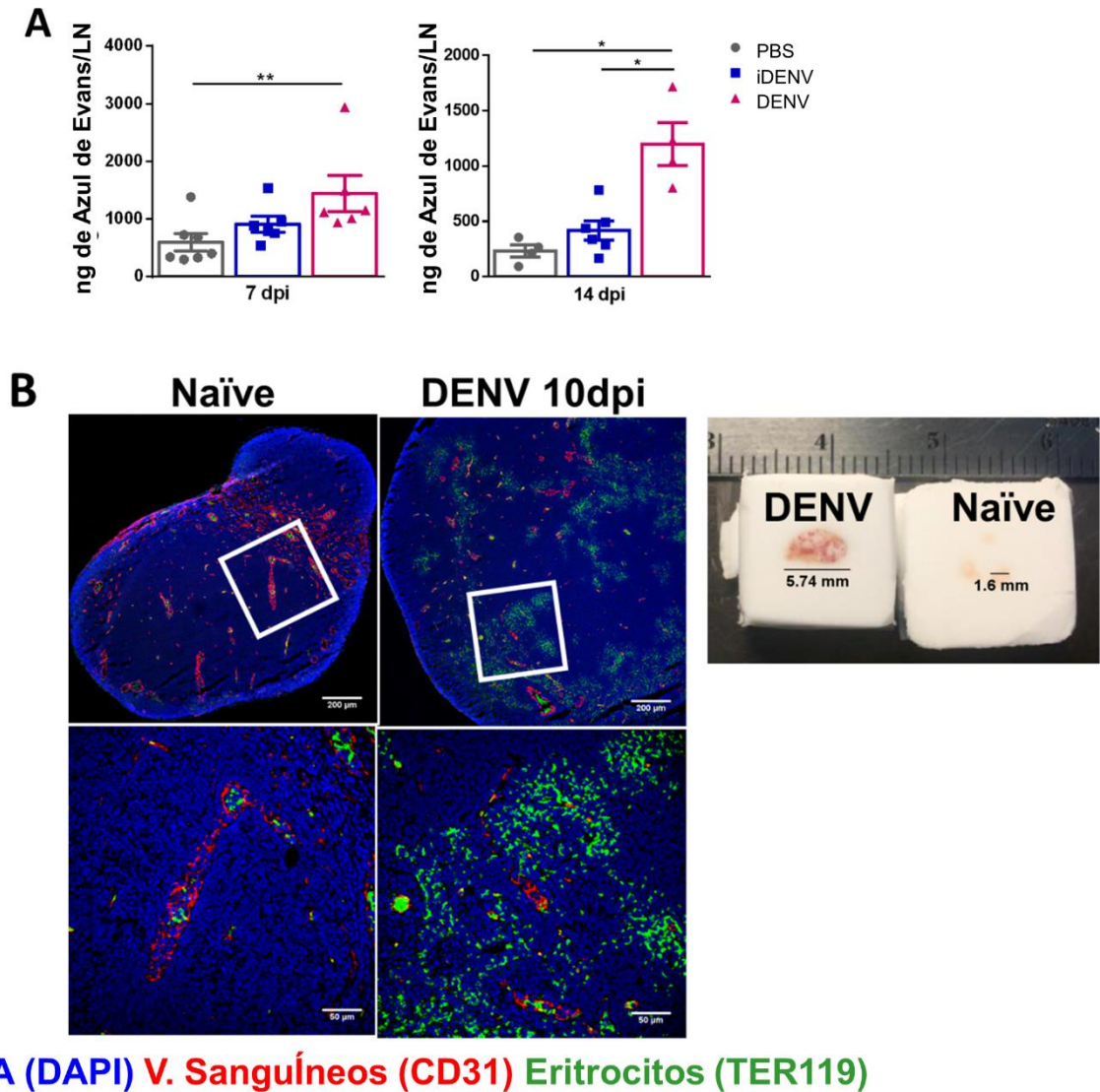
Los ratones se infectaron cutáneamente con  $6 \times 10^4$  PFU y se retaron al día 7. Se obtuvieron los DLNs después de 7, 14, 28 y 49 días de la inoculación ya sea con PBS, iDENV o DENV. A Criosecciones se marcaron para la identificación de BECs (CD31, rojo), FRCs (ER-TR-7, verde) y núcleos (DAPI, azul). Los paneles superiores representan imágenes panorámicas de DLNs de ratones no infectados (ratones inoculados con PBS libre de endotoxina) y de ratones inmunizados con DENV y los paneles

inferiores corresponden a magnificaciones del área indicada. Los vasos sanguíneos (CD31+) se observan expandidos desde los 7 días p.i. y las FRCs perivasculares están ausentes, a los 14 días se aprecian aparentes alteraciones morfológicas en las BECs y las FRCs mantienen baja la expresión de ER-TR-7. Los capilares sanguíneos se mantienen expandidos hasta los 49 días p.i. y la red de FRCs no recupera la estructura normal. **B** Se muestran imágenes representativas de DLNs de ratones inoculados con iDENV así como magnificaciones de las áreas indicadas. El iDENV también induce expansión de la vasculatura sanguínea, siendo más aparente a tiempos tardíos, 28 y 49 días p.i. Barras de escala, paneles superiores, 200  $\mu\text{m}$ ; paneles inferiores, 50  $\mu\text{m}$ . **C** Se cuantificó la intensidad media de fluorescencia (MFI) por DLN del marcaje para CD31 en las tres condiciones experimentales y se expresa como porcentaje de cambio respecto a la intensidad de CD31 de los ratones control. La MFI se incrementa con la inoculación de iDENV y DENV en comparación al control sin infectar. **D** Se obtuvieron suspensiones celulares mediante digestión enzimática, se evaluaron las células estromales (CD45-) viables (DAPI-) y se identificaron las FRCs (PDPN+, CD31-), LECs (PDPN+, CD31+) y BECs (PDPN-, CD31+). El DENV indujo un aumento en la proporción de LECs y BECs al mismo tiempo que la proporción de FRCs disminuyó. Se observa la aparición de una población de BECs con mayor intensidad de fluorescencia para CD31 en ratones inmunizados con iDENV y DENV. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

### Evaluación funcional de la vasculatura sanguínea

Debido a que encontramos alteraciones morfológicas en las BECs en el análisis histológico, evaluamos si ello pudiera repercutir en la integridad de los vasos sanguíneos. Por lo tanto, realizamos el ensayo de permeabilidad vascular con el colorante vital, azul de Evans y encontramos una mayor cantidad de colorante presente en los ganglios de ratones que fueron inmunizados con DENV a los 7 días y de los inmunizados con iDENV y DENV a los 14 días p.i (Fig. 4.6A). Lo que podría ser indicativo de mayor volumen sanguíneo circulando en los DLNs debido a posible vasodilatación y al incremento en el número de vasos sanguíneos encontrados en el análisis histológico. Por otro lado, también podría sugerir alteraciones en la permeabilidad vascular en estos sitios. En animales que fueron inoculados con mayor cantidad de DENV y analizados al día 10 p.i., encontramos manifestaciones hemorrágicas macroscópicas en los LNs (Fig. 4.6B). Se analizaron histológicamente estos órganos para determinar la integridad de los vasos sanguíneos, mediante la localización de eritrocitos. En ratones sanos, los eritrocitos se localizaron completamente restringidos a la luz de los vasos sanguíneos en los LNs. Por el contrario, en LNs de ratones infectados con DENV los eritrocitos se localizaron en todo el parénquima del ganglio fuera de los vasos sanguíneos, indicativo de daño vascular y hemorragia *in situ* (Fig. 4.6B).





**Fig. 4. 6. Evaluación de la integridad vascular sanguínea en LNs ante la infección con DENV.**

**A** Los ratones se infectaron cutáneamente con  $6 \times 10^4$  PFU y se retaron al día 7. Después de 7 o 14 días p.i. se les administró vía intravenosa 200  $\mu$ l de una solución de Azul de Evans 0.5% y 1 hora después los animales se sacrificaron y se cuantificó colorimétricamente la cantidad de Azul de Evans en DLNs. Se obtuvo una mayor cantidad de colorante de DLNs de ratones previamente inmunizados con DENV a los 7 y 14 días p.i. **B** Los ratones se inocularon vía cutánea con  $1 \times 10^6$  PFU y se retaron al día 7. Se obtuvieron los LNs periféricos (axilares) después de 10 días p.i. con PBS o DENV. Se muestra la vista macroscópica de los LNs, LNs de ratones infectados se encontraron agrandados y con manifestaciones hemorrágicas perceptibles a simple vista. Los criocortes se tiñeron para identificar vasos sanguíneos (CD31) y eritrocitos (TER119). Las imágenes superiores muestran imágenes a bajo aumento, donde se aprecia la localización intravascular de los eritrocitos en condiciones basales mientras que los eritrocitos se localizaron en el parénquima del ganglio, fuera de los vasos sanguíneos con la infección. Se muestran aumentos de las zonas indicadas para mayor detalle. Barras de escala, paneles superiores, 200  $\mu$ m; paneles inferiores, 50  $\mu$ m.

---

## Discusión

Poco se ha estudiado el impacto de la infección con diversos agentes patógenos sobre la microarquitectura de órganos linfoides secundarios y mucho menos el efecto en la integridad funcional de dichos órganos. En este estudio evaluamos la remodelación de las principales poblaciones estromales de los LNs después de la infección cutánea con DENV.

Las FDCs conforman una red dentro de los folículos y bajo estimulación antigénica, éstas se redistribuyen en la zona clara del GC donde participan en la selección de linfocitos B que hayan mejorado o no su afinidad. Sin embargo, ante la inoculación con el DENV las FDCs se expanden ocupando toda el área del GCs, sin la clásica compartimentalización en zona clara y oscura como lo hemos demostrado también con la distribución de células proliferantes. El posible impacto de estas alteraciones en la micro anatomía del GC sobre eventos cruciales como la hipermutación somática, la maduración de la afinidad y la selección clonal aún está por evaluarse.

Bajo condiciones inflamatorias los LNs normalmente aumentan su tamaño, en etapas tempranas como resultado de reclutamiento celular y posteriormente debido a proliferación celular. Para albergar un mayor contenido celular las FRCs quienes dan soporte estructural, se expanden y posteriormente proliferan. Las FRCs son blanco de infección de agentes patógenos como LCMV [5], leishmania [6], citomegalovirus [9] y se han encontrado afectadas morfológicamente ante infecciones virales como con virus de Ebola y Marburg [10]. Nosotros encontramos una desregulación en la expresión del marcador reticular ER-TR-7 ante la infección con DENV, sin embargo, tanto la secreción de CCL21 como la distribución de células cargadas con partículas fluorescentes como de moléculas pequeñas solubles a través de conductos no se encontró alterada si no más bien incrementada, con una mayor expresión de CCL21 y aparentemente un mayor reclutamiento de partículas acarreadas por células. Cabe mencionar que en los DLNs donde se observó una restructuración más drástica de la red reticular, se encontró disminuida la cantidad de microesferas fluorescentes sugiriendo que el tráfico de células podría verse afectado con el daño de la red de FRCs. Cabe mencionar que la desregulación de ER-TR-7 se mantuvo hasta tiempos tardíos de la infección, incluso cuando el tamaño de los LNs regresó a niveles basales. Dicha desregulación de ER-TR-7 solamente se ha reportado anteriormente en bazo ante la infección con salmonella en etapas agudas de la infección [11] y en células estromales infectadas por el citomegalovirus [9].

LECs son muy importantes para la formación de vasos linfáticos por donde las DCs viajan desde tejidos periféricos. En respuesta a antígenos modelo como la hemocianina de la lapa californiana (*Megathura crenulata*; keyhole limpet hemocyanin; KLH) en adyuvante completo de Freund (CFA) [12], lipopolisacárido (LPS) [13], agonista del TLR-3 (Poli:IC) [14],

oxaxolona [15] se observó la inducción de linfangiogénesis en DLNs y también con estímulos inductores de IFN- $\gamma$  como con el virus vacuna y chinconguya [14]. Se ha demostrado una estrecha correlación entre la migración *per se* de las DCs desde la piel y la inducción de linfangiogénesis en LN así como un papel fundamental de los linfocitos B en la reestructuración de la vasculatura linfática dependiente de la producción de VEGF-A [12]. Otros factores involucrados en coordinar la expansión y contracción del endotelio linfático son los interferones tipo I y PD-L1 [14]. Dada la importante presencia de los linfocitos B en los DLNs bajo la inmunización con DENV, estos podrían estar contribuyendo en la expansión de los vasos linfáticos en este modelo. Se ha observado un papel importante de los macrófagos en la formación de nuevos vasos linfáticos mediado por la secreción de factores de crecimiento (VEGF-C, -D, y -A) y la linfangiogénesis inducida en este modelo es crítica para la eliminación de patógenos y resolución de la inflamación por lo que sería de gran interés evaluar la participación de los macrófagos en la expansión linfática observada con el DENV [16]. Nosotros encontramos la red vascular linfática expandida hasta tiempos tardíos, 49 días después de la infección. Otros han encontrado la vasculatura expandida desde 1 día p.i. [14] con Poli:IC y hasta 30 días después de la inmunización con CFA-KLH [17]. La contracción de LECs durante la resolución de la inflamación es un proceso poco explorado y hasta el momento se ha demostrado la participación de IFN- $\gamma$  secretado por células T tienen un efecto anti angiogénico *in vivo* [13]. Dada la pobre respuesta de células T que observamos en la infección con DENV, podríamos sugerir que quizá la falta de IFN- $\gamma$  en DLNs este causando una prolongada expansión en la vasculatura linfática.

Dado que las necesidades metabólicas de los LNs aumentan bajo condiciones inflamatorias en parte por el agrandamiento del órgano (mayor celularidad) y mayor actividad celular (migración intranodal, presentación antigénica, proliferación, producción de citocinas y/o anticuerpos, etc) se requiere un mayor suministro de nutrientes a través de la sangre. Además, los linfocitos naïve que se reclutarán al LNs provienen de la circulación sanguínea. Se ha demostrado que estímulos inflamatorios, como la producción de citocinas (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), la fiebre, entre otros, promueven la vasodilatación de la arteriola central y la sobre expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) en las HEVs [18]. Nosotros encontramos una expansión de vasos sanguíneos desde los 7 días p.i. en DLNs de ratones inoculados con DENV y con iDENV que perdura hasta los 49 días p.i. Otros han documentado que la expansión de la vasculatura es debido a proliferación de las BECs inducida por factores de crecimiento vascular, VEGF secretados por FRCs presentes en la zona paracotical.

Las manifestaciones hemorrágicas son características en las formas graves de la infección con DENV. Hasta el momento no se ha determinado el mecanismo de inducción de hemorragia debido a las limitaciones de los estudios en pacientes. Nosotros observamos claras manifestaciones hemorrágicas sistémicas (LNs no drenantes) con la presencia de eritrocitos

fuera de los vasos sanguíneos utilizando una dosis mayor de DENV ( $1 \times 10^6$  PFU). La presencia de citocinas como TNF- $\alpha$ , sTNFR, sTNFR2, IFN- $\gamma$ , CXCL8, VEGFA, CCL5, etc, (denominada *tormenta de citocinas*) durante la fase aguda de infección con DENV ha sido relacionada con la inducción de hemorragia [19–21]. Factores asociados a la respuesta de linfocitos B, como VEGFA y CCL5 podrían participar dada su activación masiva como lo estamos reportando. Sin embargo, las citocinas asociadas a las células T podrían ser menos relevantes ya que nosotros y otros hemos observado una muy pobre activación y proliferación de células T [22–24].

Niveles elevados de la proteína NS1 han sido asociados con los casos de dengue severo (hemorrágico) [25]. Por otra parte, se ha demostrado que la sola inoculación de la proteína NS1 es capaz de inducir citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  y extravasación en pulmón, hígado e intestino delgado [26]. Monocapas de células endoteliales presentaron incremento en la permeabilidad vascular cuando fueron tratadas con NS1 *in vitro* [26]. Además, se ha mostrado que tanto el DENV como la proteína NS1 se unen al heparán sulfato y al glicocálix endotelial [27, 28]. Y posteriormente se podría estar induciendo daño vascular dependiente de proteasas o lisis de células endoteliales dependiente de complemento, lo que se ha sugerido como probables mecanismos *in vitro* [28, 29].

La participación de mediadores lipídicos como el factor activador de plaquetas (PAF) [30], así como de mastocitos con la liberación de granzimas podrían estar participando también en la patología del dengue [31]. Hasta el momento, el o los mecanismos más probables no se conocen con certeza. El estudio más profundo de este problema podría ser relevante en el modelo de ratones inmunocompetentes.

Nosotros describimos en este estudio el remodelamiento así como la integridad funcional de las principales poblaciones estromales de los DLNs ante la infección cutánea con DENV. Los cambios asociados a la infección podrían repercutir en la óptima respuesta contra el DENV y contra otros antígenos y/o virus relacionados como el Zika o el Chincunguya.

## Referencias

- [1] Berek C, Milstein C. The Dynamic Nature of the Antibody Repertoire. *Immunol Rev* 1988; 105: 5–26.
- [2] Flajnik MF. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 438–453.
- [3] Gretz JE, Norbury CC, Anderson AO, et al. Lymph-Borne Chemokines and Other Low Molecular Weight Molecules Reach High Endothelial Venules via Specialized Conduits While a Functional Barrier Limits Access to the Lymphocyte

- Microenvironments in Lymph Node Cortex. *J Exp Med* 2000; 192: 1425–1440.
- [4] Sixt M, Kanazawa N, Selg M, et al. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 2005; 22: 19–29.
- [5] Mueller SN, Matloubian M, Clemens DM, et al. Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15430–15435.
- [6] Ato M, Stäger S, Engwerda CR, et al. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol* 2002; 3: 1185–1191.
- [7] Odermatt B, Eppler M, Leist TP, et al. Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8252–8256.
- [8] Wang X, Cho B, Suzuki K, et al. Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. 2011; 208: 2497–2510.
- [9] Hsu KM, Pratt JR, Akers WJ, et al. Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J Gen Virol* 2009; 90: 33–43.
- [10] Steel KE, Anderson AO, Mohamadzadeh M. Fibroblastic reticular cell infection by hemorrhagic fever viruses. *Immunotherapy* 2009; 1: 187–197.
- [11] Lax S, Hou TZ, Jenkinson E, et al. CD248/Endosialin is dynamically expressed on a subset of stromal cells during lymphoid tissue development, splenic remodeling and repair. *FEBS Lett* 2007; 581: 3550–3556.
- [12] Angeli V, Ginhoux F, Llodrà J, et al. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity* 2006; 24: 203–215.
- [13] Kataru RP, Kim H, Jang C, et al. T Lymphocytes Negatively Regulate Lymph Node Lymphatic Vessel Formation. *Immunity* 2011; 34: 96–107.
- [14] Lucas ED, Finlon JM, Burchill MA, et al. Type 1 IFN and PD-L1 Coordinate Lymphatic Endothelial Cell Expansion and Contraction during an Inflammatory Immune Response. *J Immunol* 2018; 201: 1735–1747.
- [15] Halin C, Tobler NE, Vigl B, et al. VEGF-A produced by chronically inflamed tissue induces lymphangiogenesis in draining lymph nodes. *Blood* 2007; 110: 3158–3167.
- [16] Kataru RP, Jung K, Jang C, et al. Critical role of CD11b<sup>+</sup> macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood* 2009; 113: 5650–5659.

- 
- [17] Tan KW, Yeo KP, Wong FHS, et al. Expansion of Cortical and Medullary Sinuses Restrains Lymph Node Hypertrophy during Prolonged Inflammation. *J Immunol* 2012; 188: 4065–4080.
- [18] Soderberg KA, Payne GW, Sato A, et al. Innate control of adaptive immunity via remodeling of lymph node feed arteriole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 16315–16320.
- [19] Bethell DB, Flobbe K, Xuan C, et al. Pathophysiologic and Prognostic Role of Cytokines in Dengue Hemorrhagic Fever Published by : Oxford University Press Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/30106931> Pathophysiologic and Prognostic Role of Cytokines in Dengue Hemorrhagic. 2020; 177: 778–782.
- [20] Hung NT, Lei H, Lan NT, et al. Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: A Study of Clinical and Cytokine Profiles. *J Infect Dis* 2004; 189: 221–232.
- [21] Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Early Immune Activation in Acute Dengue Illness Is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity. *J Infect Dis* 1999; 179: 755–762.
- [22] Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, et al. T Cell Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: Are Cross-Reactive T Cells Suboptimal? *J Immunol* 2006; 176: 3821–3829.
- [23] Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003; 9: 921–927.
- [24] Friberg H, Bashyam H, Toyosaki-Maeda T, et al. Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans. *Sci Rep* 2011; 1: 1–9.
- [25] Libraty DH, Young PR, Pickering D, et al. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 2002; 186: 1165–1168.
- [26] Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, et al. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med*; 7. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa3787.
- [27] Chen Y, Maguire T, Hileman RE, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997; 3: 866–871.
- [28] Puerta-Guardo H, Glasner DR, Harris E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog* 2016; 12: 1–29.
- [29] Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and

---

Complement. *J Infect Dis* 2006; 193: 1078–1088.

- [30] Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, et al. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 14138–14143.
- [31] John ALS. Influence of Mast Cells on Dengue Protective Immunity and Immune Pathology. 2013; 9: 2011–2014.
- [32] Marcial-Juárez E, Yam-Puc JC, Cedillo-Barrón L, et al. Travelling with Dengue: From the Skin to the Nodes. In: Aparecida Sperança M (ed) *Dengue - Immunopathology and Control Strategies*. London, UK: IntechOpen Limited, pp. 27–42.

## CAPÍTULO 5

### Materiales y métodos



## Animales e inmunizaciones

Ratones macho WT BALB/c adultos se obtuvieron del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) y se alojaron en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) en el área de experimentación de la UPEAL del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN). Tratando de simular la ruta y la dosis en infecciones naturales, los ratones se inocularon con  $6 \times 10^4$  PFU de DENV serotipo 2 (cepa de referencia, Nueva Guinea) en las regiones inguinales previamente afeitadas y se les realizó un segundo reto al día 7. Como controles experimentales se utilizaron, el DENV inactivado por UV y sonicación (iDENV) y buffer fosfato salino (PBS) estéril y libre de endotoxinas. Los ganglios linfáticos regionales (inguinales) se obtuvieron después de 3, 7, 14, 16 o 23 días post inoculación (p.i.) para los experimentos de seguimiento del virus (Capítulo 2), Un grupo de ratones fue inoculado vía cutánea con una dosis de  $1 \times 10^6$  PFU de DENV serotipo 2 marcado fluorescentemente. Otro grupo con  $5 \mu\text{g}$  de Ovoalbúmina-Alexa Fluor 555 (Life Technologies; Eugene, OR, USA) y un grupo control inoculado únicamente con buffer de fosfato salino (PBS) estéril. Después de 1, 3, 6, 12 y 24 horas post inoculación (hpi), se extrajeron piezas pequeñas de piel del sitio de inoculación, así como DLNs y posteriormente se procesaron para experimentos de citometría de flujo o de inmunofluorescencia in situ. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas éticas nacionales (NOM-062-ZOO-1999) e institucionales (número de protocolo CICUAL: 0070-13; CINVESTAV-IPN) para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

## Obtención de stock de DENV

El stock de DENV se obtuvo in vitro infectando la línea celular C6/36 (de larvas de *Aedes albopictus*) con extractos cerebrales de ratones neonatos previamente infectados. Las células C6/36 se cultivaron en un Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco), anfotericina B, penicilina, estreptomycin, piruvato, vitaminas y L-glutamina, a  $34^\circ\text{C}$  en botellas de cultivo de  $75\text{ cm}^2$  (Corning). La infección se realizó cuando las células alcanzaron el 95% de confluencia. Después de 48 h de infección, se colectó el sobrenadante del cultivo que contenía el DENV y se concentró con unidades Amicon para filtración con centrifuga (Merk Millipore, Co. Cork, IRL). En seguida, se filtrará nuevamente con membrana de PVDF de baja unión a proteínas de  $0.22\ \mu\text{m}$  (MILEX GV, Carrigtwohill, Ireland). El sobrenadante conteniendo las partículas virales se alicuotará y almacenará a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso. La cuantificación de los viriones infectivos se realizó mediante el ensayo de formación de placas en células de riñón de Hámster bebe (BHK-21) para los experimentos del Capítulo 2 o en células epiteliales del riñón de mono verde africano (Vero) para capítulos 3 y 4. El título se determinó como unidades formadoras de placa (PFU)/ml.

### **Titulación del stock viral**

La titulación del stock viral se realizará en células vero (Baby hamster kidney cell) mediante la técnica de formación de placas. Se sembrarán 100,000 células vero por pozo, en placas de 24 pozos. Se incubarán durante 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para permitir la formación de una monocapa confluyente. Posteriormente, se infectarán las células utilizando diluciones seriadas de DENV en solución de Hank's comenzando con el virus concentrado, como control negativo se utilizará el diluyente. Todas las condiciones se realizarán por triplicado. Trascorrida una hora de adsorción del virus, se adicionará una solución de carboximetilcelulosa al 1% y se incubaron por 5 días. Finalmente, se revelarán las placas mediante una reacción enzimática. El título viral se reportará en Unidades Formadoras de Placas (PFU)/ml.

### **Marcado fluorescente del virus Dengue**

Para el seguimiento in vivo de DENV en tejidos (piel y DLNs) marcamos el DENV con un colorante fluorescente rojo (PKH-26, Sigma). Brevemente, el DENV se mezcló con el colorante PKH-26 en el diluyente apropiado según las instrucciones del proveedor y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción, agregamos buffer de lavado (suero fetal bovino al 10% en PBS). Debido al tamaño del virus, aplicamos ultrafiltración utilizando unidades Amicon para filtración con centrifuga (Merk Millipore, Co. Cork, IRL) y centrifugamos a 4.000 g durante 20 minutos a 4 ° C. El último paso de lavado se realizó sólo con PBS estéril frío.

### **Inmunofluorescencia de LNs y piel de tejidos conteniendo DENV fluorescente**

Se obtuvieron los DLNs y muestras de piel de los diferentes grupos experimentales después de 1, 3, 6, 12 y 24 hpi: ratones inoculados con PBS, ratones inoculados con ovoalbúmina (OVA) acoplada con Alexa Fluor-555 o ratones inoculados con el DENV fluorescentemente marcado. Los tejidos se embebieron en un medio de criopreservación de tejidos (optimal cutting temperatura (OCT), Tissue Tek (Sakura FineTek, Torrance, CA, EE. UU.), se congelaron en nitrógeno líquido y se cortaron en secciones de 5 µm de grosor en un criostato (Leica). Las criosecciones se colocaron en portaobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se fijaron con etanol durante 7 minutos a -20 ° C. Las secciones de tejido se inmunomarcaron durante toda la noche a 4 ° C con los anticuerpos primarios correspondientes. Después de tres pasos de lavado, se incubaron los anticuerpos secundarios o estreptavidinas acoplados a fluorocromos durante 1 hora o 15 minutos, respectivamente. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Leica TCS SP8 AOBS utilizando los objetivos de 10x y 40x y posteriormente se analizaron con el software Leica (LAS AF Lite).

### Microscopía de fluorescencia

Los DLNs se obtuvieron a los 7, 14, 28 Y 49 días p. i., se embebieron en un medio de criopreservación de tejidos (optimal cutting temperatura (OCT), Tissue Tek (Sakura FineTek, Torrance, CA, EE. UU.) y se congelaron en nitrógeno líquido. Se obtuvieron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato (Leica Microsystems) y se colocaron en portaobjetos de vidrio tratados con Poly-L lisina y se fijaron en acetona durante 20 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los tejidos se rehidrataron en una solución de PBS-0,01% Tween-20, se bloquearon con una solución de caseína (Power Block, BioGenex Laboratories, San Ramón, CA) y posteriormente se marcaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos primarios en una solución de PBS con 1% (vol/vol) de albúmina sérica bovina, 1% (vol/vol) de suero humano normal y 0.01% de azida de sodio. Como siguiente paso los tejidos se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos durante 1 hora o estreptavidina durante 15 min a temperatura ambiente. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) se incubó durante 5 minutos para teñir los núcleos. Después de 3 lavados, los portaobjetos con los tejidos se montaron en una solución de DABCO 10% (1,4-etilenpiperazina) en Glicerol. Se utilizó el kit de detección de muerte celular in situ (TUNEL, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detectar apoptosis a nivel de células individuales. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Leica TCS SP8 AOBS utilizando los objetivos de 10x, 40x o 100x. Las imágenes se procesaron para obtener proyecciones máximas y luego se ensamblaron utilizando la herramienta de alineamiento automático de capas en Photoshop para crear las imágenes panorámicas de los DLNs completos. La cuantificación de las áreas (Regions of interest, ROIs) y los perfiles de la intensidad de fluorescencia de píxeles se generaron utilizando el software ImageJ (NIH).

### Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia

Anticuerpos anti-ratón	Clona	Isotipo	Casa comercial	Número de catalogo	Dilución
B220-Brilliant Violet 421	RA3-6B2	Rata	BioLegend	103251	1:300
Thy 1.2-Biotina	53-2.1	Rata	BD Biosciences		1:50
Caspasa-3 activa-FITC	C92-605.1	Conejo	BD Biosciences	550480	1:25
Ki-67-Purif.	Policlonal	Conejo	Abcam	ab66155	1:300
CD68-Purif.	FA-11	Rata	BioRad	MCA1957	1:500
IgD-Purif.	Antisuero	Borrego	Birmingham	Donación	1:200
F4/80-Purif.	Cl:A3-1	Rata	Serotec-Bio-Rad	MCA497	1:10
CD169-Purif.	MOMA-1	Rata	Serotec-Bio-Rad	MCA947	1:40

CD11c -Biot.	HL3	Hámster	BD Pharmingen	550283	1:400
B220-Biot.	RA3-6B2	Rata	BD Pharmingen	553086	1:400
DEC-205-APC	205yekta	Rata	eBioscience	17-2051-82	1:400
CD31- Biot.	Policlonal	Chivo	R&D Systems	BAF3628	1:800
Lyve-1-Biot.	Policlonal	Chivo	R&D Systems	BAF2125	1:200
ER-TR-7-Purif.	ER-TR-7	Rata	ThermoFisher Scientific	MA1-40076	1:300
Podoplanin	8.1.1	Hámster	BioLegend	127410	1:800
B220-Purif		Rata	donado por el Dr. Leopoldo Santos Argumedo		1:1000
Anticuerpos secundarios					
anti-Conejo IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Policlonal	Chivo	Life Technologies ThermoFisher Scientific	A-11008	1:2000
anti-Rata IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Policlonal	Burro	Life Technologies ThermoFisher Scientific	A-21208	1:2000
anti-Chivo IgG (H+L) Alexa Fluor 568	Policlonal	Burro	Life Technologies ThermoFisher Scientific	A-11057	1:2000
anti-Chivo IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Policlonal	Burro	Life Technologies ThermoFisher Scientific	A-11055	1:2000
anti-Rata IgG (H+L) Alexa Fluor 594	Policlonal	Burro	Life Technologies ThermoFisher Scientific	A-21209	1:2000
anti-Hamster IgG (H+L) Alexa Fluor 594	Policlonal	Chivo	Life Technologies ThermoFisher Scientific	A-21113	1:2000
Estreptavidina Alexa Fluor 555	N/A	N/A	Life Technologies ThermoFisher Scientific	S32355	1:2000
Estreptavidina Alexa Fluor 488	N/A	N/A	Life Technologies ThermoFisher Scientific	S32354	1:2000
4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI)	N/A	N/A	Invitrogen (San Francisco, California, USA).	62247	1:2000

### **Citometría de flujo de suspensiones celulares de DLNs**

Los DLN se obtuvieron 1, 3, 6, 12 y 24 h o 3, 7, 14, 16, 23, 28 días después de la inoculación en la piel, ya sea con PBS como control, con DENV marcado con fluorescencia, iDENV o DENV. se obtuvieron suspensiones celulares de células individuales mediante desagregación mecánica con portaobjetos a partir de los DLNs. Las suspensiones celulares se pasaron por un filtro para células con poro de 70  $\mu\text{m}$  y se bloquearon con una solución de caseína (Power Block, BioGenex Laboratories, San Ramón, CA) para reducir la unión inespecífica. Luego se marcaron con una mezcla de los anticuerpos correspondientes para detectar moléculas de membrana durante 25 minutos a 4 °. Después de un paso de lavado con Buffer FACs (BSA 1%, NaN<sub>3</sub> 0.01% en PBS) se agregaron los anticuerpos secundarios y/o estreptavidinas durante 20 minutos a 4 ° C.

Las células se trataron con el kit de permeabilización y fijación nuclear para Foxp3 (Invitrogen™ eBioscience™) para la detección intracelular de la proteína Ki-67 (anticuerpo policlonal de conejo). Como siguiente paso, se agregó a las suspensiones celulares el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fluorocromo durante 20 minutos. Después de un lavado más con buffer de permeabilización (Kit Foxp3) y para el análisis del ciclo celular, se adicionó el colorante Hoechst 33342 a una concentración de 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incubó durante 10 minutos. Las células se fijaron con paraformaldehído al 1% y las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD LSR II Fortessa II y los datos se analizaron con el software Flowjo (versión X.0.6 para Windows, Ashland, OR).

### **Preparación de las suspensiones celulares para evaluar células estromales**

Se extrajeron los ganglios inguinales de ratones BALB/C adultos por cada grupo experimental y se colocaron cortados en pequeñas piezas en 0.5 mL de una solución de Colagenasa-DNAsa (Colagenasa tipo II, 340 UI/mL (GIBCO); DNAsa I, 4 UI/mL (Boehringer mannheim)), se incubaron a 37°C durante máximo 50 minutos, mezclando en intervalos de 10 minutos con pipeta de 1 ml hasta que el tejido este completamente disgregado. La suspensión se pasó a través de un separador celular de 70  $\mu\text{m}$  (BD Falcon, MA, USA) para eliminar restos de tejido. Las suspensiones se colectaron en tubos con fondo cónico y se lavaron con solución de FACs (MEM, FBS 2%, azida de sodio al 0.01%, EDTA 5mM). Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y el análisis de viabilidad celular, considerando como viables a las células negativas para la tinción azul de tripano. Se procedió a teñir 2 millones de células por prueba como se describió anteriormente. Se adquirieron al menos 1,500,000 eventos por cada condición.

**Anticuerpos utilizados para citometría de flujo**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Clona</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Número de catálogo</b>	<b>Dilución</b>
anti-CD3e-PE	145-2C11	Hámster	BD Biosciences	553064	1:200
anti-CD3-BV421	17A2	Rata	BioLegend	100227	1:200
anti-CD4-APC/Cy7	RM4-5	Rata	TONBO Bioscience	25-0042	1:200
anti-CD69-PE	H1.2F3	Rata	BD Biosciences	553237	1:500
anti-B220-FITC	RA3-6B2	Rata	BD Biosciences	561877	1:50
anti-CD8a-Biot	53-6.7	Rata	eBioscience	14-0081-82	1:500
anti-CD25- PerCPCy5.5	PC61	Rata	BD Biosciences	551071	1:300
anti-CD86-PE	PO3.1	Rata	eBioscience	12-0861-83	1:800
anti-Ki-67-Purif.	Policlonal	Conejo	Abcam	ab66155	1:400
anti-CD11c-APC	HL3	Hámster	BD Biosciences	550261	1:400
anti-IA/IE-FITC	2G9	Rata	BD Biosciences	553623	1:400
anti-Gr-1- PerCPCy5.5	RB6-8C5	Rata	BD Biosciences	552093	1:200
anti-F4/80	Cl:A3-1	Rata	Serotec-Bio-Rad	MCA497	1:50
anti-CD169	MOMA-1	Rata	Serotec-Bio-Rad	MCA947	1:25
Anti-CD45-Purif	30-F11	Rata	BD Biosciences	553076	1:500
anti-Podoplanin	8.1.1	Hámster	BioLegend	127410	1:100
anti-CD31- Biot.	Policlonal	Chivo	R&D Systems	BAF3628	1:500
<b>Reactivos secundarios</b>					
anti-Conejo IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Policlonal	Chivo	Life Technologies ThermoFisher Scientific	A-11008	1:2000
Estreptavidina-PE- TR	N/A	N/A	Life Technologies	SA1017	1:2000
Estreptavidina- Alexa Fluor 647	N/A	N/A	ThermoFisher Scientific	S32357	1:1000
Viability Dye	N/A	N/A	eBioscience	65-0863-14	1:2000

**Compensación**

Se utilizarán controles de compensación para cada fluorocromo. Se teñirán un millón de células para cada tubo de compensación, en el caso que la molécula sea de baja expresión se utilizará una molécula diferente acoplada al mismo fluorocromo. Para el control de autofluorescencia, células sin teñir se fijarán y permeabilizarán del mismo modo que las células problema. Todas las células utilizadas como control de autofluorescencia y compensación se someterán al procedimiento de permeabilización y fijación de la misma manera que las muestras problema. Para los controles de compensación se adquirirán 50,000 eventos por muestra. Los valores de compensación se determinarán manualmente en el software BD FACSDiva v8.0.1 (BD Bioscience, Heidelberg, Germany).

### **Análisis de la distribución de moléculas fluorescentes dentro del ganglio linfático**

Se inocularon vía intradérmica 30  $\mu$ l de una solución de OVA-AlexaFluor-555 (3 $\mu$ g/inóculo) en ratones control e inmunizados con iDENV y DENV. Se sacrificaron 15 min después de la inoculación con OVA que corresponde al día 14 p.i. de DENV. Para la evaluación de FITC, los ratones se sacrificarán 1 hora después de la inoculación de FITC en el día 14 p.i. de DENV. Para la evaluación de antígenos particulados, se inocularon  $\approx 5.4 \times 10^8$  microesferas fluorescentes (1.0  $\mu$ m de diámetro) en cada ingle al día 12 p.i de DENV y se sacrificaran al día 14. Se extrajeron los DLNs al sitio del inóculo y se colocaron en medio de criopreservación para luego congelarlos en nitrógeno líquido. Los criocortes obtenidos del tejido se fijaron con paraformaldehído al 4% por 1 hora a temperatura ambiente y cubiertos de la luz. Se realizaron los marcajes *in situ* según se indica en cada caso siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

### **Análisis de la permeabilidad vascular en ganglios linfáticos**

Se inocularon 200  $\mu$ l de una solución al 0.5% (w/v) de Evans Blue en PBS por vía venosa (cola). Después de 1 hora de la inoculación se sacrificó el ratón en cámara de cloroformo y se obtuvieron los DLNs al sitio de inoculación del DENV. los DLNs se colocaron en 120  $\mu$ l de dimetilformamida (J.T. Baker, Cat. 9221-02) para extraer el colorante Evans Blue y se incubaron los tejidos durante toda la noche a 55°C. Se determinó la densidad óptica por espectrofotometría a 610 nm para cuantificar la cantidad de colorante extravasado por DLN en todos los grupos experimentales mediante una curva estándar de calibración.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el Software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA). Las gráficas muestran la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Cuando se compararon los tres grupos experimentales (Naïve, iDENV y DENV), se realizó la prueba de análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Se aplicó la prueba de comparación múltiple de Bonferroni y

un valor de  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Cuando se compararon dos grupos (Naïve y DENV), se calculó la significancia estadística mediante la prueba t de Student de dos colas no pareada.

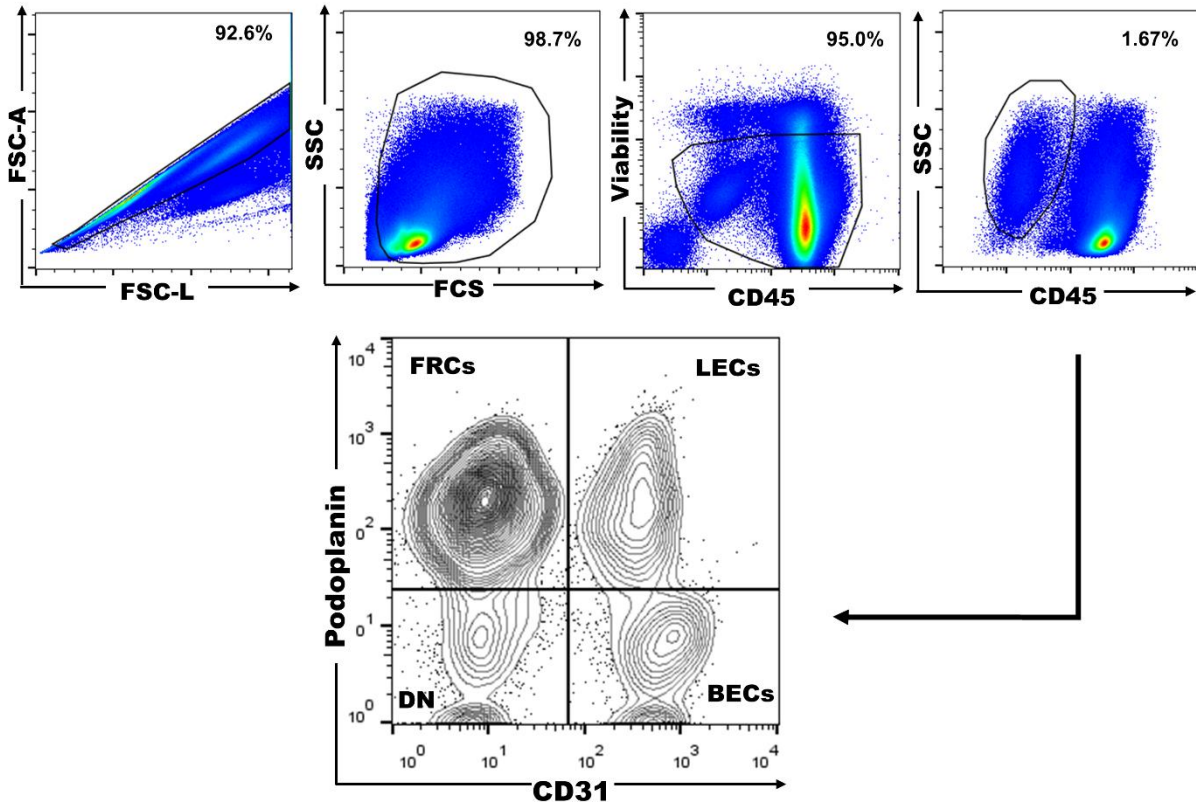


Fig. 5. 1. Estrategia de análisis de las poblaciones de células estromales de LNs: FRCs, LECs y BECs por citometría de flujo.



## CONCLUSIONES

1. Tras la inoculación en piel, el virus dengue (DENV) llega rápidamente (1 h) a los ganglios linfáticos y se asocia principalmente con células dendríticas, macrófagos y los folículos de linfocitos B.
2. La inoculación del DENV induce activación y proliferación masiva de linfocitos B dentro de los folículos y éstos crecen ocupando una gran proporción del área total del ganglio linfático.
3. Simultáneamente, no parece haber respuesta de linfocitos T, ni a nivel de activación ni de proliferación. Esta aparente falta de respuesta no se relaciona con apoptosis de los linfocitos T.
4. Hay un reclutamiento importante de macrófagos especializados (TBMs) hacia el interior de los centros germinales, lo que se relaciona con la remoción de células apoptóticas.
5. Las células fibroblásticas reticulares (FRCs) remodelan la microarquitectura del ganglio, lo que aparentemente no impacta en sus funciones, como la secreción de CCL21 y la distribución de antígenos a través de conductos.
6. La inoculación con DENV induce alteraciones y expansión de la vasculatura linfática y sanguínea, con la aparición de hemorragia *in situ*.
7. La infección cutánea en ratones inmunocompetentes induce remodelación en los compartimentos, tanto de células linfoides (linfocitos T y B) como de las estromales (FDCs, FRCs, vasos linfáticos y sanguíneos), con hemorragia al interior del ganglio.

## PERSPECTIVAS

1. Ahondar en el estudio de la microanatomía y función de los centros germinales: AID (Deaminasa de citidina inducida por activación), Tfh (linfocitos T foliculares), CXCL13, CXCR5.
2. Evaluar la mutación somática, así como la maduración de la afinidad de los anticuerpos generados ante la infección con DENV.
3. Analizar la producción de células B de memoria, anticuerpos neutralizantes y/o facilitadores de la infección.
4. Indagar la posible causa de la falta de respuesta de LcT así como su papel durante la infección.
5. Estudiar el mecanismo de inducción de hemorragia *in vivo* e *in vitro*.
6. Estudiar las infecciones homotípicas y heterotípicas secundarias en este modelo *in vivo*.

## ANEXOS

Publicaciones asociadas a este proyecto de investigación

Marcial-Juárez E, Yam-Puc JC, Cedillo-Barrón L, et al. Travelling with Dengue: From the Skin to the Nodes. In: Aparecida Sperança M (ed) *Dengue - Immunopathology and Control Strategies*. 2017; London, UK: IntechOpen Limited, pp. 27–42.

Marcial-Juárez E, García-Cordero J, Flores-Romo, L, et. al. Cutaneous Dengue virus inoculation triggers strong B cell reactions but contrastingly poor T cell responses. *Virologica Sinica, Springer*; 2020 (Accepted)