

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

*Carlos F. Narváez\*, \*\*, Marcela Castro\*, Juana Angel\*\* y Manuel A. Franco\*\**

# DETECCIÓN DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS TOTALES Y ESPECÍFICAS DE ROTAVIRUS EN ADULTOS SANOS

## DETECTION OF TOTAL AND ROTAVIRUS SPECIFIC ANTIBODY SECRETING CELLS IN HEALTHY ADULTS

*Fecha de recibido: 15-10-2009 • Fecha de aprobación: 8-12-2009*

**Resumen.** Ya que los anticuerpos (Ac) son uno de los principales mecanismos de defensa contra la infección por rotavirus (RV), la capacidad de identificar a las células que secretan anticuerpos (CSA) totales y RV específicos es fundamental para procesos como el análisis de la respuesta inmune antiviral y la evaluación de nuevas vacunas. Aquí, se analiza por ELISPOT (ensayo funcional) y citometría de flujo (CF {ensayo fenotípico}) la frecuencia e isotipo de CSA totales y RV específicas en adultos sanos, usando células mononucleares de sangre periférica totales (CMSP) y a las moléculas CD38 y CD27 como marcadores para enriquecer en CSA.

Por cada millón de CMSP, aproximadamente 2,550 células producían Ac totales. La IgA fue el isotipo más frecuente, seguido de la IgG e IgM, con el 63%, 29.4% y 7.6% respectivamente. El análisis combinado del ELISPOT y la CF mostró que el 85% de las CSA expresaron CD38 y el 90% de ellas expresaron CD27. Una alta y significativa correlación entre las CSA detectadas por el ensayo funcional y el fenotípico fue encontrada cuando estos ensayos se realizaron en las poblaciones purificadas con CD38 y CD27. Con el enriquecimiento de CSA usando al CD38 y CD27, se logró además detectar CSA RV específicas que se encuentran en circulación en tan baja frecuencia como 0 a 40 CSA-RV por millón de CMSP. Para las células RV-

específicas, también una buena correlación fue encontrada entre el ELISPOT y la CF. A pesar de su muy baja frecuencia, CSA antígeno específicas pueden ser detectadas en circulación de voluntarios sanos. Este acercamiento puede ser usado en la evaluación de vacunas, que para el caso particular del RV son necesarias mejorar.

**Palabras clave:** Rotavirus (RV) células B, Células secretoras de anticuerpos (CSA), CD27, CD38, citometría de flujo (CF).

**Abstract.** Antibodies (Ab) play a critical role in the immune response against rotavirus (RV). Protector Ab, are produced by antibody secreting cells (ASC). The capacity to detect ASC becomes fundamental in process like antiviral response analysis and vaccination testing. Here, we analyzed the frequency and isotype of total and RV-specific ASC by ELISPOT (functional assay) and flow cytometry (FC) in healthy adults using CD38 and CD27 like ASC markers.

In each million of peripherals blood mononuclear cells (PBMC), approximately 2,550 totals ASC were detected. IgA was the isotype preferentially expressed for circulating ASC followed by IgG and IgM with 63%, 29.4% and 7.6% of total ASC respectively. Paired

\* Programa de Medicina, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia. Autor responsable. Correo electrónico: cfnarvaez@usco.edu.co. Grupo de Parasitología y Medicina Tropical, Programa de Medicina.

\*\* Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

analysis of immunomagnetic sorting, ELISPOT and FC shown that 85% and 90% of total ASC expressed CD38 and CD27 respectively. CD38 and CD27 ASC enrichment population were used to detect RV-specific ASC. None to 40 ASC per million of PBMC were detected by ELISPOT and FC and more interesting yet, a high correlation were found in the frequency of RV-specific ASC detected by both methods. This mixture assay can be used in the evaluation of new RV vaccines.

**Key words:** Rotavirus (RV), B-cells, Antibody Secreting Cells (ASC), CD27, CD38, Elispot, Flow cytometry (FC).

## INTRODUCCIÓN

Los rotavirus (RV) son patógenos causantes de gastroenteritis en varias especies de animales y son la principal causa de diarrea severa en niños menores de 2 años, responsable de una alta mortalidad mundial. Aunque dos vacunas han sido aprobadas para uso en humanos,<sup>(22,23)</sup> hoy es aceptado que la baja respuesta a la vacunación de niños en países en vías de desarrollo y la falta de cubrimiento para algunos serotipos hace necesario estrategias que permitan mejorar las vacunas existentes<sup>(11)</sup>. Los factores inmunes protectores inducidos por la vacunación no han sido completamente aclarados, hecho que se convierte en una gran limitante para el desarrollo de nuevas vacunas anti RV. Dentro de los factores inmunes asociados con protección a la infección mejor conocidos, está la inmunoglobulina A (IgA) RV específica sérica e intestinal<sup>(1)</sup>. El origen de esta IgA, son células secretoras de anticuerpos (CSA), la mayoría de ellas activadas en la mucosa intestinal, que retornan nuevamente al intestino usando la vía sanguínea. Debido a la migración de las CSA al intestino por vía sanguínea y a la dificultad que representa el estudio de las Igs en un medio como la materia fecal, la sangre periférica se convierte en una opción que puede ser utilizada como ventana para analizar CSA totales y RV específicas que están en ese proceso de migración<sup>(4)</sup>. Sin embargo, la muy baja frecuencia de estas células en circulación, incluso durante la infección, se convierte en una gran limitante.

Estudios previos asocian el fenotipo de CSA a células CD19+, IgD-, CD38<sup>alto</sup><sup>(10, 17, 24)</sup>. Recientemente, también la alta expresión del marcador de linfocitos B de memoria (LBm) CD27 ha sido asociado con el fenotipo de CSA<sup>(12)</sup>. Para detectar LB que expresan Igs de superficie específicas de RV, se cuenta con partículas virales recombinantes a quienes se les ha fusionado la

proteína verde fluorescente (GFP/VLP) que permite su identificación por citometría de flujo (CF) y microscopía de fluorescencia<sup>(6)</sup>. La unión específica de esta partícula a los LB ha sido probada por otros y por nosotros<sup>(10, 20, 21)</sup>.

Aquí se busca determinar si el fenotipo propuesto previamente corresponde al de una CSA circulante detectada por su capacidad funcional de producir Igs, todo con el fin de caracterizar una célula efectora crítica de la inmunidad adquirida, que está implicada directamente en la defensa contra muchas otras condiciones infecciosas y fundamental en la defensa inmune antiviral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Voluntarios y muestras

De 21 voluntarios adultos sanos, se tomó muestra de sangre venosa total (20-50ml) en tubos heparinizados. La muestra fue centrifugada a 250xg por 10 minutos. El plasma fue recolectado y congelado a -20°C. Las Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas mediante gradiente de ficoll (Lymphosep-medio, ICN).

Todos los voluntarios participantes en el estudio, firmaron un consentimiento aprobado por el Comité de Investigaciones de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana y el Hospital Universitario de San Ignacio.

### Purificación de subpoblaciones CD38 y CD27.

La purificación de las células CD38 y CD27 positivas se realizó mediante separación inmunomagnética positiva con anticuerpos acoplados a microesferas (Miltenyi Biotec), según recomendaciones del fabricante y como ha sido previamente publicado<sup>(4,17)</sup>. Brevemente, CMSP fueron lavadas con PBS-BSA 0.5%, EDTA 2mM (buffer de separación, Gibco) y marcadas con anticuerpos anti CD38 ó CD27 acoplados a microesferas magnéticas durante 10 min. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas con buffer de separación y pasadas a través de la columna. Las células marcadas son retenidas en la columna mientras que las no marcadas pasan a través de ella. Después de la separación magnética, el 91% y el 94% de las células expresaron el CD38 y CD27 respectivamente como se demostró por CF (datos no mostrados).

### Enzyme linked immunospot assay (ELISPOT)

Placas individuales de 96 pozos (Immobilon P membrane, Millipore, Bedford, MA) fueron cubiertas con 4 µg/mL de anticuerpos monoclonales hechos en ratón y dirigidos contra las dos cadenas ligeras de las inmunoglobulinas humanas) para detectar CSA totales, o cubierta con el RV bovino (RF) purificado en cloruro de cesio, diluido 1/100 en PBS estéril, para identificar a las CSA circulantes específicas de RV. Como control negativo algunos pozos fueron cubiertos con PBS estéril. La placa fue incubada toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se desechó el sobrenadante y se bloquearon los pozos con 200 µL de medio completo (RPMI + 100 U/mL de penicilina cristalina + 100 mg/mL de estreptomycin + L-Glutamina 1% + HEPES 20 mM + β-Mercaptoetanol 1x10<sup>-5</sup> M + SBF al 5%), por lo menos durante 1 hora a 37°C. Tanto de la población positiva como de la negativa para CD27 y CD38 se realizaron diluciones seriadas (con un rango entre 1x10<sup>5</sup> hasta 1x10<sup>3</sup> células/pozo), posteriormente las células fueron depositadas en un volumen final de 50 µL/pozo. Simultáneamente se agregó 50 µL de una dilución de anticuerpos anti-isotipos acoplados a peroxidasa (Sigma) de tal forma que quedarán a una dilución final por pozo de 1/1,000 para anti IgA e IgM y 1/6,000 para el anti-IgG peroxidasa. Las células fueron incubadas toda la noche a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Al día siguiente las células fueron lavadas en 5 oportunidades con PBS estéril y 5 veces más con PBS-Tween 20 al 0.1%. El ensayo se reveló con Kit AEC (3 amino-9-Etilcarbazon, Vector), incubándose por aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente el AEC fue recolectado y la reacción fue detenida con agua. Como control positivo, CMSP totales fueron cultivadas de la misma forma que las células separadas. El ruido de fondo de las CSA circulantes totales y específicas de RV presente en los pozos cubiertos con PBS, fue abstraído del conteo final.

### Citometría de flujo (CF)

Para detectar CSA que expresan Ig de superficie específicas de RV se cuenta con partículas virales recombinantes que expresan la proteína verde fluorescente (GFP-VLP). La producción y uso de GFP-VLP para el análisis de LB RV-específicos fue previamente publicada por nosotros y otros<sup>(6, 21)</sup>.

CMSP totales ó células CD38 ó CD27 positivas fueron incubadas con 1 µg/test de GFP-VLP por

45 minutos a 4°C protegidos de la luz. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas con buffer de tinción y centrifugadas a 250xg por 10 min. Posteriormente fueron adicionados anti CD19, anti CD38 APC ó anti CD27 PE y anti IgD biotina e incubados por 30 min a 4°C. Tras un lavado con buffer de tinción a los tubos fue adicionada la estreptavidina PerCP, incubándose por 30 min más. Finalmente las células fueron lavadas, centrifugadas y el pellet resuspendido en paraformaldehído al 1% (Electron Microscopy Science, WA). Las muestras fueron pasadas dentro de las primeras 12h después de realizada la tinción. La lectura se realizó en un citómetro FACS CALIBUR (Becton-Dickinson) equipado con un segundo laser rojo. Para el análisis se utilizó el software Cell Quest. Por lo menos 200,000 células B fueron adquiridas.

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS versión 9.0. Pruebas no paramétricas fueron especialmente usadas. Para establecer el coeficiente de correlación se utilizó la prueba por rangos de Spearman. Una P<0.05 fue tomada como estadísticamente significativa. La mayoría de resultados se reportan como media y error estándar de la media (ESM).

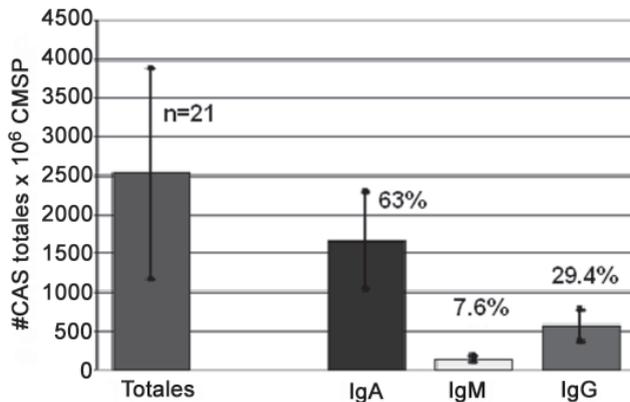
## RESULTADOS

### Número e isotipo de las CSA circulantes en adultos sanos

Estudios previos revelan que las CSA corresponden a una pequeña población que va desde el 0.05 hasta el 2% del total de CMSP. El promedio de la frecuencia de las CSA circulantes totales obtenido de 21 voluntarios adultos sanos fue de 2,550 CSAx10<sup>6</sup> CMSP (ESM: 1,350 CSA, Fig. 1). De las CSA circulantes, el mayor número correspondió a las células que secretan IgA, con el 63% (Figura 1). En segundo lugar fueron detectadas las células que producen IgG con el 29.4% y finalmente a las células secretoras de IgM con el 7.6% (Figura 1). Esta distribución es consistente con reportes previamente publicados<sup>(15)</sup>. En conjunto los resultados sugieren que muy bajas frecuencias de CSA circulantes pueden ser detectadas en voluntarios sanos y que el isotipo predominante es la IgA.

### Fenotipo de las CSA circulantes humanas

Para determinar si las CSA expresan los marcadores CD38 y CD27, se realizó la combinación



**Figura 1.** Baja frecuencia de CSA circulantes es detectada en adultos sanos. CMSP fueron diluidas y cultivadas en placas de 96 pozos. El número CSA totales de isotipo IgA, IgM e IgG fue detectado por ELISPOT. Las barras representan la media. Las líneas corresponden al error estándar de la media.

de las técnicas de separación inmunomagnética y ELISPOT. Células CD38+ y células CD27+ fueron purificadas a partir de CMSP por selección inmunomagnética positiva como se describió en materiales y métodos. La pureza de las poblaciones determinada por CF fue  $\geq 91\%$ . Tanto la fracción purificada como la fracción seleccionada negativamente fueron colocadas en las placas de ELISPOT en diluciones seriadas y cultivadas toda la noche. Al final del cultivo, las placas fueron lavadas y reveladas. Después del procedimiento, 85% y el 92% de las CSA estuvieron presentes en la población positivamente purificadas con CD38 y CD27 respectivamente (Figura 2). En adición, el CD38 y CD27 fueron homogéneamente expresados por todos los

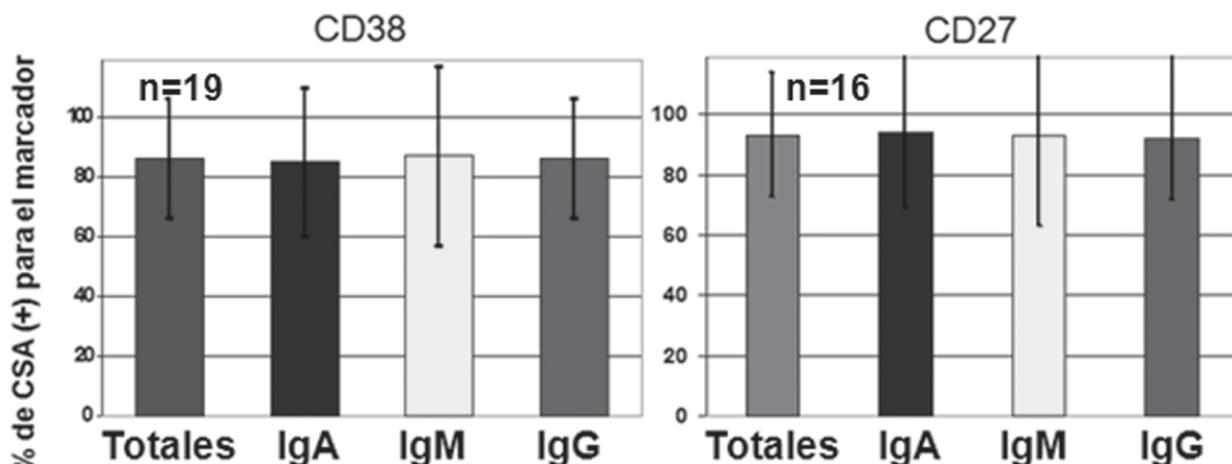
isotipos y no hubo relación entre la expresión del marcador y la capacidad de producción de IgG, IgM o IgA (Fig. 2). Estos resultados demuestran que el CD38 y CD27 son moléculas de superficie expresados en la mayoría de las CSA y que su expresión es independiente del isotipo producido por la célula.

### Detección de CSA por ELISPOT y CF

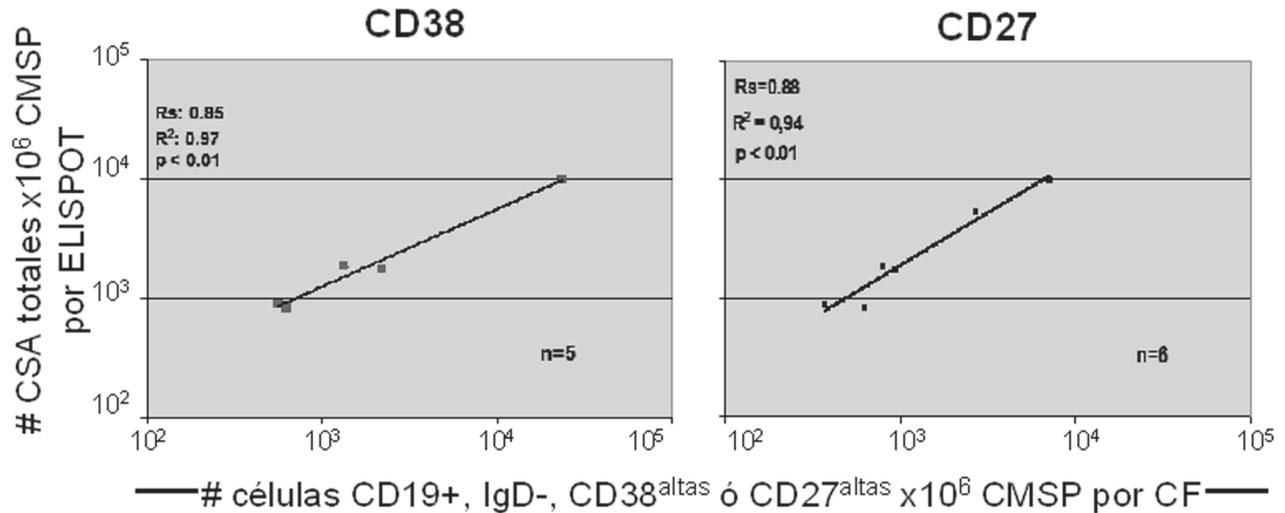
Ya que ha sido sugerido que el alto nivel de expresión de CD38 y CD27 son características fenotípicas de las CSA,<sup>(12)</sup> se procedió a comparar la frecuencia de células B IgD- (la pérdida de IgD es un marcador de células antígeno experimentadas), que expresaban altos niveles de CD38 y CD27 por CF y los resultados funcionales del ELISPOT en CMSP totales. La frecuencia de CSA totales detectadas por los dos métodos mostró una fuerte y significativa correlación tanto para CD38 como para CD27 ( $R^2=0.98$ ,  $P<0.05$  y  $R^2=1$ ,  $P<0.01$ , Spearman test, respectivamente) (Figura 3). Estos resultados muestran que la CF y el ELISPOT detectan posiblemente la misma población, hecho que soportaría aún más la idea que CD27 y CD38 están expresados sobre células que funcionalmente producen Igs.

### La expresión de CD38 y CD27 en CSA no es homogénea

Los resultados de CF y ELISPOT mostraban que el CD27 y el CD38 eran altamente expresados sobre las CSA. En apoyo de estos resultados, una importante correlación fue encontrada entre la frecuencia de células CD19+, IgD-, CD27<sup>altas</sup> y las células CD19+, IgD-, CD38<sup>altas</sup>, ambas poblaciones detectadas por CF ( $R^2: 0.96$ ,  $P<$



**Figura 2.** Un alto porcentaje de CSA expresan CD38 (izquierda) y CD27 (derecha). La frecuencia de CSA IgA, IgM e IgG que expresan cada uno de los dos marcadores es mostrada como media (barras) y error estándar de la media.

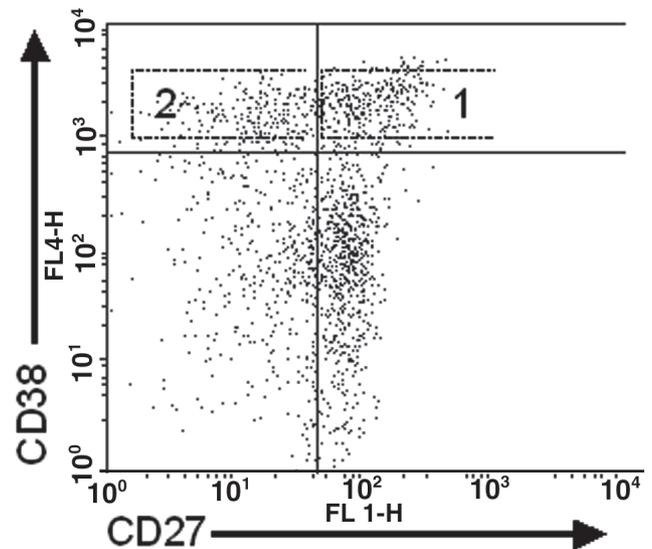


**Figura 3.** Correlación existente entre el número de CSA circulantes totales detectadas por ELISPOT (eje Y) y el número de células con fenotipo CD19+, IgD-, CD38<sup>alto</sup> (eje X, izquierda) ó CD19+, IgD-, CD27<sup>alto</sup> (eje X, derecha) detectados por CF presente en  $1 \times 10^6$  CMSP. Datos estadísticos son mostrados en la gráfica ( $n=5$ )

0.01, Spearman test,  $n=5$ , datos no mostrados). Aunque una muy importante correlación existió, la frecuencia de células B CD38<sup>alto</sup> fue dos veces mayor que la frecuencia de las células B que expresan un alto nivel de CD27 y la correlación entre ELISPOT y CF fue mucho mejor cuando el CD38 más que el CD27 fue usado como marcador. Estos hechos sugieren que la co-expresión de CD27 y CD38 sobre las CSA no es siempre constante. Para probar esto, una tinción en simultánea de CD19, IgD, CD27 y CD38 fue realizada en CMSP. En forma interesante y como había sido sugerido previamente por los dos ensayos, la expresión de CD27 y CD38 no es homogénea en las CSA. Como se ve en la Figura 4, existe una importante y homogénea población de células B que expresa altos niveles de CD38 y CD27 (ver ventana No 1). Sin embargo, también existe una población de células que son CD38<sup>altas</sup> y que son CD27 intermedias y bajas (Fig 4, ver ventana No 2). Estos resultados hacen suponer que todas las CSA probablemente son CD38<sup>altas</sup> pero que no todas las CSA son CD27<sup>altas</sup> y puede haber una importante fracción de ellas que pueden ser intermedias e incluso bajas.

#### Detección de CSA RV específicas por ELISPOT y CF

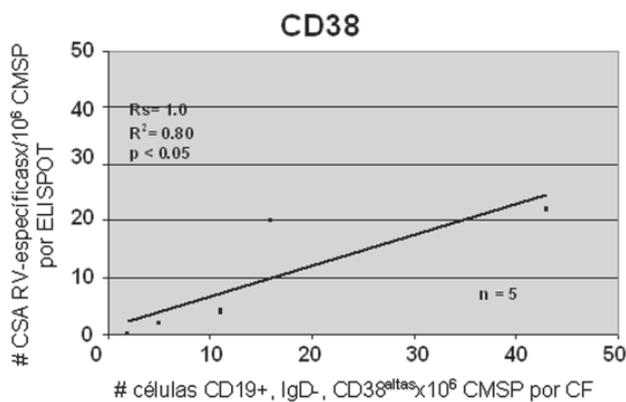
CSA antígeno- específicas circulan en voluntarios sanos en muy baja frecuencia. Ya que el CD38 y CD27 son expresados sobre la mayoría de CSA, en este estudio se utilizó la separación inmunomagnética con estos dos marcadores



**Figura 4.** Expresión heterogénea de CD38 y CD27 en CSA. CMSP fueron teñidas con CD19, IgD, CD38 y CD27. La co-expresión de CD38 y CD27 es mostrada en el recuadro 1. El Recuadro 2 muestra las células B, IgD- que son CD38<sup>altos</sup> pero CD27<sup>intermedios</sup>.

para enriquecer en CSA y aumentar así las probabilidades de detectar CSA RV-específicas. Como muestra la Figura 5, se observó una baja pero detectable frecuencia de CSA RV-específicas en las poblaciones enriquecidas en CSA por la selección positiva. El número de estas células por cada millón de CMSP estuvo entre 0 y 22 detectadas por ELISPOT y 2 a 43 detectadas por CF. La frecuencia de estas células fue de 1.5 a 2

veces mayor cuando su detección se hizo por CF que cuando se usó el ELISPOT. La Figura 5 muestra además la correlación existente entre el número de CSA RV-específicas encontradas por los dos métodos mencionados realizados en células CD38 y CD27 purificadas. Una alta correlación entre el número de células detectadas por los dos métodos ( $R_s = 1.0$ ,  $R^2 = 0.8$ ,  $p < 0.05$ ) esta también presente a nivel antigénico cuando se usa el CD38. La tinción usando al CD27 mostró un importante ruido de fondo en la CF dado tal vez por una interacción entre los Ac usados y las GFP/VLP (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que CSA antigénico específicas pueden ser detectadas en muy baja frecuencia en voluntarios sanos y que se está detectando al mismo tipo celular por ELISPOT y CF dada la alta correlación existente entre los dos métodos.



**Figura 5.** Correlación que existe entre el número de células RV-específicas detectadas por ELISPOT (eje Y) y CF (eje X), en la población purificada con CD38. Los datos estadísticos y el n son mostrados en la figura.

## DISCUSIÓN

Los rotavirus son la causa directa de la muerte de 1,600 niños al día en el mundo, afectando especialmente a países en vías de desarrollo.<sup>(18,19)</sup> En Colombia no existen estadísticas recientes sobre la incidencia de la diarrea ni mortalidad causadas por RV, pero cálculos del Ministerio de Salud muestran que aproximadamente 800 niños por año mueren en nuestro país por la gastroenteritis causada por este virus. Actualmente hay dos vacunas que han mostrado ser altamente eficientes en la prevención de las formas severas de diarrea. Entre los pocos factores

que se han asociado con protección contra la reinfección están los niveles de IgA intestinal específica de rotavirus<sup>(8,9,16)</sup>. Estudios en humanos, demostraron la fuerte correlación entre el número de CSA específicas de RV circulantes y las encontradas en la lamina propia intestinal,<sup>(4)</sup> hecho que soporta el interés en estudiar a las CSA específicas de RV que circulan en sangre, como ventana para esclarecer la respuesta intestinal al patógeno.

Las dificultades para estudiar a las CSA en personas sanas han hecho que la mayoría de estudios se hayan realizado en personas con condiciones patológicas en donde el número de CSA circulantes se encuentra aumentado, tales como la plasmocitosis reactiva,<sup>(13)</sup> mieloma múltiple ó después de inmunización activa<sup>(14)</sup>. Como ha sido sugerido por trabajos previos, una muy baja frecuencia de CSA totales circulan en los voluntarios adultos sanos (Fig. 1). El isotipo predominante fue la IgA, hecho que también concuerda con lo previamente reportado. Este hecho revela posiblemente una importante contribución de las CSA que provienen del intestino, pues es conocido que el isotipo predominante en mucosas es precisamente la IgA<sup>(7)</sup>.

Trabajos previos han sugerido características de CSA circulantes Ag específicas, como el caso de CSA que han sido activadas en el intestino por patógenos de mucosas<sup>(10, 12, 24)</sup>. Según estos trabajos, el fenotipo de las CSA circulantes es CD19+, IgD-, CD38<sup>alto</sup>, además expresan los marcadores de migración intestinal mejor caracterizados que son la integrina  $\alpha 4\beta 7$  y el receptor de quimoquinas CCR9<sup>(5, 12)</sup>. Con un método que utiliza partículas virales recombinantes para la proteína verde fluorescente, se ha determinado que las células que expresan Ig de membrana específica de RV expresan también en su mayoría estos marcadores de migración, hecho que concuerda con la hipótesis actualmente aceptada de los patrones de migración intestinal<sup>(10)</sup>. Con el CD38, hay otros marcadores que se han asociado recientemente con el fenotipo de CSA circulantes, uno de ellos es el CD27<sup>(3)</sup>. Los datos presentados aquí sugieren que la gran mayoría de las CSA detectadas por su capacidad de producir Igs expresan los marcadores CD38 y CD27 (Fig. 2.) y más importante aún, que no existió una expresión diferencial de CD38 y CD27 asociada al tipo de inmunoglobulina producido por la CSA (Fig. 2.). Estos resultados tienen fuertes implicaciones ya que al usar los marcadores aquí utilizados, no se está sesgando en análisis hacia alguno de los tres isotipos analizados.

Según los resultados de este trabajo, se encontró una fuerte correlación entre el número de CSA totales detectadas por ELISPOT y las células con el fenotipo anteriormente descrito (CD19+, IgD-, CD38<sup>alto</sup> ó CD27<sup>alto</sup>) detectadas por CF. Estos datos tienen dos implicaciones importantes: en primer lugar, apoyan la idea que la detección de células con fenotipo CD19+, IgD-, CD38<sup>alto</sup> ó CD27<sup>alto</sup> por CF puede ser equiparable a la detección de CSA circulantes totales por ELISPOT. En segundo lugar, indican que la población de células B, IgD-, CD38<sup>alto</sup> puede corresponder a misma la población CD19, IgD-, CD27<sup>alto</sup>. Sin embargo, aunque una buena correlación estuvo presente, ésta correlación siempre favorecía a las células CD38+. Puede ser que todas las CSA circulantes son CD38<sup>alto</sup>, pero no CD27<sup>alto</sup> (Fig. 4). Si todas las CSA circulantes no expresan en alto nivel el CD27, estamos dejando por fuera del análisis de CF una parte de CSA que no son altas para la expresión de CD27. Este hecho también explicaría él porque tenemos una mejor correlación entre el ELISPOT de CSA totales y la CF para CD38 en CMSP. La expresión no homogénea de los marcadores analizados en las CSA puede reflejar varios estados de diferenciación celular que pueden estar presentes en esta población. Hoy se sabe por ejemplo que las CSA son precisamente una heterogénea población que recoge a todas las células B que están migrando hacia su tejido blanco. En un estudio que utilizó una metodología diferente, se demostró que toda célula B, IgD-, CD38<sup>alto</sup>, presenta también inmunoglobulina por tinción intracelular<sup>(17)</sup>.

Al obtenerse con CD38 y CD27 los mejores resultados de recuperación y pureza de las poblaciones, se decidió iniciar el análisis de las CSA virus específicas utilizando la selección positiva con estos dos marcadores para enriquecer en CSA, hecho que aumenta las probabilidades de detectar una CSA específica de RV. Para la población CD38 positiva, se encontró una muy fuerte correlación entre las células detectadas por ELISPOT y CF, lo que implica que posiblemente las células que se analizan corresponden a una misma población. Este hallazgo además implica que una CSA circulante específica de RV expresa un alto nivel CD38 (Fig. 5). Para CD27, la correlación entre ELISPOT y CF no fue buena, siendo mucho más baja que para CD38 (datos no mostrados). El número de células B efectoras antígeno específicas detectadas por CF en la población CD27+, fue mucho más alto que la frecuencia de una célula B antígeno específica en una persona sana reportadas para otros

antígenos.<sup>(3)</sup> Todas las comparaciones que involucraron a las CSA virus específicas con la separación o tinción para CD27, no establecieron buenas correlaciones. Estos datos hacen pensar que el ensayo para detección de CSA virus específicas por CF utilizando al CD27 como marcador, tiene un problema de ruido de fondo, probablemente debido a interacciones no específicas de las GFP-VLP favorecidas por la utilización de anticuerpo anti CD27.

Estos resultados permiten sugerir que las CSA circulantes y específicas de RV fueron detectadas por ELISPOT y CF previo enriquecimiento con selección de células CD38+. Con estos resultados, se muestran ciertas características fenotípicas de las CSA circulantes totales y específicas de RV que serían muy útiles si se piensa en la CSA como un importante elemento en el estudio de la repuesta inmune generada ante infección natural o vacunación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Angel, J., M. A. Franco, and H. B. Greenberg. 2007. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol* 5:529-39.
2. Arce, E., D. G. Jackson, M. A. Gill, L. B. Bennett, J. Banchemreau, and V. Pascual. 2001. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 167:2361-9.
3. Bernasconi, N. L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298:2199-202.
4. Brown, K. A., J. A. Kriss, C. A. Moser, W. J. Wenner, and P. A. Offit. 2000. Circulating Rotavirus-Specific Antibody-Secreting Cells (ASCs) Predict the Presence of Rotavirus-Specific ASCs in the Human Small Intestinal Lamina Propria. *J Infect Dis* 182:1039-1043.
5. Butcher, E. C., M. Williams, K. Youngman, L. Rott, and M. Briskin. 1999. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72:209-253.
6. Charpilienne, A., M. Nejmeddine, M. Berois, N. Parez, E. Neumann, E. Hewat, G. Trugnan, and J. Cohen. 2001. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J Biol Chem* 276:29361-7.
7. Fagarasan, S., and T. Honjo. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 3:63-72.

8. Franco, M. A., J. Angel, and H. B. Greenberg. 2006. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 24:2718-31.
9. Franco, M. A., and H. B. Greenberg. 1995. Role of B cells and Cytotoxic T Lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol* 69:7800-7806.
10. Gonzalez, A. M., M. C. Jaimes, I. Cajiao, O. L. Rojas, J. Cohen, P. Pothier, E. Kohli, E. C. Butcher, H. B. Greenberg, J. Angel, and M. A. Franco. 2003. Rotavirus-specific B cells induced by recent infection in adults and children predominantly express the intestinal homing receptor alpha4beta7. *Virology* 305:93-105.
11. Greenberg, H. B., and M. K. Estes. 2009. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* 136:1939-51.
12. Jaimes, M. C., O. L. Rojas, E. J. Kunkel, N. H. Lazarus, D. Soler, E. C. Butcher, D. Bass, J. Angel, M. A. Franco, and H. B. Greenberg. 2004. Maturation and trafficking markers on rotavirus-specific B cells during acute infection and convalescence in children. *J Virol* 78:10967-76.
13. Jeco, G., N. Robillard, D. Puthier, M. Amiot, F. Accard, D. Pineau, J. L. Harousseau, R. Bataille, and C. Pellat-Deceunynck. 1999. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 94:701-12.
14. Kantele, A. 1990. Antibody-secreting cells in the evaluation of the immunogenicity of an oral vaccine. *Vaccine* 8:321-326.
15. Kantele, J. M., A. Kantele, and H. Arvilommi. 1996. Circulating immunoglobulin-secreting cells are heterogeneous in their expression of maturation markers and homing receptors. *Clin Exp Immunol* 104:525-30.
16. McNeal, M. M., K. S. Barone, M. N. Rae, and R. L. Ward. 1995. Effector functions of antibody and CD8+ cells in resolution of rotavirus infection and protection against reinfection in mice. *Virology* 214:387-97.
17. Medina, F., C. Segundo, A. Campos-Caro, I. Gonzalez-Garcia, and J. A. Brieva. 2002. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 99:2154-61.
18. Parashar, U. D., C. J. Gibson, J. S. Bresse, and R. I. Glass. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12:304-6.
19. Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresse, M. A. Miller, and R. I. Glass. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9:565-72.
20. Perez, N., A. Garbarg-Chenon, C. Fournieux, F. Le Deist, A. Servant-Delmas, A. Charpilienne, J. Cohen, and I. Schwartz-Cornil. 2004. The VP6 Protein of Rotavirus Interacts with a Large Fraction of Human Naive B Cells via Surface Immunoglobulins. *J Virol* 78:12489 - 12496.
21. Rojas, O. L., C. F. Narvaez, H. B. Greenberg, J. Angel, and M. A. Franco. 2008. Characterization of rotavirus specific B cells and their relation with serological memory. *Virology* 380:234-42.
22. Ruiz-Palacios, G. M., I. Perez-Schael, F. R. Velazquez, H. Abate, T. Breuer, S. C. Clemens, B. Cheuvart, F. Espinoza, P. Gillard, B. L. Innis, Y. Cervantes, A. C. Linhares, P. Lopez, M. Macias-Parra, E. Ortega-Barria, V. Richardson, D. M. Rivera-Medina, L. Rivera, B. Salinas, N. Pavia-Ruz, J. Salmeron, R. Ruttimann, J. C. Tinoco, P. Rubio, E. Nunez, M. L. Guerrero, J. P. Yarzabal, S. Damaso, N. Tornieporth, X. Saez-Llorens, R. F. Vergara, T. Vesikari, A. Bouckennooghe, R. Clemens, B. De Vos, and M. O'Ryan. 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 354:11-22.
23. Vesikari, T., D. O. Matson, P. Dennehy, P. Van Damme, M. Santosham, Z. Rodriguez, M. J. Dallas, J. F. Heyse, M. G. Gouveia, S. B. Black, H. R. Shinefield, C. D. Christie, S. Ylitalo, R. F. Itzler, M. L. Coia, M. T. Onorato, B. A. Adeyi, G. S. Marshall, L. Gothefors, D. Campens, A. Karvonen, J. P. Watt, K. L. O'Brien, M. J. DiNubile, H. F. Clark, J. W. Boslego, P. A. Offit, and P. M. Heaton. 2006. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 354:23-33.
24. Youngman, K. R., M. A. Franco, N. A. Kuklin, L. S. Rott, E. C. Butcher, and H. B. Greenberg. 2002. Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol* 168:2173-81.