



Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

TESIS DOCTORAL

**Efecto del VIH-1 en la desregulación de los
linfocitos B. Papel de dendrímeros carbosilano en la
respuesta inflamatoria, como agentes transfectantes y
en la polarización de macrófagos de tipo M2.**

Memoria presentada por la Licenciada en Biología

Ana Judith Perisé Barrios

para optar al grado de

Doctora en Biología Molecular.

Directoras de Tesis:

Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández

Dra. Marjorie Pion

Lugar de realización:

Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular

Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Madrid, 2013

Esta Memoria ha sido realizada en el Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid. El trabajo experimental que se recoge en esta Memoria ha sido financiado por el proyecto europeo EuroNanoMed 2010, Fondos de Investigación Sanitaria (INTRASALUD PI09/02029, PS09/02669, PS09/02523), la Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria ISCIII (RETIC RD06/0006/0035 y RD12-0017-0037), INDISNET S-2011-BMD2332, FIPSE, y COST action TD0802.

La Doctora M^a Ángeles Muñoz-Fernández, Jefe de Sección del Servicio de Inmunología, Jefe del Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular y Directora del BioBanco VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, y la Doctora Marjorie Pion, Investigador Senior del Programa Ramón y Cajal en el Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón,

CERTIFICAN QUE,

el trabajo de investigación y la redacción de la Tesis Doctoral titulada “Efecto del VIH-1 en la desregulación de los linfocitos B. Papel de dendrímeros carbosilano en la respuesta inflamatoria, como agentes transfectantes y en la polarización de macrófagos de tipo M2.”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por Ana Judith Perisé Barrios. Revisado el trabajo, lo consideramos satisfactorio y autorizamos su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste a todos los efectos, firmamos el presente documento.

Madrid, 4 de Noviembre de 2013.

Fdo. Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández

Fdo. Dra. Marjorie Pion

A mis padres,

y en especial al chico que me quitaba la pelota en el portal.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mis padres todo lo que han hecho por mí, porque si he llegado hasta aquí, es gracias a ellos. Gracias por apoyarme siempre en todas mis decisiones. Gracias por ser un ejemplo de constancia y perseverancia en el trabajo. Gracias por enseñarme y educarme cómo lo habéis hecho. Evita, por haber crecido juntas, gracias por tus mimos y por seguir buscando el cariño.

Flori, gracias por cuidarme desde siempre, por haberme dado todo el cariño que se necesita para ser feliz, y gracias por estar conmigo cada día. Jose, tenías razón, el cielo esta hecho para los que quieren volar. Gracias por estar a mi lado todo este tiempo, por no dejar que me sienta nunca sola, por calmarme cuando me desespero y por animarme cuando lo necesito.

Alberto, no me preocupa el tiempo que he estado sin ti, solamente me preocupa si voy a vivir lo suficiente para estar a tu lado todo lo que me gustaría, porque, permíteme que la tome prestada, “soy mucho menos sin ti”.

Por supuesto, este trabajo no hubiese sido posible sin la labor tanto profesional como personal de M^a Ángeles. Muchas gracias por apostar por mí, por darme la oportunidad de trabajar en tu grupo y por tu apoyo y esfuerzo para que el trabajo saliera adelante, y por tus ánimos en el día a día. Todo ello hace que el trabajo sea más agradable. Marjorie, gracias por introducirme en el mundo de la investigación, por enseñarme la importancia del rigor científico y por transmitirme la ilusión por la ciencia. Gracias también por entenderme y por no haber dejado nunca de ayudarme. Debo darte las gracias de un modo especial por esta última parte de mi tesis, gracias por toda la implicación y dedicación para que esto saliera bien. Ángel, muchas gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y acogerme tan amablemente. Gracias también por todos los consejos y por las facilidades que siempre me has dado para trabajar con vosotros. Maite gracias por creer.

Miguel, gracias por tener siempre tiempo para mí, por tus consejos, sugerencias, por las aportaciones para que pueda mejorar día a día. Gracias por tu ayuda incondicional. Ricardo, gracias por tus ideas y por tus comentarios críticos para mejorar el trabajo, pero sobretodo, gracias por transmitir ilusión por este trabajo. Rafa C, gracias por tus ánimos constantes durante todo este tiempo, por tu ayuda y tus correcciones.

Marta, Verónica, Isa y Maribel, muchas gracias por vuestro cariño y vuestros ánimos, porque es un enorme privilegio tener a alguien como vosotras como compañeras de trabajo. Marta, debo darte las gracias de un modo especial por estos últimos meses que no han sido nada fáciles, gracias por seguir a mi lado. Verónica, no sé cómo podré agradecerte todo el tiempo que has dedicado para que esto saliera adelante, gracias por tu perseverancia en el día y a día. Isa, gracias por tu complicidad y comprensión. Maribel, gracias por las palabras indicadas para cada momento, gracias por los gestos de cariño que son lo más importante para empezar cada día con ilusión. Raquel, mi compañera expatriada a inmuno2, nos mudamos pero finalmente todo fue genial. Gracias por estar a mi lado (nunca mejor dicho), por ayudarme en todo sin que hiciera falta pedirlo, por no dejar que me sintiera sola. Gracias por tu amistad. Chusa, gracias por tu apoyo durante todo este tiempo, por estar siempre disponible para resolver dudas y ayudarme en lo que haga falta. En especial, gracias por tu ayuda con los ratoncitos, la próxima vez procuraremos localizar la entrada antes de aparcar. Susana, gracias por tus palabras de ánimo constantes durante todo este tiempo. Gracias Laura por estar siempre cerca y por tus consejos. Espero que cuando te mudes nos des hora en tu diván. Pepa y Lola, gracias por facilitarme la integración en el grupo, por vuestros consejos y paciencia conmigo. Irene L, gracias por intentar que todos estemos a gusto con el trabajo. Luis y Mabela muchas gracias por vuestra ayuda y consejos, gracias por adoptarme al principio unas temporadas largas en vuestro labo. Gracias Santi por tus seminarios de trenes, por intentar siempre amenizar los jueves un poco más. Gracias por tus mensajes de ánimo durante este tiempo.

A mis vecinos de labo. Jose, Jorge, Coral y Almu. Gracias chicos por ayudar cuando se necesita, gracias por tener siempre una sonrisa y ese buen humor para hacer las jornadas más llevaderas. Quique, Javi, Dani y Pilar, muchas gracias por ofrecer siempre vuestra ayuda, gracias en especial por

el tema informático y por la paciencia que tenéis conmigo y con mi ordenador. Sandra L, Didiana, Irene C, gracias por los buenos momentos y las risas para desconectar de esto. Amaya, muchas gracias por tu disposición para la ayuda siempre que lo he necesitado. Blanca, gracias por tu paciencia con las PCR y por tener siempre un ratito para mis dudas.

Gracias a toda la gente de Alcalá, a Javi y a Rafa y a toda su gente, pero en especial, gracias a Paula, Sandra y Javi S-N, por estar siempre dispuestos a ayudar en todo lo necesario.

Ángeles, gracias por introducirme en el mundo de los macrófagos y por haberme facilitado la integración en el grupo de trabajo. A los chicos del grupo del CIB, Elena, María, Concha, Sonia, Noemí y en especial a Mateo, muchas gracias por toda la ayuda durante este tiempo, por resolver mis dudas al otro lado del teléfono, por facilitarme el trabajo, por ayudarme con los problemillas que iban surgiendo, pero lo más importante, por ser tan majos, muchísimas gracias chicos, ha sido un placer trabajar a vuestro lado. Quería agradecer también la labor profesional y la predisposición de Dani y Olivia, los chicos del animalario.

Gracias a todos los que siempre me acompañan en el camino.

Summary

This work is divided into two main subjects: “the effect of HIV-1 on the deregulation of B lymphocytes”, and “the role of carbosilane dendrimers in inflammatory response, as transfecting agents and, on the polarization of M2-type macrophages”.

PART I:

B cells are a critical component of the adaptive immune system, due to its capacity of producing highly specific antibodies. During HIV infection, patients with AIDS could exhibit hyperimmunoglobulinemia, increased expression of cell-activation markers, depletion of memory B cells, polyclonal B-cell hyperactivity, and altered differentiation of naïve B cells that could result in impaired immunoglobulin class switch recombination (CSR), and thus production of nonspecific immunoglobulin (Ig) G, IgE and IgA antibodies. All of these processes finally provoke the exhaustion of B-cell and defective responses against opportunistic pathogens. However, little is known about the molecular mechanism responsible of the B-cell deregulation and whether it is due to a direct effect of HIV on B cells.

In this study we have evaluated the effects of a direct exposition of B cells to HIV-1 particles in order to identify and describe the deregulation of B cells by HIV-1 evaluating CSR, AID protein expression, AID-related miRNA expression and Ig production in an environment free of T lymphocytes. We showed that HIV-1 particles deregulate human primary B cells, increasing their survival, proliferation, modifying their phenotype and function on cultured B-cell. Moreover, expression level of AID mRNA in human primary B cells was highly increased and its subsequent IgM/IgE; IgM/IgA and IgM/IgG class switch was detected *in vitro*. Finally, the results indicate that the mechanism by which HIV-1 deregulates B cells is through the BCR/SYK signaling pathway, promoting the mobilization of BCR in the membrane, which leads to the activation of JNK. In summary, in this study we have demonstrated that direct contact between HIV-1 particles and B-cell was sufficient to induce a deregulation of B-cell. The model *in vitro* developed in this study, which is independent of CD4 T cells and CD40L, can be useful to study the mechanisms of B-cell deregulation in the context of HIV infection. In addition, these results may highlight a possible relation between HIV-1 infection and B cells hyperactivation, loss of memory B cells or hyperglobulinemia. By all that, these results contribute to the better understanding of the general immune deregulation observed in HIV-1 patients, and allow us to lay the groundwork for development of better anti-HIV vaccines.

PART II:

New objectives of nanomedicine consist in developing and characterizing nanoparticles as new preventive treatment, therapeutic or diagnostic tools with the aim to improve current treatments. The major advantage of carbosilane dendrimers is based on their regular structure and

skeletons and surfaces easy to modify. Moreover, carbosilane dendrimers can be used as molecules that have an effect *per se* in the treatment of HIV-1, in autoimmune diseases and inflammation, as well as molecules that can shuttle nucleic acids and drugs to the cell interior.

We have studied the ability of cationic dendrimers 2G-NN16 and 2G-03NN24 to transfect siRNA-Nef in CD4 T lymphocytes, in the context of HIV-1. The results have shown that both dendrimers are able to form stable complexes with siRNA and protect them against RNase. Both dendrimers facilitate CD4 T lymphocytes transfection with siRNA. The 2G-03NN24 dendrimer is better transfectant than 2G-NN16. Our results indicate that 2G-03NN24 could protect its cargo better than 2G-NN16. We have also studied the effect of 5 carbosilane dendrimers (anionic dendrimer 2G-S16 and cationic dendrimers 2G-NN16, 1G-03NN12, 2G-03NN24 and 3G03NN48) on M1 macrophages. Dendrimers did not induce the release of TNF- α , IL-12p40, CCL3, CCL4, IL-1 β and IL-6. Especially, 2G-NN16 decreased the expression of several genes implicated in the pro-inflammatory function of M1 macrophages, suppressed the expression of TNF- α and IL-12p40. These data indicate that 2G-NN16 has a slightly non-inflammatory effect, which could be beneficial in HIV therapy because local inflammation allows higher cell activation, which facilitates the HIV-1 infection. An additional effect of the 2G-03NN24 is the decreased expression of the CCR2 co-receptor which is involved in macrophage infection by HIV-1. The results obtained with different dendrimers in M1 open promising lines of research, suggesting that they could be used as safe biological agents without promoting inflammation and that they could be useful for the treatment of several medical conditions.

Since most of the tumor-associated macrophages (TAM) are similar to M2, we have also studied the role of carbosilane dendrimers on M2 macrophages to determine if they are able to induce a switch on the macrophages phenotype, to evaluate the potential application of dendrimers in tumor immunotherapy. Tumor microenvironment favours the escape from immunosurveillance, promoting anti-inflammatory responses and inhibiting pro-inflammatory ones. The 2G-03NN24 dendrimer decreases the production of IL-10 by the LPS-stimulated M2 macrophages and also switches the M2 genetic phenotype to a M1 phenotype. Furthermore, this dendrimer decreases the activity of STAT3 by diminishing its phosphorylation through the PDGFR and EGFR receptors pathways. *In vivo*, dendrimer-treated tumors show that the TAM over-express iNOS, a protein typically expressed by the M1, that possess anti-tumor properties. In addition, other changes induced by the dendrimer would create a more favorable microenvironment within tumors as seen in preliminary *in vivo* studies. Results indicate that 2G-03NN24 dendrimer might be used for the therapy of tumors through its ability to suppress polarization of M2 macrophages, generally associated with tumor proliferation. These results are very encouraging showing that the 2G-03NN24 dendrimer can be a new anti-tumor compound.

Índice

Abreviaturas y acrónimos	1
1. Introducción	13
1.1. Los linfocitos B	15
1.1.1. Receptor de las células B: BCR	16
1.1.2. Recombinación de cambio de clase e hipermutación somática	18
1.1.3. La proteína AID y su regulación mediante miRNA	19
1.1.4. Activación y diferenciación de las células B dependiente o independiente de las células T	20
1.2. VIH-1 y SIDA	21
1.2.1. Células diana del VIH-1 y desregulación del sistema inmune	21
1.2.2. Desregulación de los linfocitos B por el VIH-1	22
1.3. Macrófagos	23
1.3.1. Sistema inmune innato	23
1.3.2. Macrófagos	24
1.3.2.1. Citoquinas encargadas de la diferenciación de macrófagos	24
1.3.2.2. Polarización de macrófagos de tipo M1 y M2	25
1.3.2.3. Expresión de quimioquinas por los macrófagos M1 y M2	27
1.3.3. Macrófagos asociados a tumores	28
1.4. Dendrímeros	30
1.4.1. Estructura de los dendrímeros	31
1.4.2. Aplicaciones biomédicas de los dendrímeros	33
1.4.2.1. Aplicaciones de los dendrímeros neutros	33
1.4.2.2. Aplicaciones de los dendrímeros aniónicos	33
1.4.2.3. Aplicaciones de los dendrímeros catiónicos	34
2. Objetivos	37
3. Material y métodos	41
3.1. Material	43
3.1.1. Medios de cultivo y soluciones	43
3.1.2. Cultivos celulares primarios	43
3.1.3. Cultivos de líneas celulares	44
3.1.4. Dendrímeros	45
3.1.5. Inhibidores de quinasas	47
3.2. Métodos I	47
3.2.1. Producción de VIH-1 _{NL4.3}	47
3.2.2. Cuantificación del aislado VIH-1 _{NL4.3}	48

3.2.3. Citometría de CD40L en células MT-2 y CMSP	48
3.2.4. Tratamiento de las células B	48
3.2.5. Ensayos de citotoxicidad en las células B con 7AAD	49
3.2.6. Ensayo de proliferación de las células B	49
3.2.7. Determinación de la activación y fenotipo de las células B	50
3.2.8. Extracción del mRNA y cuantificación de la proteína AID por PCR cuantitativa	50
3.2.9. Extracción de miRNA y cuantificación por PCR cuantitativa	51
3.2.10. Determinación de proteínas por <i>western blot</i>	51
3.2.11. Cuantificación de inmunoglobulinas en el sobrenadante celular	52
3.2.12. Cuantificación de inmunoglobulinas en las células B	53
3.3. Métodos II	53
3.3.1. Ensayo de citotoxicidad por MTT en los linfocitos T CD4	53
3.3.2. Ensayo de proliferación en los linfocitos T CD4	53
3.3.3. Silenciamiento específico de la proteína Nef	54
3.3.4. Formación del dendriplex, estabilidad y protección frente a las RNAsas	54
3.3.5. Eficiencia de transfección del siRNA-Nef en linfocitos T CD4	54
3.3.6. Efecto de inhibición de la replicación del VIH-1 en linfocitos T CD4	55
3.4. Métodos III y IV	55
3.4.1. Ensayos de citotoxicidad en los macrófagos	55
3.4.2. Cuantificación de proteínas en el sobrenadante celular de los macrófagos	55
3.4.3. Análisis de la expresión génica en macrófagos	56
3.4.4. Análisis de la expresión del mRNA en macrófagos	57
3.4.5. Ensayo de proliferación de las células k562	57
3.4.6. Ensayo de fagocitosis en los macrófagos de tipo M2	57
3.4.7. Análisis de la fosforilación de proteínas en los macrófagos de tipo M2	58
3.4.8. Inducción y estudio de tumores en ratones C57BL/6	58
3.4.9. Análisis de la expresión de iNOS por citometría de flujo	59
3.5. Análisis estadístico	60
4. Resultados	61
4.1. Desregulación de las células B por el VIH-1	63
4.1.1. Desregulación fenotípica de las células B por el VIH-1	63
a) Viabilidad de las células B <i>in vitro</i>	63
b) Proliferación de las células B <i>in vitro</i>	65
c) Activación de las células B	66
d) Desregulación del fenotipo de las células B	68

4.1.2. Desregulación de la expresión de la proteína AID, de los miRNA asociados a su expresión y de la inducción de CSR	72
a) Expresión de la proteína AID	72
b) Desregulación de los miRNA asociados a la proteína AID	73
c) Recombinación de cambio de clase de las inmunoglobulinas	74
4.1.3. Implicación de JNK y del BCR en la desregulación de las células B	77
a) Expresión de los marcadores de activación y vías de señalización de JNK y SYK	77
b) Fosforilación de JNK y SYK	79
c) Inhibición de la expresión de AID mediante los inhibidores de quinasas	81
4.2. Estudio de los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24 como agentes transfectantes en linfocitos T CD4	82
a) Citotoxicidad de los dendrímeros en linfocitos T CD4	82
b) Proliferación de los linfocitos T CD4	83
c) Silenciamiento específico de la proteína nef mediante el uso de siRNA-Nef	84
d) Formación del dendriplex, estabilidad y protección frente a la RNAsa	85
e) Citotoxicidad de los dendriplex en los linfocitos T CD4	87
f) Eficiencia de transfección del siRNA-Nef en linfocitos T CD4	87
g) Efecto de inhibición de la replicación del VIH-1 en linfocitos T CD4	88
4.3. Efecto de los dendrímeros carbosilano en macrófagos de tipo M1	90
a) Citotoxicidad de los dendrímeros en macrófagos de tipo M1	90
b) Respuesta inflamatoria de los macrófagos de tipo M1	92
c) Patrón de expresión génica de los macrófagos de tipo M1	93
d) Expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas de los macrófagos de tipo M1	95
e) Funcionalidad de los macrófagos de tipo M1	96
4.4. Cambio de fenotipo de los macrófagos de tipo M2 mediado por el dendrímero 2G-03NN24	98
a) Citotoxicidad asociada a los dendrímeros en los macrófagos de tipo M2	98
b) Modificaciones en la liberación de citoquinas de los macrófagos de tipo M2	99
c) Cambios en el patrón de expresión génica de los macrófagos de tipo M2	101
d) Pérdida de funcionalidad en la fagocitosis de los macrófagos de tipo M2	105
e) Adquisición de nuevas funciones de los macrófagos de tipo M2	107
f) Fosforilación de quinasas y de sus proteínas diana en los macrófagos de tipo M2	108
g) Efectos del dendrímero 2G-03NN24 sobre los TAM en un modelo murino	111

5. Discusión	117
5.1. Desregulación de las células B por el VIH-1	119
5.2. Estudio de los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24 como agentes transfectantes en linfocitos T CD4	123
5.3. Efecto de los dendrímeros carbosilano sobre macrófagos de tipo M1	125
5.4. Cambio de fenotipo de los macrófagos M2 mediado por el dendrímero 2G-03NN24	128
6. Conclusiones	135
7. Bibliografía	139
8. Anexo	157

Abreviaturas y acrónimos

La mayoría de las abreviaturas y acrónimos utilizados en esta Tesis Doctoral proceden del inglés, y como tal se han mantenido. En algunos casos se ha utilizado la nomenclatura española.

La norma que se ha mantenido durante toda la Tesis Doctoral para la escritura de las abreviaturas es la siguiente: los nombres de los genes humanos deben escribirse completamente en mayúsculas y cursiva, las proteínas humanas en mayúsculas y letra redonda, los genes de ratón con la primera letra en mayúscula y en cursiva, y las proteínas de ratón con la primera letra en mayúscula y en letra redonda. Sin embargo, en el listado de abreviaturas que se presenta a continuación se muestran todos los nombres en letra redonda.

-Números-

7AAD: 7-Actinomicina-D.

-A-

Ac: anticuerpo.

Acs: anticuerpos.

ACTB: del inglés *actin beta*.

ADORA3: del inglés *adenosine A3 receptor*.

Ag: antígeno.

Ags: antígenos.

AID: del inglés *activation-induced cytidine deaminase*. También conocida como AICDA.

AKT: del inglés *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*. También conocida como *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*, como PKB (*protein kinase B*) o por ambos nombres Akt/PKB.

AKT1: gen que codifica la proteína AKT (del inglés *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*).

ALDH1A2: del inglés *aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2*.

AP-1: del inglés *activator protein 1*. También conocida como c-Jun.

APC: del inglés *antigen presenting cells*.

ATP: adenosín-trifosfato.

-B-

BAFFR: del inglés *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C*. También conocida como TNFRSF13C.

BCR: del inglés *B cell receptor*.

BSA: del inglés *bovine serum albumin*.

-C-

CCL: del inglés *chemokine (C-C motif) ligand*. Extensivo para las abreviaturas **CCL1** (también conocida como I-309 o TCA-3), **CCL2** (también conocida como MCP-1; del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*), **CCL3** (también conocida como MIP-1 alpha; del inglés *macrophage inflammatory protein 1 alpha*), **CCL4** (también conocida como MIP-1 beta; del inglés *macrophage inflammatory protein 1 beta*), **CCL5** (también conocida como RANTES; del inglés *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), **CCL6** (también conocida como C10 o MRP-2), **CCL7** (conocida como MARC o MCP-3; del inglés *monocyte-specific chemoattractant protein-3*), **CCL13** (también conocida como MCP-4 (del inglés *monocyte-specific chemoattractant protein-4*), **CCL17** (conocida como TARC; del inglés *thymus and activation regulated chemokine*), **CCL18** (conocida como PARC, DC-CK1, AMAC-1, Ckβ7 o MIP-4; del inglés *macrophage inflammatory protein 4*), **CCL19** (conocida como MIP-3 beta; del inglés *macrophage inflammatory protein 3 beta*), **CCL21** (conocida como SLC; del inglés *secondary lymphoid-tissue chemokine*), **CCL22** (conocida como MDC o DC/β-CK), **CCL23** (conocida como MPIF-1; del inglés *myeloid progenitor inhibitory factor 1*, Ckβ8 o MIP-3; del inglés *macrophage inflammatory protein 3*) y **CCL24** (conocida como Eotaxin-2, MPIF-2; del inglés *myeloid progenitor inhibitory factor 2*, o Ckβ6).

CCR: del inglés *chemokine (C-C motif) receptor*. Extensivo para las abreviaturas **CCR1** (también conocido como CD191), **CCR2** (también conocido como CD192), **CCR5** (también conocido como CD195) y **CCR7** (también conocido como CD197).

CCRL2: del inglés *chemokine (C-C motif) receptor-like 2*.

CD: células dendríticas.

CD: del inglés *cluster of differentiation*. Extensivo para las abreviaturas **CD4**, **CD10**, **CD16** (también conocido como *low-affinity FcγRIII*), **CD19**, **CD20**, **CD21** (también conocido como CR2; del inglés *complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2*), **CD23**, **CD27**, **CD40**, **CD40L** (CD40 ligando; también conocido como CD154), **CD45**, **CD69**, **CD71**, **CD72**, **CD81** y **CD163**.

CDKN1B: gen que codifica la proteína p27. Del inglés *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*.

cDNA: del inglés *complementary deoxyribonucleic acid*.

CFSE: del inglés *carboxyfluorescein succinimidyl ester*.

CG: centro germinal.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

COL23A1: del inglés *collagen, type XXIII, alpha 1*.

CREB1: del inglés *cAMP responsive element binding protein 1*.

CSF1: del inglés *colony stimulating factor 1*. Gen que codifica el factor de crecimiento M-CSF (del inglés *macrophage colony-stimulating factor*).

CSR: del inglés *class switch recombination*.

CTNNB1: gen que codifica la proteína βcatenina, del inglés *catenin (cadherin-associated protein), beta 1*.

CXCL: del inglés *chemokine (C-X-C motif) ligand*. Extensivo para **CXCL1** (también conocido como GRO-α, del inglés *growth-regulated protein alpha*), **CXCL10** (conocido como IP-10, del inglés *interferon gamma-induced protein 10*), **CXCL13** (conocido como BLC, del inglés *B lymphocyte chemoattractant*), **CXCL2** (conocido como MIP2-alpha, del inglés *macrophage inflammatory protein 2-alpha*; Gro-β, del

inglés *growth-regulated protein beta*; o Gro-2, del inglés *Gro oncogene-2*). **CXCL3** (conocido como MIP2-b, del inglés *macrophage inflammatory protein 2-beta*; GRO- γ , del inglés *growth-regulated protein gamma*; o Gro-3, del inglés *Gro oncogene-3*), **CXCL4** (también conocido como PF4 (del inglés *platelet factor 4*), **CXCL5** (conocido como ENA-78, del inglés *epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78*), **CXCL6** (conocido como GCP, del inglés *granulocyte chemotactic protein*), **CXCL7** (también conocido como PBP, del inglés *pro-platelet basic protein*), **CXCL8** (conocido como IL-8 (*interleuquina 8*)) y **CXCL9** (conocido como MIG (del inglés *monokine induced by gamma interferon*)).

CXCR: del inglés *chemokine (C-X-C motif) receptor*. Extensivo para **CXCR2** y **CXCR4** (conocido como CD184, del inglés *cluster of differentiation 184*).

-D-

DAG: D-1,2-diacilglicerol.

DAMP: del inglés *damage-associated molecular pattern molecules*.

DAPI: del inglés *4',6-diamidino-2-phenylindole*.

DC-SIGN: de inglés *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*. También conocida como CD209 (del inglés *cluster of differentiation 209*).

DMSO: dimetil sulfóxido.

DNA: del inglés *deoxyribonucleic acid*.

-E-

E. coli: *Escherichia coli*.

ECD: del inglés *phycoerythrin-texas red conjugate*.

ECSCR: del inglés *endothelial cell-specific chemotaxis and apoptosis regulator*.

EGF: del inglés *epidermal growth factor*.

EGFR: del inglés *epidermal growth factor receptor*. También conocido como ErbB-1.

EGLN3: del inglés *Egl nine-like protein 3 isoform*. Gen que codifica la proteína PHD3 (*Prohyl Hydroxylase 3*), también conocida como HIFP4H3 o HIFPH3 (del inglés *hypoxia-inducible factor prohyl hydroxylase 3*).

ELISA: del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.

EMR1: del inglés *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*. La proteína homóloga en ratón es conocida como F4/80.

ERK: del inglés *extracellular-signal-regulated kinase*. Extendida para **ERK1** (también conocida como MAPK3, del inglés *mitogen-activated protein kinase 3*) y para **ERK2** (conocida como MAPK1, del inglés *mitogen-activated protein kinase 1*).

-F-

FAK: del inglés *focal adhesion kinase*. Conocida como PTK2 (del inglés *protein tyrosine kinase 2*).

FBS: del inglés *fetal bovine serum*.

FDA: del inglés *food and drug administration*.

FITC: del inglés *fluorescein isothiocyanate*.

FLT1: del inglés *fms-related tyrosine kinase 1*. Gen que codifica la proteína VEGFR (del inglés *vascular endothelial growth factor receptor 1*).

FOLR2: gen que codifica la proteína FR β (del inglés *folate receptor beta*).

FOS: del inglés *V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*.

FR β : del inglés *folate receptor beta*.

FS: del inglés *forward scatter*. Detector de dispersión frontal que indica el tamaño.

FYN: del inglés *FYN oncogene related to SRC, FGR, YES*. También conocida como *OKT3-induced calcium influx regulator*.

-G-

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GFP: del inglés *green fluorescent protein*.

GM-CSF: del inglés *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*.

GRB2: del inglés *growth factor receptor-bound protein 2*.

GSK-3 β : inglés *glycogen synthase kinase-3 β* .

-H-

HCK: del inglés *hemopoietic cell kinase*.

HEK293: del inglés *human embryonic kidney cells 293*.

HMOX1: del inglés *heme oxygenase (decycling) 1*.

HPRT1: del inglés *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*.

HRG: del inglés *histidine-rich glycoprotein*.

HRP: del inglés *horse radish peroxidase*.

HSP: del inglés *heat-shock-protein*.

HSP27: del inglés *heat-shock-protein 27*. También conocida como HSPB1 (del inglés *heat shock protein beta-1*).

HSPB1: gen que codifica la proteína HSP27.

HTR2B: del inglés *5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B*.

-I-

IFN-: interferón. Extensivo para **IFN- β** (interferón beta) e **IFN- γ** (interferón gamma).

Ig: inmunoglobulina. Extensivo para **Igs** (inmunoglobulinas).

IGF1: del inglés *insulin-like growth factor 1*. También conocido como somatomedina C.

IL-: interleuquina. Extensivo para **IL-12p35** (interleuquina 12 alpha. También conocida como *natural killer cell stimulatory factor 1* o como *cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35*), y para **IL-12p40** (interleuquina 12 beta. También conocida como *natural killer cell stimulatory factor 2* o como *cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40*).

IL-1R1: del inglés *interleukin 1 receptor, type I*.

IL-1ra: del inglés *interleukin-1 receptor antagonist*.

IL12A: gen que codifica la interleuquina 12 alpha (IL-12p35).

IL12B: gen que codifica la interleuquina 12 beta (IL-12p40).

iMFI: del inglés *integrated mean fluorescence intensity*.

INHBA: del inglés *inhibin beta A*.

iNOS: del inglés *inducible nitric oxide synthase*.

IP3: inositol trifosfato.

IRF-3: del inglés *IFN regulatory factor-3*.

ITAM: del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*.

-J-

JNK: del inglés *c-Jun amino-terminal kinase*. También conocida como MAPK8.

-K-

Kb: Kilobases.

KDa: KiloDalton.

-L-

LCK: del inglés *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*.

LPS: lipopolisacárido.

LYN: del inglés *v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog*.

-M-

MAP2K1: del inglés *dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1*.

MAPK: del inglés *mitogen-activated protein kinase*. Extendida para las abreviaturas **MAPK1**, **MAPK3**, **MAPK14** (gen que codifica la proteína p38 α).

MAPKAPK: del inglés *MAPK-activated protein kinase*. Extendida para **MAPKAPK2** y **MAPKAPK5**.

MAPKK: del inglés *MAP kinase kinase*.

M-CSF: del inglés *macrophage colony-stimulating factor*.

MEK1: del inglés *dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1*.

MFI: del inglés *mean fluorescence intensity*.

MHCII: del inglés *major histocompatibility complex class II*.

miRNA: del inglés *microRNA*. Nombrado como **miR** si va acompañado del número.

mRNA: del inglés *messenger RNA*.

MSK: del inglés *mitogen- and stress-activated protein kinase*. Extendida para **MSK1** y **MSK2**.

MTOR: del inglés *mammalian or mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)*. También conocida como FRAP1 (del inglés *FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1*).

MTT: (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5diphenyl tetrazolium bromide.

-N-

ncRNA: del inglés *non-coding RNA*.

NFAT: del inglés *nuclear factor of activated T-cells*.

NF- κ B: del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.

NK: del inglés *natural killer*.

NO: del inglés *nitric oxide*.

NOS: del inglés *nitric-oxide synthase*.

-O-

OMS: Organización Mundial de la Salud.

-P-

p27: también conocida como CDKN1B (del inglés *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) o como KIP1.

p38: del inglés *p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)*. También conocida como CSBP (del inglés *cytokinin specific binding protein*).

p38 α : *p38 mitogen-activated protein kinase*. También conocida como MAPK14.

PAI-2: del inglés *plasminogen activator inhibitor-2*.

PAMAM: del inglés *poly(amido amine)*.

PAMP: del inglés *pathogen-associated molecular patterns*.

PBS: del inglés *phosphate buffered saline*.

PC5: del inglés *phycoerythrin-cyanine5 conjugate*.

PC7: del inglés *phycoerythrin-cyanine7 conjugate*.

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*.

PDGF: del inglés *platelet-derived growth factor*.

PDGFR: del inglés *platelet-derived growth factor receptor*.

PDGFRB: del inglés *platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide*. Gen que codifica la proteína PDGFR.

PE: del inglés *phycoerythrin*.

PHA: del inglés *phytohemagglutinin*.

PI3K: del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*.

PIGF: del inglés *phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein*. También conocido como PGF (del inglés *placental growth factor*).

PKC: del inglés *protein kinase C*.

PLC γ : del inglés *phospholipase C, gamma 1*.

PRR: del inglés *pattern recognition receptor*.

PTK2: del inglés *protein tyrosine kinase 2*. Gen que codifica la proteína FAK (del inglés *focal adhesion kinase*).

PVDF: polivinilideno fluoruro.

-Q-

Q-PCR: del inglés *quantitative PCR*.

-R-

RIN: del inglés *RNA integrity number*.

RISC: del inglés *RNA-induced silencing complex*.

RMN: resonancia magnética nuclear.

RNA: del inglés *ribonucleic acid*.

RNAi: RNA de interferencia.

ROS: del inglés *reactive oxygen species*.

RPLP0: del inglés *ribosomal protein, large, P0*.

rpm: revoluciones por minuto

RPS6KA5: del inglés *ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5*. Gen que codifica MSK1/2.

RT: retrotranscriptasa

-S-

SD: del inglés *standard deviation*. Desviación estándar.

SDHA: del inglés *succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein*.

SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.

SEM: del inglés *standard error of the mean*. Error estándar de la media.

SERPINB2: del inglés *serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2*. También conocido como PAI-2 (del inglés *plasminogen activator inhibitor-2*).

SERPINE1: del inglés *serpin peptidase inhibitor, clade E member 1*. También conocido como PAI-1 (del inglés *endothelial plasminogen activator inhibitor*).

SHM: del inglés *somatic hypermutation*.

shRNA: del inglés *short hairpin RNA*.

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

siRNA: del inglés *small interfering RNA*.

SLC25A37: del inglés *solute carrier family 25 mitochondrial iron transporter member 37*.

SLC40A1: del inglés *solute carrier family 40 member 1*. También conocido como Ferroportin-1, o transportador regulado por hierro 1.

SLC46A1: del inglés *solute carrier family 46 (folate transporter), member 1*. También conocida como PCFT (del inglés *proton-coupled folate transporter*).

SN: sobrenadante.

SR: del inglés *scavenger receptor*.

SRC: del inglés *v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*.

SS: del inglés *side scatter*. Detector de dispersión lateral que indica la complejidad.

STAB1: del inglés *stabilin-1*.

STAT: del inglés *signal transducer and activator of transcription*. Extensivo para **STAT1**, **STAT3**, **STAT5A** y **STAT5B**.

SYK: del inglés *spleen tyrosine kinase*.

-T-

TACSTD2: del inglés *tumor-associated calcium signal transducer 2*.

TAM: del inglés *tumor-associated macrophages*.

TARGA: terapia antirretroviral de gran actividad.

TBP: del inglés *TATA box binding protein*.

TGF-β: del inglés *transforming growth factor beta*.

Th: del inglés *T helper*.

TLR: del inglés *toll-like receptor*.

TNF-: del inglés *tumor necrosis factor*. Extensivo para **TNF-α** (*tumor necrosis factor alpha*).

-U-

UNAIDS: del inglés *united nations programme on HIV/AIDS*.

UTR: del inglés *untranslated region*.

-V-

VEGF: del inglés *vascular endothelial growth factor*.

VHS: virus del herpes simple.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. Extensivo para **VIH-1** (virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1).

VIS: virus de la inmunodeficiencia en simios.

-Y-

YES: del inglés *Yamaguchi sarcoma viral oncogene*.

YES1: gen que codifica la proteína YES (*Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1*).

1. Introducción

1.1. LOS LINFOCITOS B

Los linfocitos B, también conocidos como células B, pertenecen a la línea linfóide. Las múltiples funciones que poseen en el mantenimiento de la inmunidad se deben a su actuación como células presentadoras de antígeno (APC) y sobre todo, a su capacidad de secreción de anticuerpos (Acs) [39]. Se encargan por tanto, de la protección específica y a largo plazo frente a una amplia gama de patógenos [21].

Las células B se generan en el hígado fetal a partir de la octava semana de gestación, y en el adulto se generan en la médula ósea. Las células B pasan por diferentes estados de desarrollo, activación y diferenciación hasta llegar a ser células plasmáticas o memoria (**figura 1A**). Este proceso de ontogenia se inicia en la médula ósea de forma independiente de antígeno (Ag), lo que genera un linfocito B maduro vírgen e inmunocompetente. El proceso continúa en los órganos linfoides secundarios, y es una fase dependiente de Ag y de las células T, ya que se necesita la captura de un Ag por parte de las células B, y el contacto con células T específicas (**figura 1B**) para generar finalmente las células B maduras [144].

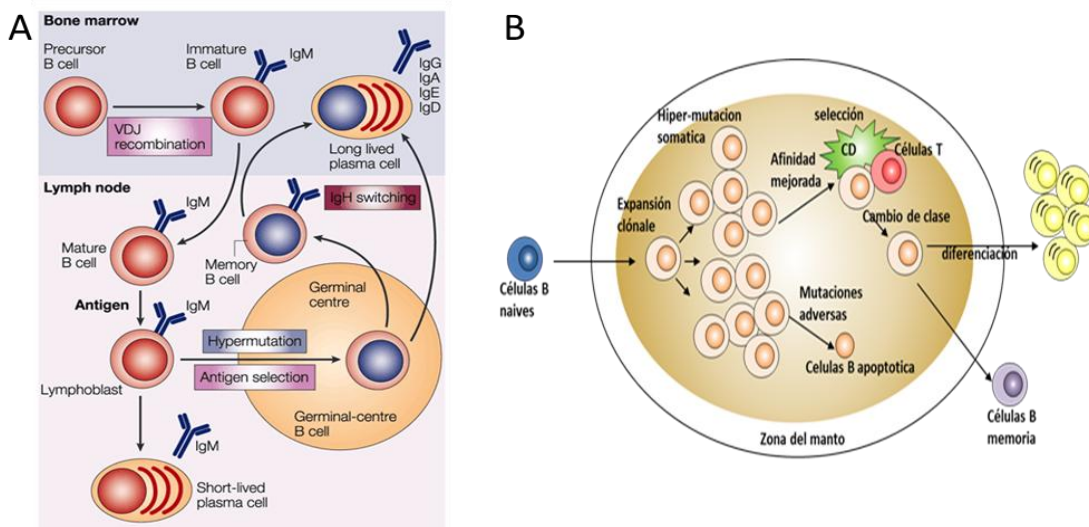


Figura 1. (A) Esquema de los mecanismos involucrados en las diferentes etapas de desarrollo y activación de las células B (adaptada de Kuehl *et al.* [136]). **(B)** Esquema del proceso de diferenciación y selección de las células B de alta afinidad en los centros germinales (adaptada de Kuppers *et al.* [138]).

Durante el proceso de linfopoyesis en la médula ósea, los progenitores linfoides o células pro-B se dividen y generan nuevas células descendientes, las células pre-B. Durante este proceso sufren reordenaciones de los segmentos génicos variable (V), de diversidad (D) y de acoplamiento (J) de las inmunoglobulinas (Igs) [47], que contribuirán en la diversidad del reconocimiento de Ag en las células B maduras. En la fase pre-B, se reordenan sucesivamente las cadenas pesadas (H) de las Igs de ambos cromosomas y se sintetiza el receptor de células pre-B, una pseudo-IgM de

membrana. Tras varios pasos de reordenaciones cromosómicas en las cadenas pesadas y ligeras (L) de las Igs [34], se genera una célula B inmadura, que expresa en superficie IgM. Una vez en la periferia, únicamente las células que entran en contacto con el Ag para el cual son específicas, se activan y expanden, dando lugar a células plasmáticas y a células B memoria (**figura 1**). Cada uno de los estados de diferenciación de las células B está perfectamente dirigido por mecanismos de señalización que se activan por receptores específicos y sus correspondientes ligandos [155]. La expresión del receptor de las células B (BCR) es necesaria también para que se dé un correcto desarrollo y supervivencia de las células B en la periferia [140].

1.1.1. Receptor de las células B: BCR

El principal receptor de las células B, o BCR, es una molécula de Ig no secretable, que tiene un dominio transmembrana corto y una región intracelular. Cada receptor tiene especificidad por un único Ag y cada célula B tiene un solo tipo de receptor. Las células maduras vírgenes tienen Acs unidos a membrana, que suelen ser IgM e IgD que utilizan como receptores. El BCR reconoce epítomos de antígenos solubles en su forma nativa, y en presencia de señales accesorias esta unión promueve la activación de las células B por el agrupamiento de receptores [214]. La activación del BCR puede darse también a través del reconocimiento cruzado de moléculas de Ag, es decir, una molécula de Ag sirve de enlace entre dos complejos de BCR. Los Acs proteicos (Acs dependientes de células T) con epítomos variables pueden unirse solamente a un número limitado de BCR, que por sí solo promueve una activación incompleta de las células B. En este caso es indispensable que de forma simultánea se dé una segunda señal activadora, que suelen ser citoquinas liberadas por los linfocitos T cooperadores, como puede ser interleuquina (IL)-4, TGF- β (*transforming growth factor beta*) o interferón (IFN)- γ . Por otro lado, los Acs de polisacáridos y lípidos poseen grandes cantidades de epítomos repetidos, por lo tanto, se produce la unión cruzada con el BCR promoviendo una activación completa de las células B sin necesidad de las células T (Acs independientes de las células T).

El agrupamiento de receptores BCR activa vías de señalización intracelulares mediadas por las moléculas asociadas Ig α e Ig β , que contienen motivos basados en tirosina denominados ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) necesarios para la transducción de señales en el interior celular [111]. Para que la estimulación linfocitaria se realice correctamente, son necesarias una serie de moléculas accesorias de membrana que se asocian con el BCR, como son MHC II (*major histocompatibility complex class II*), y CD19, CD20, CD21, CD23, CD81, CD40, CD45 o CD72 [265, 272, 277]. Estas moléculas inducen una señal secundaria por el contacto entre las células B y las células T, necesaria para que la activación de las células B por el Ag sea completa y promueva la producción de Igs específicas de Ag [19].

La activación del BCR por la unión del Ag promueve la activación de FYN (*FYN oncogene related to SRC, FGR, YES*) y LYN (*v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog*), dos quinasas de la familia de SRC (*v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*), que fosforilan las regiones ITAM de las cadenas Ig α e Ig β , lo que proporciona el acoplamiento para la proteína SYK (*spleen tyrosine kinase*), una tirosin-quinasa central en la señalización del BCR [96] (figura 2). SYK activa a GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) y PLC γ (*phospholipase C, gamma 1*), iniciando las vías de DAG (D-1,2-diacilglicerol) e IP $_3$ (inositol trifosfato), que conducen a la activación de PKC (*protein kinase C*) y la elevación del valor intracelular de Ca $^{2+}$ respectivamente. Otras vías de activación son las vías de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), la activación de NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.*) y la vía de PI3K-AKT (*phosphatidylinositol 3-kinase y v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*, respectivamente) que se regula mediante la molécula coestimuladora CD19. La vía de NF κ B no canónica se activa por BAFFR (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C*), un miembro de la familia de receptores de TNF (*tumor necrosis factor*) que conduce a la supervivencia de las células B. Finalmente, los factores de transcripción NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), AP-1 (*activator protein 1*), NF κ B y las proteínas JNK (*c-Jun amino-terminal kinase*) y ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) se activan regulando la expresión génica (figura 2). Los efectos biológicos más importantes de señalización por el BCR son la proliferación clonal y la diferenciación periférica, en células plasmáticas o memoria de las células B.

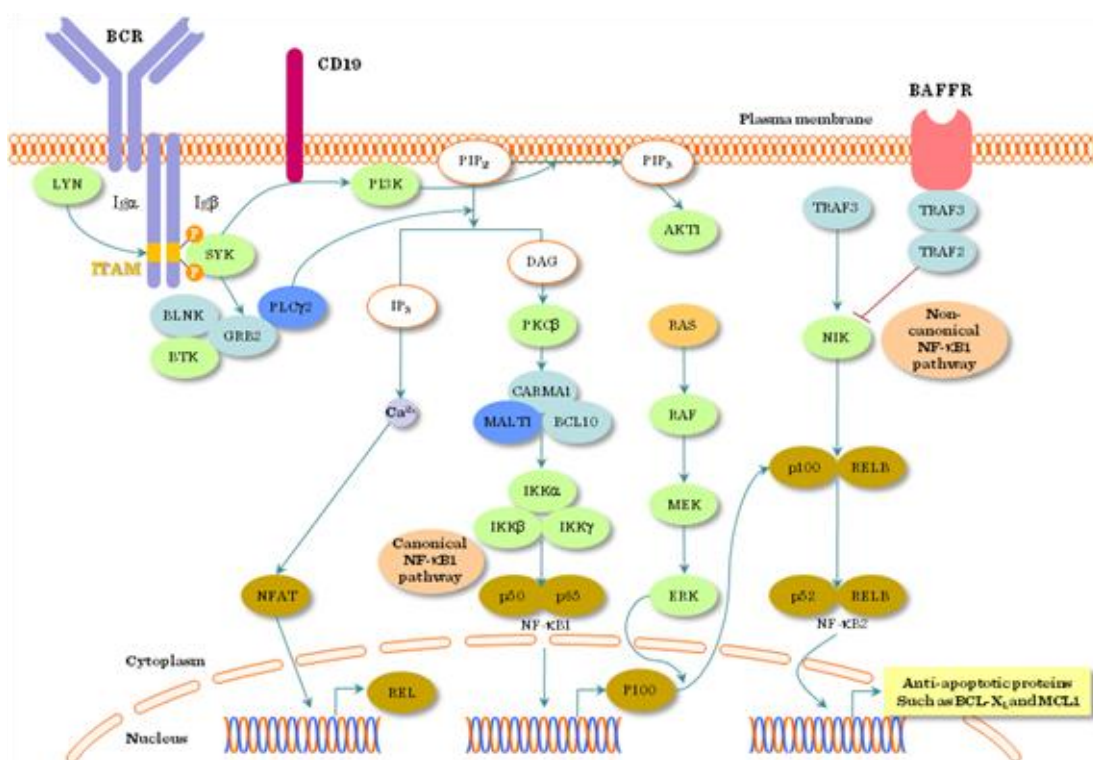


Figura 2. Vías de señalización de las células B. Imagen obtenida de Berki *et al.* [19].

1.1.2. Recombinación de cambio de clase e hipermutación somática

Una vez que las células B maduras contactan con el Ag, se activan y sufren un proceso llamado recombinación de cambio de clase (CSR), que permite que la misma secuencia que codifica la región variable de las Igs (específica del Ag), pueda asociarse a distintos fragmentos génicos de la región constante de las Igs aumentando la especificidad del Ac hacia el Ag [80, 116]. La CSR ocurre en linfocitos maduros, está regulada por los linfocitos T y se da tras la estimulación antigénica.

Inicialmente los linfocitos B maduros vírgenes expresan solamente IgM e IgD de superficie con regiones de unión al Ag idénticas. Los estímulos que inducen la CSR necesitan la cooperación de una señal secundaria, así por ejemplo, IL-4 promueve la CSR para IgG1 e IgE, TGF- β para IgA e IFN- γ para IgG2a. Las células plasmáticas aumentan los valores de transcripción tras su estimulación antigénica, generando grandes cantidades de Acs específicos efectores que serán secretados para la eliminación del Ag [18]. La CSR permite que las células B activadas puedan secretar IgA, IgE o IgG manteniendo la especificidad del Ag de su célula B progenitora. Sin embargo, estas células tienen una vida media corta, ya que entran en apoptosis pocos días después de secretar los Acs. Por otro lado, los linfocitos B memoria productores de Igs responden con mayor rapidez tras la estimulación antigénica y tienen mayor afinidad por el Ag que los linfocitos B no estimulados, a causa de la selección clonal realizada durante el proceso de CSR.

En los centros germinales de los órganos linfoides secundarios se encuentran las células B memoria, responsables de la memoria inmunológica y por lo tanto de la respuesta inmunitaria a largo plazo, ya que tienen una vida media que puede llegar a ser de varios años. Las células memoria se encuentran en reposo hasta que se produce la estimulación antigénica. Esta estimulación induce la proliferación clonal (con la ayuda de IL-2 e IL-4) y el proceso de hipermutación somática (SHM). La SHM se basa en la acumulación de mutaciones puntuales de un modo selectivo en los genes de las Igs, afectando a la región variable (V) de la cadena pesada (H) y ligera (L) [87], aumentando progresivamente la afinidad de los Acs producidos contra el Ag (**figura 3**) [198]. Solamente una pequeña parte de estas mutaciones tendrán consecuencias en los receptores de Ag, sin embargo, el número bajo de células B que expresen estos receptores de alta afinidad serán estimuladas preferentemente por el Ag para sobrevivir y proliferar, mientras que el resto de células B entrarán en apoptosis. Por lo tanto, los mecanismos de CSR y SHM son responsables de la alta afinidad y especificidad de los Acs generados frente a los distintos Ags.

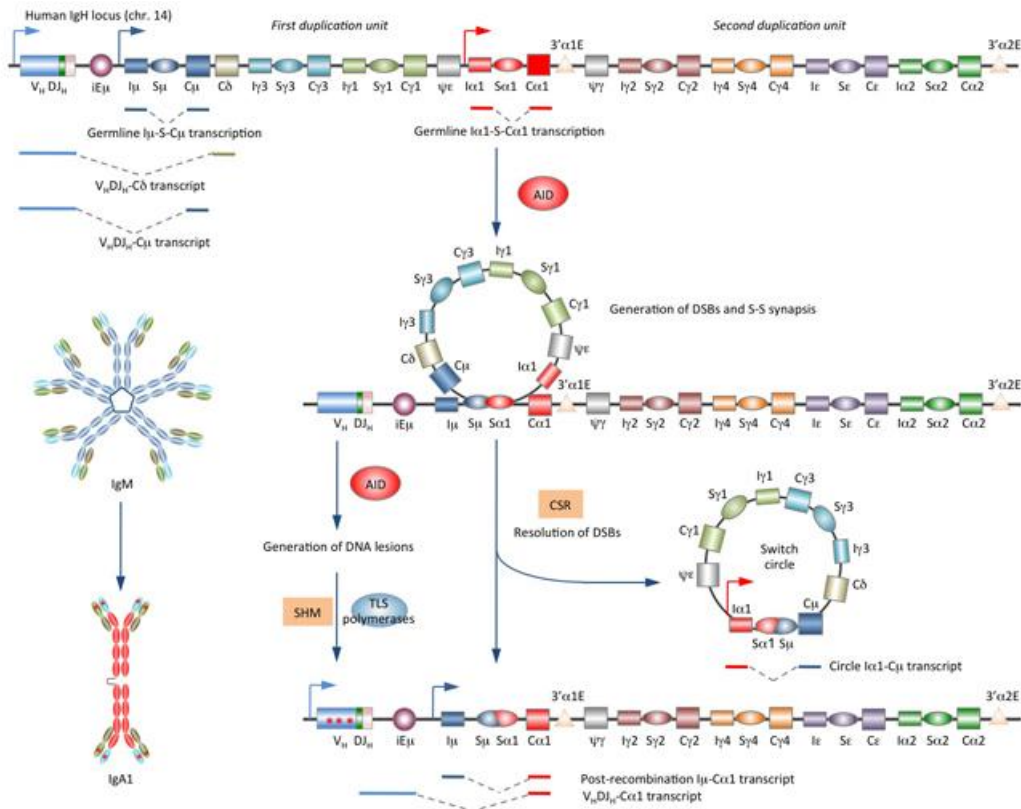


Figura 3. Proceso de la recombinación de cambio de clase (CSR) y de hipermutación somática (SHM). Imagen de *Institute for Immunology, University of California, Irvine* (<http://casalilab.immunology.uci.edu>)

1.1.3. La proteína AID y su regulación mediante miRNA

La proteína AID (*activation-induced cytidine deaminase*), conocida también como AICDA, es un miembro de la familia citidina deaminasa que introduce mutaciones en los genes de las Igs convirtiendo desoxicitidina en desoxiuridina en el DNA. Además, AID inicia y regula la CSR y la SHM, procesos responsables de generar la diversidad de Acs y aumentar la afinidad de los mismos [230, 239]. AID también está implicada en la respuesta del huésped frente a virus debido a su función de deaminación. Su expresión se limita principalmente a las células B del centro germinal de los órganos linfoides periféricos [188, 213, 221]. Hay distintos factores que promueven la expresión aberrante de AID, como un proceso infeccioso, o citoquinas proinflamatorias [295]. AID puede inducir mutagénesis en genes que no codifican para Ig, lo que provoca una inestabilidad genómica en las células B, que puede desencadenar procesos de formación de tumores [172, 173, 229]. Es por ello que la expresión de AID debe regularse de un modo muy controlado para evitar daños en el DNA y mantener la integridad de las células B [119, 229]. La regulación de la expresión de AID se realiza a nivel transcripcional, post-transcripcional, post-traducciona, modificando su localización en núcleo o citoplasma, y modificando su estabilidad frente a la degradación; además, su función enzimática también está regulada por su unión a Fe²⁺ [148, 295]. La expresión aberrante de AID se puede relacionar con varias condiciones patológicas como el síndrome de hiper-IgM, procesos de autoinmunidad sistémica o específica de órgano y asma alérgico.

La regulación post-transcripcional de AID se produce mediante la maquinaria de microRNAs (miRNA), un tipo de RNAs no codificantes endógenos de 19 a 23 nucleótidos aproximadamente. Se han descrito tres miRNA, miR-181b [69], miR-155 [74] y miR-93 [31], capaces de regular la expresión a nivel transcripcional de la proteína AID en las células B. Los miRNA se unen por homología de secuencia al 3'UTR del mRNA de AID para dirigir su represión post-transcripcional, regulando así los niveles de proteína. La asociación del miRNA con su mRNA diana puede producir la degradación del mRNA codificante o la represión de su traducción. Las células B sin miR-155 no producen Acs de alta afinidad IgG1 y la disminución de la expresión de AID por miR-155 se ha asociado a una disminución de la CSR [74, 266]. Por ejemplo, las células B del linfoma de Burkitt con niveles altos de mutaciones somáticas y translocaciones cromosómicas, son deficientes para el miR-155 [133].

1.1.4. Activación y diferenciación de las células B dependiente o independiente de las células T

El reconocimiento del Ag por las células B no es el único elemento necesario para su activación celular. En la mayoría de los casos la ayuda de las células T es necesaria para la producción de Acs específicos, ya que la primera señal proviene del reconocimiento de los Ags por las células B y la segunda señal de la coestimulación proporcionada por una célula T. La presentación de Ags dependiente de los linfocitos T necesita a las células T cooperadoras (Th) y a las citoquinas que producen para activar a los linfocitos B, estos Ags suelen ser proteínas solubles. Las células T se activan por la presentación de péptidos antigénicos presentados por el MHCII de las células B, por lo que ambas células reconocen epítomos distintos del Ag [155].

Por otro lado, las células B también pueden ser activadas por los Ags de una manera independiente de las células T, en este caso no se requiere el contacto con las células Th para activar los linfocitos B. Una ventaja de renunciar a la participación de las células T es que la respuesta inmune puede ser más rápida, sin embargo, el cambio de isotipo y la maduración de la afinidad no ocurren mediante esta forma de activación. Hay dos tipos de activación de las células B independientes de las células T, de tipo 1 o 2. La señal secundaria en la activación de tipo 1 activa a los TLR (*toll-like receptor*) (TLR4 para LPS o TLR9 para DNA), y suelen ser Ags policlonales. La activación de tipo 2 se da cuando los patógenos contienen regiones antigénicas repetidas que activan de manera específica a las células B por la agregación del BCR [155]. La respuesta independiente de células T suele ser débil y producir solamente IgM. La falta de coestimulación de CD40 puede ser una razón por la que la presentación antigénica independiente de células T no puede producir la CSR, y por lo tanto no se da el aumento en la afinidad de los Acs; además producen una respuesta memoria insuficiente [155].

1.2. VIH-1 Y SIDA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. Es un virus que tiene forma esférica y un tamaño aproximado entre 100 y 120 nm de diámetro. Está formado por una bicapa lipídica (capa más externa) y una nucleocápside que contiene el material genético y algunas de las enzimas necesarias para el ciclo viral [273] (figura 4). Pese a que hace más de 25 años que se identificó al VIH como el causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [12, 102], todavía no están identificados completamente los mecanismos moleculares por los cuales actúa. El desarrollo de terapias antirretrovirales de gran actividad (TARGA) para suprimir la replicación del VIH, ha sido el mayor avance en este campo [64, 65] a pesar de los numerosos efectos secundarios que conlleva este tratamiento, como diabetes, lipodistrofia o enfermedades hepáticas entre otros [168, 228]. Según el informe *UNAIDS Global Report 2012* de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en las últimas décadas ha habido un descenso en el número de nuevas infecciones. A finales del año 2011 había en el mundo alrededor de 34 millones de personas infectadas por el VIH, produciéndose en ese mismo año 2,5 millones de nuevas infecciones y 1,7 millones de fallecimientos por causas relacionadas con el SIDA.

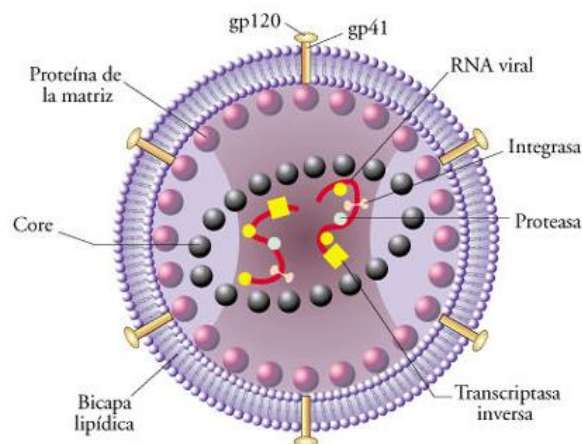


Figura 4. Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1). Imagen de <http://www.biologia.edu.ar/virologia/hiv1biologiamolecular.htm>

1.2.1. Células diana del VIH-1 y desregulación del sistema inmune

El VIH-1 puede infectar a distintos tipos celulares del sistema inmune, como macrófagos o células dendríticas (CD) entre otras. Sin embargo, la principal célula diana de este virus son los linfocitos T CD4. Algunas células infectadas, como los macrófagos, pueden actuar como reservorios celulares del virus, donde el VIH-1 permanece latente siendo indetectable por el sistema inmune [204]. Las personas infectadas por el VIH-1 presentan una desregulación general del sistema inmune, debido en parte a la respuesta inflamatoria que se desencadena para controlar la infección viral. La respuesta inflamatoria está mediada por células del sistema inmunitario innato así

como por factores solubles, entre los cuales se encuentran las IL-1, IL-6 e IL-8, TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), IFN α , β y γ [109], el óxido nítrico (NO) [97, 270] y las prostaglandinas [212]. En caso de que esta respuesta inflamatoria no elimine completamente el virus, se produce una activación inmune crónica. La infección por el VIH-1 provoca alteraciones en las células *natural killer* (NK), en los linfocitos B y T, y alteraciones en la arquitectura de los ganglios linfáticos [27].

La patogénesis de la infección por el VIH-1 es compleja e involucra a varios factores del sistema inmune que tienen un papel clave para impedir la replicación del VIH-1. No obstante, el virus induce una activación y una inflamación crónica del sistema inmune que tiene como resultado el agotamiento progresivo del mismo. Este agotamiento se relaciona con una incidencia alta de diferentes tipos de cáncer (como los linfomas non-Hodgkin's, linfoma de Burkitt o el linfoma difuso de células B grandes), de riesgo cardiovascular o de complicaciones neurológicas [78, 110]. El estudio de la patogénesis del VIH-1 es fundamental para encontrar nuevos métodos terapéuticos y para el desarrollo de vacunas eficaces frente al VIH.

1.2.2. Desregulación de los linfocitos B por el VIH-1

La infección por el VIH, además de los cambios a nivel celular, también afecta a la inmunidad humoral, de la que son responsables los linfocitos B. La infección por el VIH induce una inmunodeficiencia humoral, que se asocia con la hiperactivación de las células B [141]. Este fenómeno es el resultado de la suma de diversos factores tales como el aumento de la activación policlonal de células B [242], la hiper-gammaglobulinemia [37], la renovación celular aumentada, el incremento en la expresión de marcadores de activación como CD70, CD71, CD80 y CD86 [158], y una diferenciación alterada de las células B vírgenes que puede alterar la CSR, produciendo de forma no específica o poco eficiente IgG, IgE e IgA [68, 289]. La activación de las células B por el VIH-1, induce la sobreexpresión de la proteína AID [41], lo cual conduce a la generación de anticuerpos poco o no específicos en pacientes infectados por el VIH-1. Como se ha descrito anteriormente, AID está regulada en parte por dos miRNA, miR-181b y miR-155. Por tanto, la desregulación de la maquinaria de miRNA podría provocar la sobreexpresión de la proteína AID, siendo en última instancia responsable de la producción no específica de IgG, IgE e IgA, de la hiper-immunoglobulinemia E y G, y de que los pacientes infectados por el VIH-1 no respondan correctamente a las infecciones. Además de la desregulación en la producción de anticuerpos, se han observado cambios en la frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B. Se ha descrito un aumento de la diferenciación hacia células plasmáticas [181] y el agotamiento de las células B memoria, induciendo respuestas defectivas frente a patógenos oportunistas [117, 159, 267].

Está aceptado que existe una asociación entre la desregulación de las células B y los procesos de activación inmune y linfopenia inducidos por el VIH [179], ya que es necesario el contacto con las células T para que se produzca una activación óptima y específica de las células B [66, 78]. Sin

embargo, la recuperación de linfocitos T CD4 que se obtiene gracias al TARGA, no restablece las IgE, IgA e IgG específicas de Ag, ni tampoco las células B memoria [53, 88, 124, 227]. Por ello, en los últimos años se ha planteado la posibilidad de que las células B estuvieran desreguladas también por mecanismos independientes de las células T, por ejemplo por un efecto directo del VIH sobre los linfocitos B. Debido a la gran importancia de las células B en la desregulación del sistema inmune en el contexto de la infección por el VIH-1, se han publicado varios trabajos tratando de definir los mecanismos de desregulación de estas células producidos por el virus. Algunos investigadores apuntan que este hecho se debe a la unión de la proteína gp120 con la molécula CD21 de la superficie de las células B [180], y otros, a la presencia de CD40L en la superficie de las partículas virales que interaccionaría con el CD40 de las células B [169].

En general, la hiperactivación y el agotamiento del sistema inmune, y de manera específica de las células B, que son las células responsables de una respuesta altamente específica, permite que el VIH-1 evada al sistema inmune y que el paciente VIH+ padezca infecciones oportunistas. La comunidad científica está haciendo un gran esfuerzo investigando la respuesta del sistema inmune frente al VIH-1, con el fin de encontrar los mecanismos dañados durante la infección, y poder mejorar los tratamientos y la calidad de las diferentes estrategias frente al VIH-1. Sin embargo, el desconocimiento de los mecanismos implicados en la desregulación de las células B puede suponer un impedimento al desarrollo de vacunas eficaces.

1.3. MACRÓFAGOS

1.3.1. Sistema inmune innato

El sistema inmunitario tiene como función principal proteger al organismo. Se divide en: sistema inmunitario innato, que se caracteriza por las respuestas inespecíficas y rápidas, y sistema inmunitario adaptativo, que confiere inmunidad específica y con memoria [177]. Los componentes celulares principales del sistema inmunitario innato son los macrófagos, neutrófilos, células NK, células epiteliales y las células dendríticas (CD). Estas células tienen receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que detectan y unen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) así como señales endógenas que se producen cuando hay daño tisular (DAMP, patrones moleculares asociados al daño) [92]. Los macrófagos y las CD, tras reconocer y unir a los patógenos, los fagocitan y eliminan. Además, ambos tipos celulares son los responsables de conectar la respuesta inmune innata y la adaptativa. Dependiendo del tipo de patógeno y del contexto en el que se encuentren las CD, promueven una respuesta efectora (Th1, Th2, Th17,...) dirigida a la eliminación del patógeno, participando en la iniciación y polarización de la respuesta inmune adaptativa [11]. Por lo tanto, el sistema inmunitario innato estimula y polariza las respuestas del sistema inmunitario adaptativo, cuya finalidad es eliminar al patógeno minimizando los daños tisulares colaterales [176].

1.3.2. Macrófagos

Los macrófagos pertenecen a la línea mieloide. En la médula ósea se localizan las células progenitoras mieloides o promonocitos, que darán lugar a los monocitos que pasarán a la circulación sanguínea y que en presencia de citoquinas y quimioquinas [1] se extravasan a los tejidos, siendo esta la fuente principal de generación de macrófagos tisulares. Únicamente el 5% de los macrófagos residentes en tejidos derivan de fagocitos mononucleares que se dividen en el mismo tejido [276]. Debido a la gran versatilidad que tienen los macrófagos, pueden adquirir fenotipos distintos que son condicionantes de su funcionalidad, dependiendo del contexto en el que se encuentren [184, 256].

Los macrófagos actúan en la fase aguda de un proceso infeccioso, ya que su función es reconocer y eliminar todo aquello que pueda ser un peligro para el organismo, tanto agentes externos (microorganismos o partículas opsonizadas), como agentes propios (restos de neutrófilos). Tienen distintos mecanismos para lograr ese objetivo, como son la capacidad de fagocitosis, la secreción de enzimas y citoquinas, y la secreción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (NOS) [193]. Además, aunque no es su función principal, pueden actuar promoviendo el reclutamiento de células inflamatorias hacia el lugar de inflamación, y como APC presentando Ags a los linfocitos T [222]. Por otro lado, actúan en los procesos de restablecimiento de la homeostasis tisular, resolviendo procesos inflamatorios y generando vasos sanguíneos nuevos en el tejido dañado, debido a su función angiogénica.

1.3.2.1. Citoquinas encargadas de la diferenciación de macrófagos

La quimiotaxis y la diferenciación de los macrófagos están reguladas principalmente por las citoquinas M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) y GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) [13, 256]. M-CSF tiene como función principal regular el desarrollo de células mieloides [288], tales como monocitos, CD y macrófagos, que presentan receptores de alta afinidad por M-CSF [13]. Los macrófagos tisulares están expuestos a concentraciones elevadas de M-CSF [86], que se sintetiza de forma constitutiva por los macrófagos, las células endoteliales, los fibroblastos, osteoblastos y por las células del estroma entre otras [13]. Esta citoquina mantiene a los macrófagos polarizados hacia un estado antiinflamatorio [114] (**figura 5**). M-CSF juega un papel importante en los procesos de inmunosupresión, alcanzando valores elevados durante el embarazo debido a su función en los procesos de tolerancia materno-fetal [262], y en el desarrollo de tumores de mama [175]. GM-CSF se sintetiza tras la activación de diversos tipos celulares [56], como son los linfocitos T y B, macrófagos, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos y células endoteliales [13], por tanto, en condiciones homeostáticas, GM-CSF se encuentra en concentraciones bajas (**figura 5**). Esta citoquina se encarga de promover la viabilidad, proliferación y maduración de precursores de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos.

M-CSF y GM-CSF se regulan mutuamente. M-CSF aumenta la generación de macrófagos homeostáticos en presencia de concentraciones bajas de GM-CSF [42], mientras que concentraciones elevadas de GM-CSF impiden el desarrollo de macrófagos mediados por M-CSF. Esto se debe a la acción inhibitoria de GM-CSF sobre la expresión del receptor de M-CSF [283] [114] (**figura 5**).

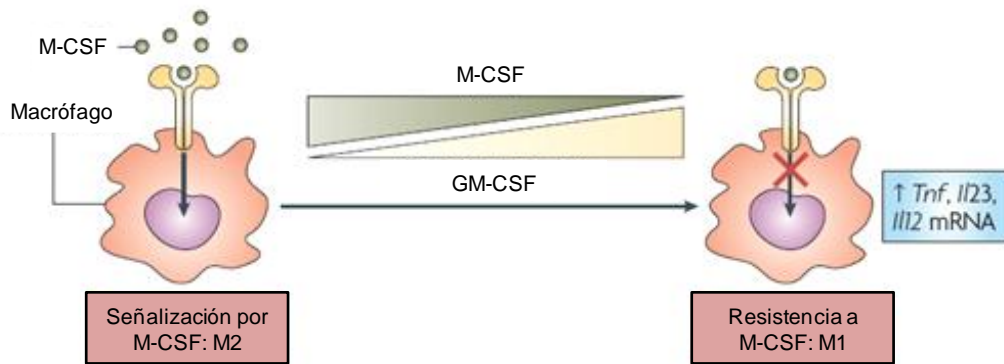


Figura 5. Señalización comprometida del receptor de M-CSF en los macrófagos M1. Adaptada de Hamilton *et al.* [114].

1.3.2.2. Polarización de macrófagos de tipo M1 y M2

En las primeras fases de la respuesta inflamatoria los macrófagos se desarrollan en presencia de GM-CSF, adquiriendo un fenotipo proinflamatorio con funciones microbicidas. Estos macrófagos se denominan macrófagos de tipo 1 o M1. Se activan por lipopolisacáridos (LPS), IFN- γ o TNF- α [167, 280], aumentando la concentración de aniones superóxido, de radicales de oxígeno y de nitrógeno [83, 178]. Se caracterizan por una expresión alta de citoquinas proinflamatorias como IL-23, IL-12, IL-1 β , IL-6 y TNF α , y una expresión baja de IL-10 [17, 101, 165, 251], promoviendo una respuesta inmune tipo Th1 [248] (**figura 6**). En la fase de resolución de una respuesta inflamatoria, las concentraciones de M-CSF son elevadas, y las de GM-CSF son más bajas, promoviendo que los macrófagos adquieran un fenotipo antiinflamatorio. En este proceso se pone en evidencia la plasticidad de los macrófagos, ya que las células apoptóticas facilitan la transformación de macrófagos proinflamatorios en macrófagos antiinflamatorios que se encargan de reparar el daño tisular restableciendo la homeostasis en el tejido [75, 82, 165]. Por lo tanto, la polarización de los macrófagos es reversible, y se ha descrito tanto *in vitro* como *in vivo* [8, 32, 107, 118, 154].

Los macrófagos antiinflamatorios se denominan macrófagos de tipo 2 ó M2 y dependiendo de su estimulación se subdividen en M2a, M2b y M2c (**figura 6**). Los M1 y M2 murinos se diferencian por el metabolismo de L-arginina. Los M1 metabolizan, mediante la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la L-arginina en L-citrulina y NO que posee actividad microbicida; mientras que los M2a, metabolizan L-arginina en poliaminas (esenciales para la proliferación celular)

y prolina (implicada en la producción de colágeno), mediante la enzima Arginasa 1 [178]. Sin embargo, estas diferencias no se encuentran en humanos [84, 219]. Los M2a se activan por citoquinas de tipo Th2, como IL-4 e IL-13. Los macrófagos M2b se activan por inmunocomplejos, TLRs o IL-1ra (*IL-1 receptor antagonist*); y los M2c se polarizan mediante IL-10, TGF- β o glucocorticoides [166, 170] (figura 6).

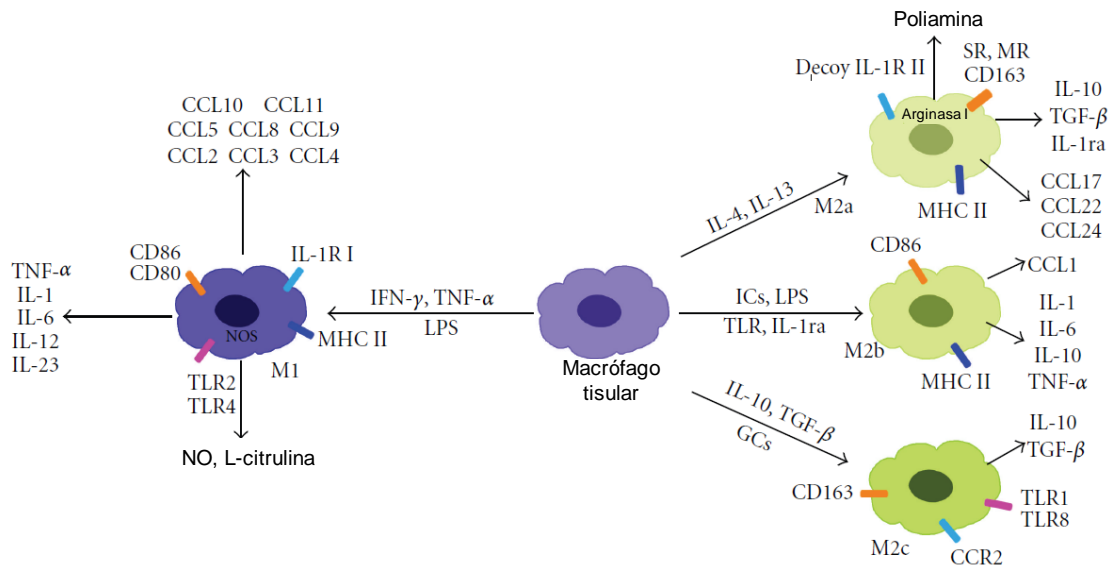


Figura 6. Macrófagos con una activación clásica (M1) o alternativa (M2). Los macrófagos M2 se subdividen en M2a, M2b y M2c. Adaptada de Hao *et al.* [115].

Los subtipos de M2 tienen un fenotipo distinto, ya que expresan citoquinas, quimioquinas y receptores diferentes [115] pero, tras ser estimulados, expresan cantidades altas de IL-10 y menores de IL-12 e IL-23 [85, 86, 99, 100]. Los M2 inhiben las respuestas Th1 y Th17 y están implicados en la inducción de tolerancia modulando procesos de autoinmunidad [279]. Los M2 se caracterizan por expresar receptores *scavenger* (SR), de manosa e IL-10, que les permite eliminar parásitos, participar en la remodelación de tejidos, la modulación inmune y la progresión tumoral [251]. Sin embargo, las clasificaciones de fenotipos subestiman la complejidad que se encuentra *in vivo* [79, 217].

Además de sus funciones efectoras, los macrófagos polarizados M1 y M2 se caracterizan por una expresión diferencial de receptores de membrana, producción de citoquinas y expresión de receptores de citoquinas (figura 7). Los macrófagos expuestos a señales como IFN- γ y LPS expresan receptores de opsonización, como CD16 que une los fragmentos Fc de las Igs, mientras que los M2 expresan cantidades elevadas de receptores de no-opsonización, como el receptor de manosa (CD206). Los M1 y M2 también se diferencian por los componentes del sistema de IL-1. Mientras que IL-4, IL-13 y los glucocorticoides inducen la expresión de IL-1 tipo II *decoy receptor*, IFN- γ y LPS lo inhiben y aumentan la expresión del receptor IL-1R de tipo I (*interleukin 1 receptor, type I*) [163]. IL-4 e IL-13 inducen la producción de IL-1ra e inhiben IL-1 (figura 7).

La generación *in vitro* de macrófagos derivados de monocitos se consigue por el efecto de GM-CSF y M-CSF que producen los subtipos M1 y M2, respectivamente. Estas subpoblaciones de macrófagos son fenotípica y funcionalmente distintas. Los macrófagos generados por la presencia de citoquinas se consideran equivalentes a los macrófagos tisulares [1, 86, 114].

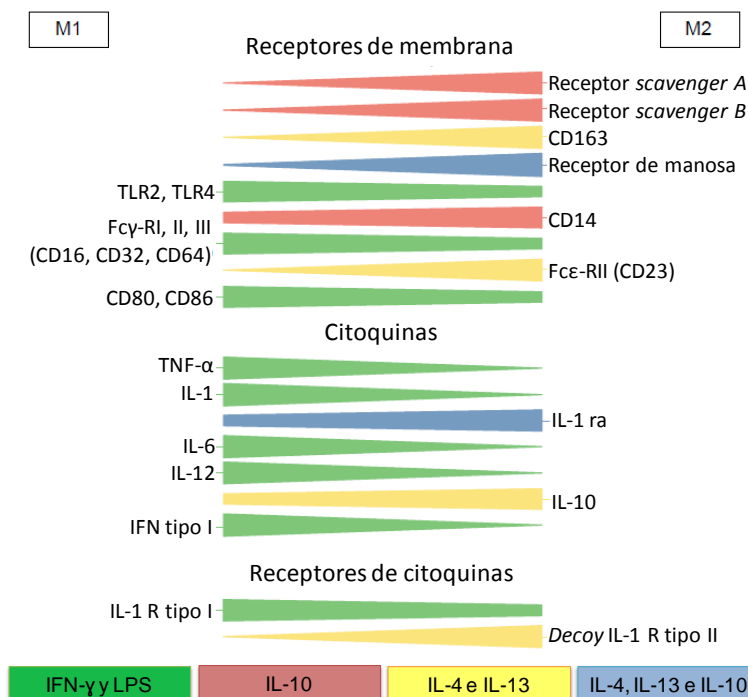


Figura 7. Expresión diferencial de receptores de membrana, citoquinas y receptores de citoquinas en los macrófagos polarizados. Para los M1, las moléculas inducidas por IFN- γ y LPS se muestran en verde. Para los M2, las moléculas inducidas por IL-10 se muestran en rojo, las inducidas por IL-4 e IL-13 en amarillo, y las inducidas IL-4, IL-13 e IL-10, en azul. Adaptada de Mantovani *et al.* [167].

1.3.2.3. Expresión de quimioquinas por los macrófagos M1 y M2

Los macrófagos presentan distintos fenotipos según la expresión de receptores de membrana, citoquinas, receptores de citoquinas, quimioquinas, receptores de quimioquinas y moléculas efectoras (figura 8). Las quimioquinas sintetizadas por los M1 son para desencadenar una respuesta dirigida a la eliminación de patógenos, mientras que las sintetizadas por los M2 promueven el reclutamiento de leucocitos implicados en la reparación de tejidos. Los M1 estimulados con LPS e IFN- γ inducen la activación del factor de transcripción IRF-3 (*IFN regulatory factor-3*), que promueve la expresión de IFN- β y la subsecuente activación de STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*). En consecuencia, los M1 expresan quimioquinas proinflamatorias de tipo *C-X-C motif ligand (CXCL)*, como CXCL9, CXCL10 y CXCL5 entre otras [166]. LPS e IFN- γ disminuyen la expresión de receptores *chemokine (C-C motif) receptor*, como CCR1, CCR2 y CCR5 [211, 244] e inducen la expresión de CCR7 [60] (figura 8). Por el contrario, los macrófagos M2 inhiben la expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL5 por la disminución de NF- κ B y STAT1 [151].

Los M2a promueven la expresión de quimioquinas tipo *C-C motif ligand* (CCL) como CCL24, CCL17 y CCL22. Los M2b secretan CCL1 y los M2c inducen CXCL13, CCL6 y CCL18 [166]. IL-10 aumenta la expresión de CCR1, CCR2 y CCR5, y disminuye parcialmente CXCR2, CXCR4 [253] y CCR7 [60]. IL-4 e IL-13 no modifican la expresión de receptores de quimioquinas de tipo C-C, pero inducen el receptor de IL-8, CXCR2 [29] (**figura 8**).

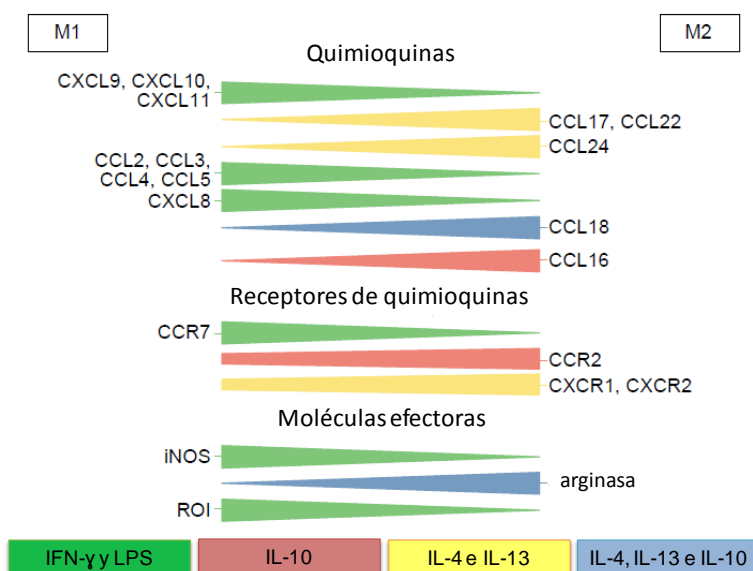


Figura 8. Expresión diferencial de quimioquinas, receptores de quimioquinas y moléculas efectoras de los macrófagos polarizados activados. Para los M1 las moléculas inducidas por IFN- γ y LPS se muestran en verde. Para los M2 las moléculas inducidas por IL-10 se muestran en rojo, las inducidas por IL-4 e IL-13 en amarillo, y las inducidas por IL-4, IL-13 e IL-10 en azul. Adaptada de Mantovani *et al.* [167].

1.3.3. Macrófagos asociados a tumores

Los tumores están formados por distintos tipos celulares, ya que además de las células tumorales contienen células del estroma, que incluyen fibroblastos, células endoteliales, mononucleares, los macrófagos asociados a tumores (TAM), linfocitos, células B activadas y neutrófilos. Las células tumorales y del estroma participan conjuntamente en procesos de destrucción y reparación del tejido, produciendo quimioquinas y factores de crecimiento que promueven la diferenciación de monocitos a TAM, aumentando la infiltración de células en el tumor. El reclutamiento y supervivencia de los TAM depende de las citoquinas y quimioquinas que interactúan con sus receptores [238].

El desarrollo y la progresión del tumor es un proceso regulado por las células tumorales y por el microambiente circundante, que depende de las células del estroma. Algunas quimioquinas tienen un efecto de potenciación sobre la angiogénesis, necesaria para nutrir y oxigenar todas las partes del tumor, como son CXCL8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 y CXCL7 [16, 257] (**figura 9**), y otras tienen un efecto angiostático como CXCL4, CXCL10 y CXCL9. [257].

Las células tumorales, fibroblastos y macrófagos secretan CCL2, que juega un papel importante en el reclutamiento de macrófagos [59, 108] (**figura 9**), asociándose una producción alta de CCL2 con un número elevado de TAM [134, 195, 199, 249]. Estudios realizados en ratones mostraron que los tumores que expresan concentraciones altas de CCL2, además de tener una infiltración mayor de M2, son más agresivos y tienen mayor vascularización [95, 153]. Además, el reclutamiento de macrófagos en la zona tumoral también está provocado por un incremento en los valores de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), IL-10 y otras quimioquinas como CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8 y CXCL12 [5, 9, 189, 251] (**figura 9**).

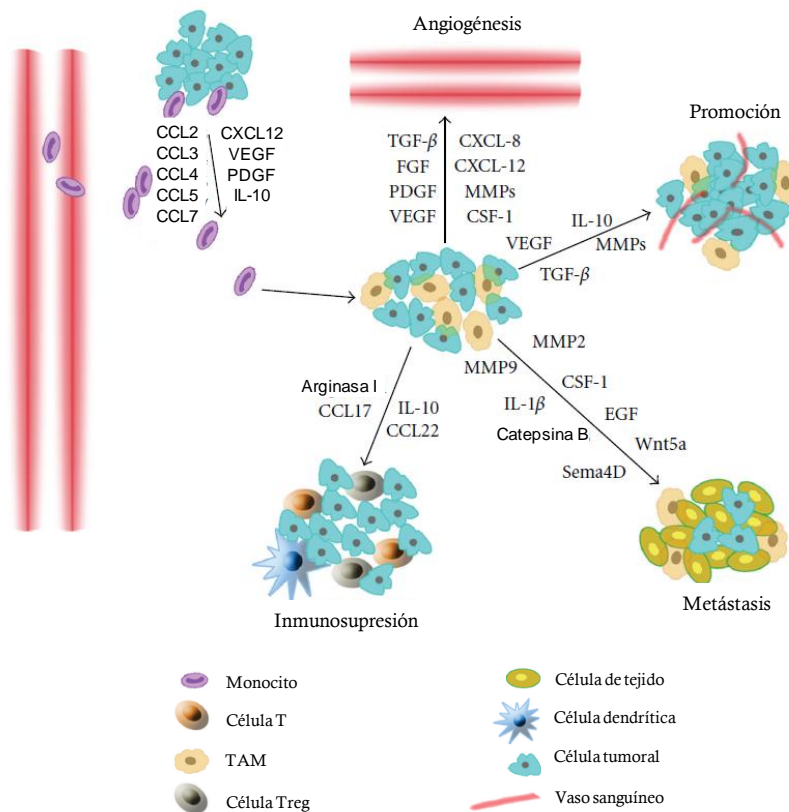


Figura 9. Funciones de los TAM en la progresión tumoral. Las células del estroma y tumorales producen quimioquinas y factores de crecimiento, e inducen a los monocitos a la diferenciación hacia macrófagos. En el tumor, la mayor parte de los macrófagos son similares a los de tipo M2 y expresan citoquinas, quimioquinas y proteasas que promueven el proceso de angiogénesis, metástasis e inmunosupresión. Adaptada de Hao *et al.* [115].

Debido a la plasticidad funcional de los macrófagos, los TAM pueden ejercer una función dual sobre el crecimiento tumoral, actuando como protumorales o antitumorales. Se han descrito al menos dos subpoblaciones de TAM: i) TAM con capacidad migratoria en la periferia del tumor que se asemejan poco a los M2, y ii) TAM localizados en zonas con hipoxia elevada que se asemejan más a los M2 [142]. Estas diferencias se basan en la expresión diferencial de marcadores como CD206, MHC II, CD163, el receptor de folato (FRβ), el fragmento Fc de las IgG, lectinas de tipo C

y proteínas de choque térmico (HSP) [14, 217, 233]. Los macrófagos polarizados no tienen fenotipos estables e inalterables, pueden modificar su fenotipo en función de los estímulos presentes en el microambiente [184], como por ejemplo sucede durante el desarrollo de un tumor, donde el microambiente celular varía. En el microambiente tumoral se encuentran IL-4, IL-13, TGF- β e IL-10, responsables de que durante la progresión tumoral los macrófagos pasen de ser proinflamatorios a ser antiinflamatorios [24, 243, 245]. Por lo tanto, no solamente hay subpoblaciones distintas de TAM localizadas en zonas diferentes del tumor, sino que además conforme avanza el desarrollo tumoral los TAM modifican su fenotipo.

Los TAM de tipo M1 actúan como células proinflamatorias con características citotóxicas, relacionándose con la generación de respuestas inmunes antitumorales al expresar citoquinas como IFN- γ , IL-1 e IL-6, que activan respuestas Th1 [5, 201]. Los TAM de tipo M2 presentan funciones protumorales, expresan citoquinas, quimioquinas y proteasas que inducen procesos de angiogénesis, metástasis, remodelación de la matriz e inmunosupresión de la respuesta inmune adaptativa [245]. En el tumor, la mayor parte de los TAM se consideran de tipo M2, ya que comparten la regulación positiva de diversos genes con los M2 [23, 252]. En general, se ha asociado una mayor presencia de TAM con el estadio clínico tardío de pacientes con cáncer de mama y cáncer de vejiga, y con el estadio clínico temprano de pacientes con cáncer de ovario [297], relacionando los TAM con tumores más agresivos y potencialmente metastáticos [185, 186, 192, 249].

Debido a la gran cantidad de funciones de los TAM, y a las implicaciones que de ellas derivan, se han propuesto los TAM de tipo M2 como células diana para el tratamiento de tumores, basándose en la disminución de las funciones celulares y en el cambio de fenotipo hacia M1 [142, 164, 251].

1.4. DENDRÍMEROS

Una de las perspectivas nuevas de la nanomedicina es desarrollar y caracterizar nanopartículas con finalidades preventivas, terapéuticas o como herramientas de diagnóstico. Es necesaria la búsqueda de fármacos que mejoren los tratamientos, en aspectos como aumentar la distribución o reducir los efectos secundarios o la hepatotoxicidad. En consecuencia, es necesario desarrollar moléculas que puedan utilizarse como estrategias terapéuticas novedosas, como vehículos en terapia génica e inmunoterapia, o bien como nanomateriales que tengan un efecto terapéutico por sí solos [143, 224]. En 1978 se describieron por primera vez unas macromoléculas muy básicas con estructura dendrítica [38, 113], que algunos años después recibieron el nombre de “dendrimeros” [268]. Los dendrimeros tienen un tamaño nanoscópico, normalmente inferior a 100 nm, y unas propiedades físico-químicas que recuerdan a las de las biomoléculas [132].

1.4.1. Estructura de los dendrímeros

Los procesos de síntesis han evolucionado para mejorar la estructura y la función de distintas moléculas con aplicaciones biomédicas potenciales. Los dendrímeros se consideran un tipo de polímeros químicos que se generan mediante procesos de síntesis controlados y, a diferencia de los polímeros convencionales, se caracterizan por tener una estructura bien definida y una alta monodispersidad, tanto en el tamaño de las moléculas como en la flexibilidad y la topología [26, 269]. Son moléculas hiperramificadas y muy versátiles, debido a la relativa facilidad con la que se les pueden incorporar ligandos que sean de interés (figura 10).

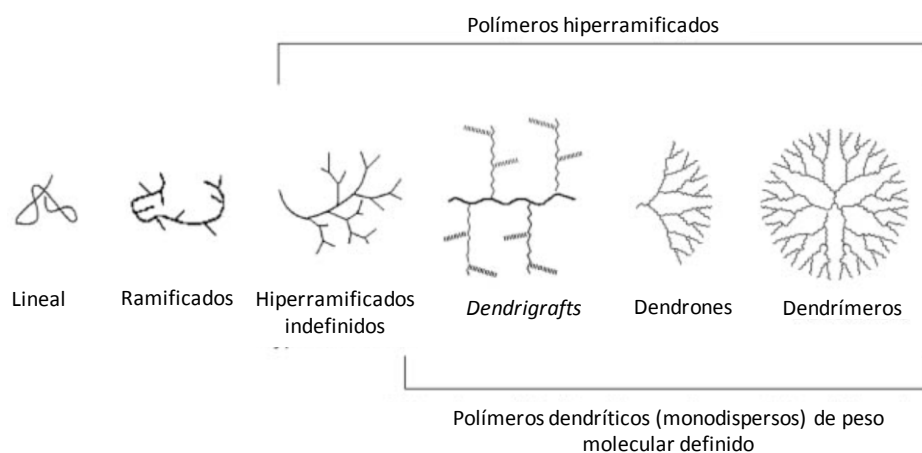


Figura 10. Estructuras poliméricas y dendríticas. Adaptado de Boas *et al.* [25].

La estructura de los dendrímeros consta de tres partes principales, el núcleo, las ramificaciones y los grupos terminales. El núcleo central es el origen de las ramificaciones que surgen de él de un modo divergente, siendo un microambiente protegido por las estructuras más externas. Las ramificaciones que se originan en el centro de la molécula pueden ser más o menos complejas, dependiendo en número y tamaño del tipo de dendrímero sintetizado. Los grupos terminales se localizan en la periferia y suelen ser los grupos funcionales de la molécula.

Dependiendo del proceso de síntesis los dendrímeros pueden clasificarse en distintas generaciones. El número de generación del dendrímero depende del número de puntos focales que se encuentran en cada una de las ramificaciones. Cada punto focal indica un paso en el proceso de síntesis, y por tanto, el número de puntos focales es el que indica la generación del dendrímero, tomando como generación 0 al núcleo que no presenta ningún punto focal (figura 11).

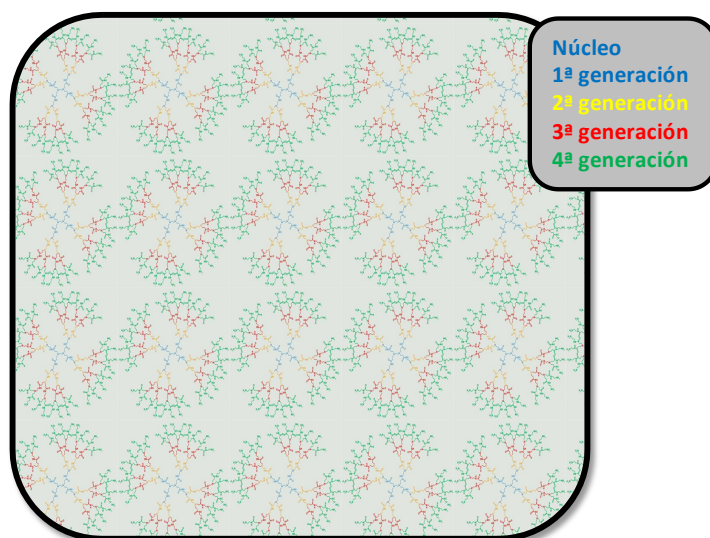


Figura 11. Dendrímero tipo PAMAM de cuarta generación. Dendrímero PAMAM (*poly(amido amine)*) de cuarta generación con 4 puntos focales en cada ramificación. A medida que la estructura dendrímica aumenta, incrementan los grupos periféricos y la superficie exterior va creciendo, aumentando así los grupos funcionales. Se indica cada generación con un color distinto. Adaptado de Castriciano *et al.* [43].

Los dendrímeros carbosilano se caracterizan por tener estructuras basadas en enlaces carbono-carbono (C-C) y carbono-silicio (C-Si). Este tipo de enlaces confieren a la molécula una gran hidrofobicidad [275]. La funcionalización de la periferia con grupos polares le otorga a la molécula una mayor hidrosolubilidad, comparado con los dendrímeros de tipo PAMAM que poseen grupos lipofílicos. Los dendrímeros carbosilano tienen una gran estabilidad química, puesto que se necesita mucha energía para romper el enlace entre el carbono y el silicio [157]. Además, como el átomo de silicio es tetravalente, se pueden generar numerosas ramas a partir de un átomo, con lo cual existe una alta capacidad de ramificación (**figura 12**). Los dendrímeros carbosilano suelen tener además una estructura muy globular, lo cual provoca que tengan una temperatura baja de transición vítrea y a temperatura ambiente se comporten como aceites, lo que hace que posean una naturaleza altamente hidrofóbica que les confiere una alta biocompatibilidad en comparación con otros tipos de dendrímeros (**figura 12**).

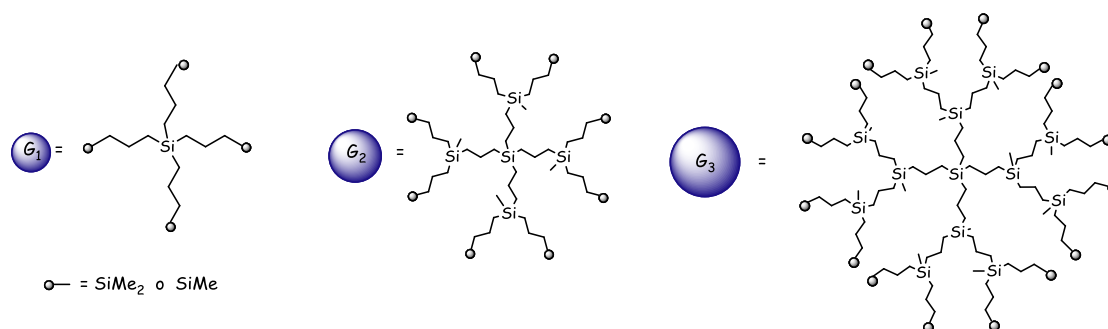


Figura 12. Dendrímeros carbosilano de primera, segunda y tercera generación. Se representan tres dendrímeros de la misma familia.

1.4.2. Aplicaciones biomédicas de los dendrímeros

Para validar un dendrímero para su aplicación en biomedicina, se deben considerar varios aspectos, entre ellos, su biocompatibilidad, su posible inmunogenicidad (en el caso del desarrollo de vacunas), su capacidad de atravesar barreras biológicas dependiendo de la diana celular que sea de interés, o su internalización en las células dependiendo de la función deseada. Además, en el caso del dendrímero ideal, este debería poder direccionarse de un modo específico a las células u órgano diana [48, 131]. Basándose en los grupos funcionales que tienen los dendrímeros, se pueden clasificar en tres grandes grupos: dendrímeros neutros, catiónicos y aniónicos.

Respecto a los ensayos de biocompatibilidad, los dendrímeros de mayor generación [127], los que poseen estructuras poco flexibles [26] y los que tienen carga neta positiva suelen presentar una toxicidad mayor [127]. La toxicidad de los dendrímeros está por lo tanto determinada por grupos activos de su superficie y por la naturaleza química del esqueleto dendrimérico. La unión covalente entre los dendrímeros y las moléculas que transportan produce un efecto de atenuación de la carga positiva neta del dendrímero que reduce la citotoxicidad [22].

1.4.2.1 Aplicaciones de los dendrímeros neutros

Los dendrímeros sin cargas en la superficie, conocidos como neutros, se han desarrollado para conseguir moléculas que presenten una menor toxicidad. Los dendrímeros neutros que tienen en su superficie grupos manosilo, inhiben la adhesión de bacterias *E. coli* fimbriadas a las células de la sangre de caballos, por lo que se ha propuesto su uso como agentes antibacterianos [191].

1.4.2.2. Aplicaciones de los dendrímeros aniónicos

Los dendrímeros aniónicos tienen aplicaciones biomédicas debido a las cargas negativas que poseen en la superficie. Se pueden utilizar como agentes que interrumpen las interacciones iónicas que se dan entre la superficie viral y la membrana celular en los primeros pasos de un proceso de infección viral. Se ha demostrado la efectividad de dendrímeros aniónicos frente a infecciones por el virus del herpes simple (VHS) [55], la prevención de la transmisión sexual del virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) [128] y del VIH *in vitro* [52, 274]. Además, combinaciones de dendrímeros carboxilano con antirretrovirales impiden la infección por el VIH-1 de forma significativa [57]. Hasta el momento, el dendrímero SPL7013, cuyo nombre comercial es Vivagel®, es el único aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su utilización como microbicida, y se está llevando a cabo un ensayo clínico de fase III para su uso tópico contra la vaginosis bacteriana [232, 264].

1.4.2.3. Aplicaciones de los dendrímeros catiónicos

Los dendrímeros catiónicos poseen efectos farmacológicos, como es la capacidad de solubilizar agregados de proteínas priónicas [194, 250, 260, 261], o el efecto bactericida mediante la formación de poros en la membrana bacteriana [45, 46, 203]. Además, los dendrímeros catiónicos pueden inducir cambios en la expresión génica de distintos tipos celulares, reprimiendo *IL17A*, *IL17F*, *IL23R* e *IL23A*, pudiendo utilizarse para el tratamiento de procesos autoinmunes [104-106]. Los dendrímeros de tipo PAMAM que poseen aminas o grupos hidroxilo en sus grupos terminales, tienen una capacidad antiinflamatoria que se ha demostrado en modelos de artritis en rata [44].

Además, los dendrímeros con grupos catiónicos, debido a las uniones que pueden formar con moléculas cargadas negativamente, pueden utilizarse como agentes transportadores de fármacos aniónicos [7], transfectantes en terapia génica y como transportadores de ácidos nucleicos [20, 51, 98, 285]. Se ha descrito también la utilización de dendrímeros y nanopartículas similares como transportadores de péptidos en CD con el objetivo de incrementar la captura, el procesamiento y la presentación de los Ag en el desarrollo de vacunas antitumorales o contra enfermedades infecciosas [28, 58]. Los dendrímeros catiónicos pueden unir las moléculas en su superficie o bien en los bolsillos centrales. En el caso de los dendrímeros carbosilano, esta unión se produce en la superficie debido a que es la parte polar del dendrímero. El complejo de moléculas unidas al dendrímero recibe el nombre de dendriplex (**figura 13**).

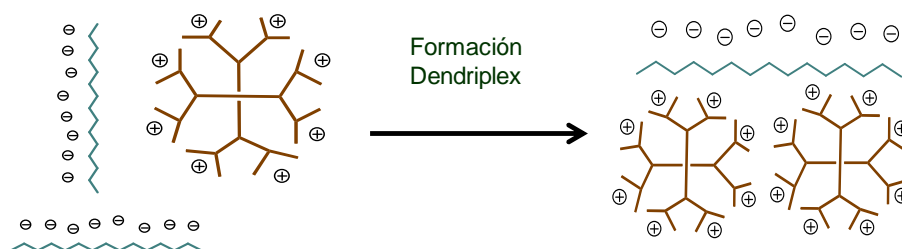


Figura 13. Formación del dendriplex. Se representa la formación del dendriplex entre un dendrímero y una molécula de siRNA mediante la interacción entre sus cargas.

Las terapias basadas en ácidos nucleicos suelen utilizar moléculas de siRNA o shRNA (*short hairpin RNA*), y por tanto, son estas moléculas las que deben unirse al dendrímero [4, 126] que es el encargado de introducirlas en las células diana [20, 285]. Una vez se forma el dendriplex, se tratan las células cultivadas *in vitro* o bien células de animales *in vivo* o *ex vivo*. Cuando el dendriplex llega a la célula diana, se internaliza por endocitosis. Los endosomas tempranos cargados con el dendriplex, posteriormente se fusionan con otros, pasando a ser endosomas tardíos. Estos se acidifican (pH 5-6) por la bomba de protones de las ATPasas de membrana, y el contenido endosomal pasa a estar en los lisosomas que se acidifican todavía más hasta alcanzar pH de 4.5, y que además contienen diversas nucleasas que promueven la degradación de los siRNA. Para evitar

la degradación lisosomal, los siRNA o dendriplexes deben escapar del endosoma y salir hacia el citosol, donde se asocian con la maquinaria de procesamiento de RNA de interferencia (**figura 14**). Este proceso del escape endosomal es el punto más crítico para conseguir una entrega de siRNA eficiente. Se han desarrollado numerosas estrategias para promover la liberación endosomal, incluyendo la utilización de lípidos fusogénicos, polímeros con alta capacidad de tamponamiento del pH y péptidos que interaccionan con la membrana [72, 112].

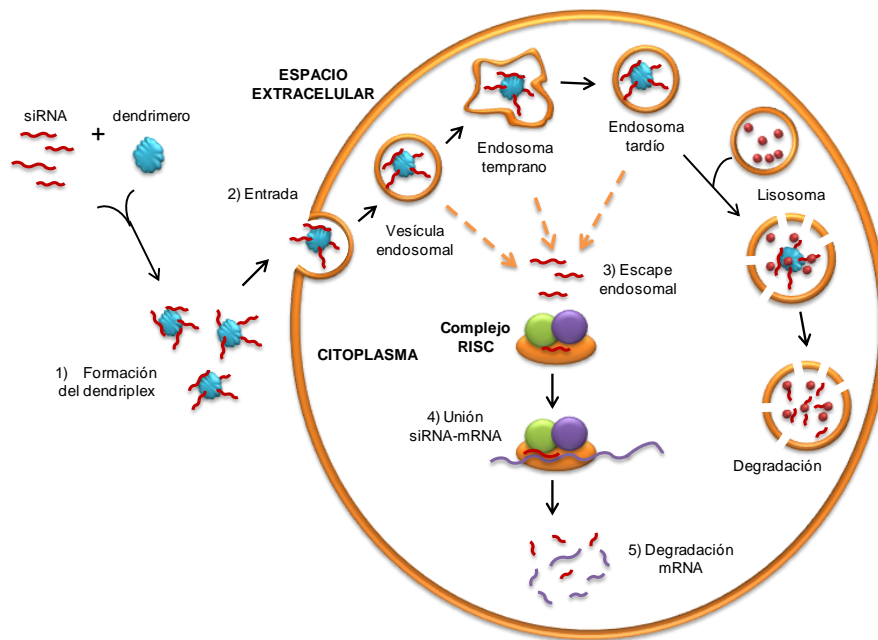


Figura 14. Entrada y tráfico intracelular de un dendriplex. Se representa la formación del dendriplex, la interacción de este con las células, la posterior entrada mediante vesículas endocíticas, el paso de endosoma temprano a tardío y la continuidad en la vía lisosomal para la hidrólisis de proteínas y ácidos nucleicos. Las flechas discontinuas muestran el proceso de escape endosomal y la salida del siRNA hacia el citosol, donde se asocia al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), para la posterior unión del siRNA con su mRNA complementario y la degradación del mRNA.

Se han publicado resultados alentadores con el uso de dendrímeros carboxilano en terapia génica. Las uniones entre silicio y oxígeno de las estructuras de estos dendrímeros se hidrolizan lentamente, y por lo tanto, son agentes excelentes para la liberación progresiva de los ácidos nucleicos que transportan. En particular, se han obtenido resultados prometedores en el contexto de la infección por el VIH-1, utilizando estos dendrímeros como agentes transportadores de siRNA que reprimen la expresión de proteínas virales [36, 285]. Sin embargo, la mayoría de los dendrímeros y dendriplexes fallan en liberar y tener una función específica cuando se llega a la fase de modelos animales [10, 183]. Estudios *in vivo* han demostrado que la utilización de estos dendrímeros pueden tener un efecto inhibitorio sobre la replicación del VIH-1 en ratones humanizados [298]. Actualmente, se está desarrollando una intensa investigación con el objetivo de mejorar cada vez más la capacidad terapéutica de los dendrímeros catiónicos.

2. Objetivos

Los resultados de esta Memoria se agrupan en cuatro secciones: efecto del VIH-1 sobre la desregulación de las células B, dendrímeros carbosilano como transfectantes para su uso en terapia génica, efecto de los dendrímeros carbosilano en macrófagos de tipo M1, y cambio de fenotipo de los macrófagos M2 mediado por los dendrímeros carbosilano.

Durante la infección por el VIH-1 las células B sufren una alteración de sus funciones, se hiperactivan y generan anticuerpos no específicos. Estos anticuerpos van dirigidos principalmente contra el VIH-1 y otros patógenos con los cuales la persona ha tenido un contacto previo. Sin embargo, los anticuerpos generados son poco eficaces contra muchas de las infecciones oportunistas que aparecen en la fase clínica de SIDA.

Por otro lado, los dendrímeros carbosilano pueden utilizarse como moléculas que tienen un efecto *per se* en el tratamiento de la infección por el VIH-1 y en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, además de actuar como transportadores de ácidos nucleicos y fármacos.

Los objetivos planteados en esta Memoria fueron los siguientes:

1. Determinar y describir la desregulación de los linfocitos B provocada por el contacto directo entre la partícula viral de VIH-1 y la célula.
2. Estudiar los mecanismos por los cuales el VIH-1 desregula a los linfocitos B. Evaluar la recombinación de cambio de clase, la expresión de la proteína AID y de los miRNA que la regulan. Describir los receptores celulares mediante los cuales se produce la desregulación.
3. Profundizar en la utilización de los dendrímeros carbosilano catiónicos 2G-NN16 y 2G-03NN24 como transfectantes en linfocitos T CD4 primarios y su posible aplicación en terapia génica frente al VIH-1.
4. Analizar si diferentes dendrímeros carbosilano promueven una exacerbación de las funciones de los macrófagos de tipo M1.
5. Estudiar los efectos de distintos dendrímeros carbosilano en la modificación de la polarización de macrófagos humanos de tipo M2 como modelo de TAM.
6. Estudiar la translación del modelo con células humanas a un modelo *in vivo* con TAM murinos.

3. Material y métodos

3.1. MATERIAL

3.1.1. Medios de cultivo y soluciones

En el caso de los cultivos celulares que se realizaron con medios específicos, se indica la composición de cada medio junto a las células con las que se cultivaron. Los medios utilizados para cultivar distintos tipos celulares fueron:

- a) **Medio de cultivo DMEM completo.** Para obtener el medio completo, el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; BiochromAG) se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FBS; Sigma-Aldrich), 1% de glutamina (Normon), 125 mg/ml de ampicilina (Normon), 125 mg/ml cloxaciclina (Normon) y 40 mg/ml de gentamicina (Normon).
- b) **Medio de cultivo RPMI completo.** Para obtener el medio completo, se suplementó el RPMI (BiochromAG) con 10% de FBS, 125 mg/ml de ampicilina, 125 mg/ml cloxaciclina y 40 mg/ml de gentamicina (Normon).

Las soluciones específicas para los experimentos se indican en cada uno de ellos a modo individual. Las soluciones comunes que se utilizaron en distintas partes de la realización de los experimentos fueron:

- c) **Solución para la purificación de esferas magnéticas.** Se utilizó tampón fosfato salino (150 mM ClNa a pH 7.2) (PBS; Lonza), 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) y 2 mM de EDTA (Sigma-Aldrich).
- d) **Solución para citometría.** Se utilizó PBS estéril suplementado con 2% de FBS.
- e) **Solución de bloqueo para citometría con células humanas.** Se utilizó PBS estéril suplementado con 2% de FBS y con IgG humanas diluidas a 1/5000 (Sigma-Aldrich).
- f) **Medio de bloqueo para tinción en criocortes de tejido.** Se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, 1% de BSA, 1/500 de IgG humanas y tritón X-100 (Sigma-Aldrich).

3.1.2. Cultivos celulares primarios

- a) **Células Mononucleares de Sangre Periférica.** Las CMSP de donantes sanos se obtuvieron de *buffy coat* procedentes del centro de transfusiones de Madrid siguiendo las recomendaciones de la normativa vigente (Real Decreto 1088/2005). La sangre se diluyó 1/2 en PBS y se centrifugó en gradiente de densidad Ficoll Hypaque (Rafer) a 1800 rpm durante 30 minutos. Las CMSP se cultivaron en medio completo RPMI 1640. El medio se

suplementó con 60 U/ml de interleuquin (IL)-2 recombinante humana (Murex Diagnostics Corp) para mantener la viabilidad de los linfocitos T en cultivo y 2 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA; Remel) para producir una activación policlonal durante 3 días. Se cultivaron las células a razón de $5 \cdot 10^6$ células/ml a 37 °C en una atmósfera con el 5% de CO₂.

- b) **Linfocitos T CD4.** A partir de las CMSP se purificaron los linfocitos T CD4 mediante inmunoselección magnética (MACS®) usando microesferas metálicas unidas al Ac anti-CD4 (Miltenyi Biotec). Se cultivaron con medio completo RPMI 1640 con 60 U/ml de IL-2 y 2 µg/ml de PHA en la condición de células activadas, a 37 °C en una atmósfera con el 5% de CO₂.
- c) **Células B.** A partir de las CMSP se purificaron las células B mediante inmunoselección magnética (MACS®) usando microesferas metálicas unidas al Ac anti-CD19 (Miltenyi Biotec) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se cultivaron con medio completo RPMI 1640 a 37 °C y con el 5% de CO₂.
- d) **Macrófagos de tipo M1 y M2.** Se purificaron los monocitos a partir de las CMSP mediante inmunoselección magnética (MACS®) usando microesferas metálicas unidas al Ac anti-CD14 (Miltenyi Biotec). Los monocitos se cultivaron a una relación de $0,5 \cdot 10^6$ células/ml durante 7 días en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM L-glutamina y 10% de FBS. Cada 2 días se añadió al cultivo 10^3 U/ml de rh GM-CSF (ImmunoTools) o 10 ng/ml de rh M-CSF (ImmunoTools) para diferenciar los monocitos a macrófagos de tipo M1 y M2 respectivamente, a 37 °C y con el 5% de CO₂.

3.1.3. Cultivos de líneas celulares

- a) **Células 293T.** Línea celular que procede de células embrionarias de riñón humano (HEK, *Human Embryonic Kidney cells*) transformadas con DNA adenoviral, y el antígeno T del virus del simio 40 (SV40T). Estas células tienen genes virales insertados en su genoma, de modo que expresan establemente las proteínas virales. Cuando se transfectan con un plásmido recombinante que contiene el DNA flanqueado por los LTR y por la señal de empaquetamiento se generan partículas virales recombinantes. Se obtuvieron a través de American Type Culture Collection (ATCC-LGC). Cultivada con medio completo DMEM a 37 °C y con el 5% de CO₂.

- b) **Células MT-2.** Línea T linfoblástica inmortalizada con el virus de la leucemia humana tipo 1 (HTLV-1). Se obtuvo a través de AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Cultivada con medio completo RPMI 1640 a 37 °C y con el 5% de CO₂.
- c) **HeLa-CD4.** Línea celular epitelial humana, procedente de un adenocarcinoma de cérvix, que han sido transformadas para expresar cantidades elevadas de CD4 en su superficie. Células cultivadas en medio DMEM completo suplementado con 0.5 mg/ml de G418 a 37 °C y con el 5% de CO₂. Se obtuvo a través del AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.
- d) **Células MC38.** Línea celular procedente de un carcinoma de colon de ratón C57BL/6. Se obtuvieron por gentileza del Dr. Corbí López, Grupo de Biología de las células mieloides, Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid. Cultivadas con RPMI y con 10% de FBS a 37 °C y con el 5% de CO₂.
- e) **Células K562.** Línea celular derivada de pacientes con leucemia mieloide crónica. Se obtuvieron por gentileza del Dr. Corbí López, Grupo de Biología de las células mieloides, Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, CIB, CSIC, Madrid. Cultivadas con medio RPMI con 5% de FBS a 37 °C y con el 5% de CO₂.
- f) **Células RAW264.7γ NO(-).** Macrófagos murinos que expresan iNOS de un modo inducible. Cultivadas con medio RPMI y con 10% de FBS a 37 °C y con el 5% de CO₂. Se obtuvo del ATCC-LGC.

3.1.4. Dendrímeros

Los dendrímeros de estructura carbosilano utilizados en esta Memoria se sintetizaron por el grupo de Dendrímeros para Aplicaciones Biomédicas de la Universidad de Alcalá de Henares (Madrid, España), y su caracterización se llevó a cabo mediante técnicas de espectroscopía de RMN de ¹H, ¹³C y ²⁹Si, espectroscopía de masas y análisis elemental de C, H y N en el mismo grupo.

El dendrímero 2G-S16 es un dendrímero aniónico de segunda generación con 16 grupos sulfonato en la superficie [52]. El dendrímero 2G-NN16 es un dendrímero catiónico de segunda generación con 16 cargas positivas en la superficie que deriva de un núcleo de silicio [202]. Se muestran por primera vez los resultados de tres generaciones de una nueva familia de dendrímeros catiónicos inestables derivada de un núcleo polifenólico [234], 1G-03NN12, 2G-03NN24 y 3G-03NN48, de primera, segunda y tercera generación y con 12, 24 y 48 cargas positivas, respectivamente.

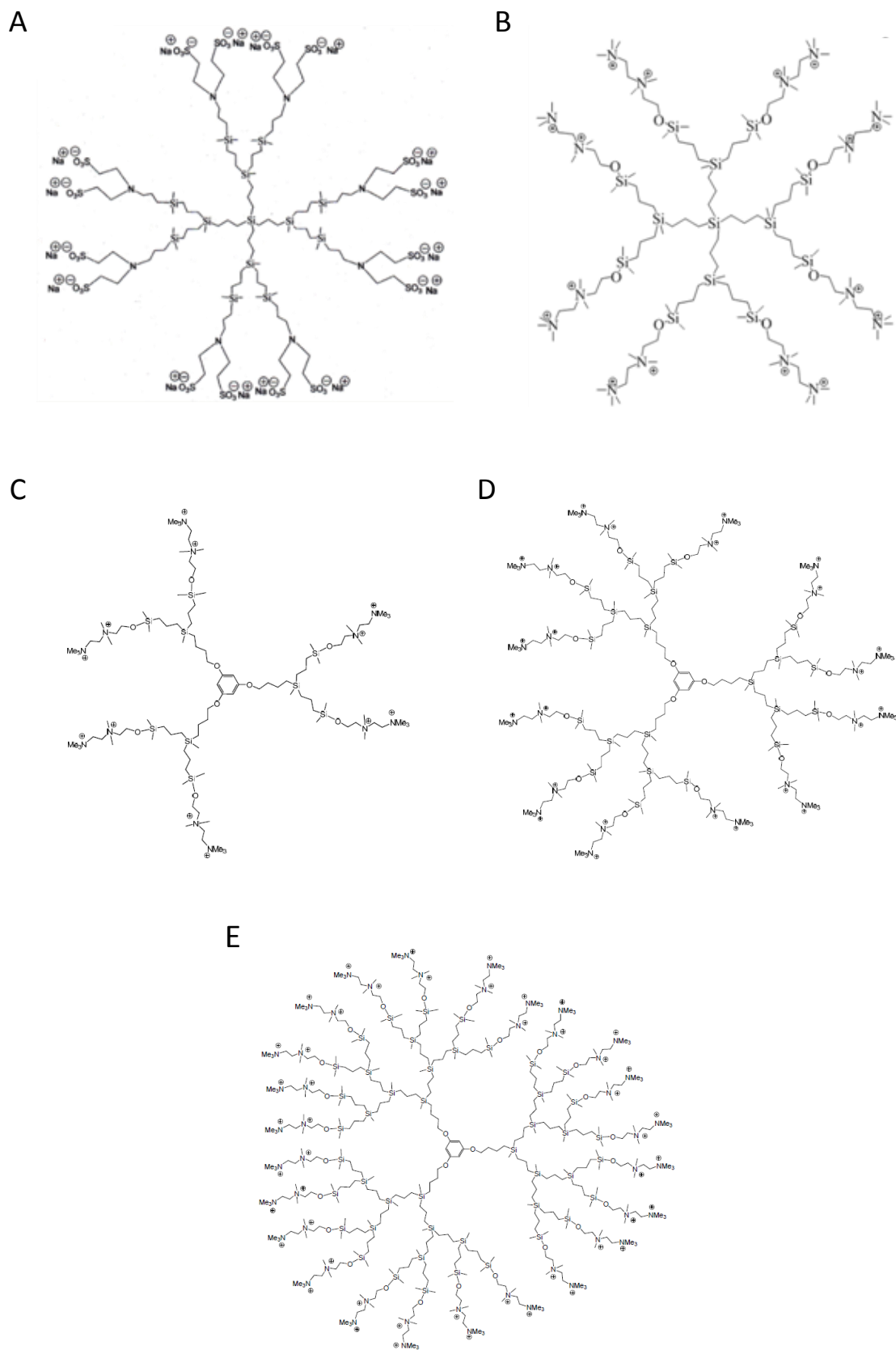


Figura 15. Estructura de los dendrímeros utilizados en esta Memoria. Se muestra el dendrímero 2G-S16 (A), 2G-NN16 (B), 1G-03NN12 (C), 2G-03NN24 (D) y 3G-03NN48 (E).

3.1.5. Inhibidores de quinasas

AMD3100. Compuesto sintético cuya formulación química es 1,1'-[1,4-fenilenbis(metileno)]bis [1,4,8,11-tetraazaciclodecane]. También conocido como mozobil o plerixafor. Molécula antagonista de CXCR4.

GF109203. Compuesto sintético cuya fórmula química es 3-(N-[Dimetilamino]propil-3-indolil)-4-(3-indolil) maleimida. Inhibidor competitivo de PKC y de GSK-3 (del inglés *glycogen synthase kinase-3*).

Wortmannin. Compuesto aislado de *Penicillium funiculosum*. Inhibidor específico de PI3K.

PD98059. Compuesto sintético cuya fórmula química es 2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirán-4-ona. Inhibe la activación de las MAPKK (del inglés *MAP kinase kinase*).

PDTC. Del inglés *Pyrrolidine dithiocarbamate*. Compuesto químico cuya fórmula es pyrrolidina-1-carboditioico acid. Inhibidor de NFκB.

SP600125. Compuesto sintético cuya fórmula química es 1,9-Pirazol antrona. Inhibe JNK.

SB203580. Compuesto sintético cuya fórmula química es 4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol. Inhibe p38 del inglés *p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)*.

ER27319. Compuesto sintético cuya fórmula química es 10-(3-Aminopropil)-3,4-dimetil-9-acridona oxalato. Inhibe la activación de SYK.

3.2. MÉTODOS I

3.2.1. Producción de VIH-1_{NL4.3}

- a) **Producción en células MT-2.** El stock de virus VIH-1_{NL4.3} se llevó a cabo mediante la infección de las células MT-2 con la cepa viral VIH-1_{NL4.3} procedente de transfecciones previas del plásmido pNL4.3 (NIH AIDS Reagent Program) en células 293T (ATCC) [206]. Inicialmente se infectaron $2 \cdot 10^6$ células MT-2 con 100 ng del VIH-1_{NL4.3} en 150 μ l de medio completo RPMI. Se incubó durante 3 horas agitando cada media hora. Se lavaron las células 2 veces con PBS, y se cultivaron en medio de cultivo completo durante 3 días. Las células se pasaron a un *flask* de 75 cm² a razón de $10 \cdot 10^6$ células MT-2 en 5 ml de medio de cultivo completo. Las células se incubaron 3 días, se centrifugaron y las producciones virales se clarificaron por filtración (filtro de 0,45 μ m) y se criopreservó el sobrenadante que contenía el

virus a -80°C . Se usó el sobrenadante de las MT-2 no infectadas como control en la condición sin tratar.

- b) **Producción en CMSP activadas.** Se infectaron las células en $200\ \mu\text{l}$ con la cepa viral VIH-1_{NL4.3} procedente de transfecciones previas del plásmido pNL4.3 en células 293T durante 3 horas a 37°C . Tras este tiempo de incubación, se lavaron las células 3 veces con PBS y se resuspendieron en medio RPMI. El sobrenadante se recogió 3 días post-infección. Se utilizó el sobrenadante de las CMSP activadas no infectadas como control para utilizarlo en la condición no tratada de los experimentos.
- c) **Virus inactivado por calor.** La inactivación viral del VIH-1_{NL4.3}, procedente de las células MT-2 o de CMSP, se llevó a cabo por calentamiento del VIH-1_{NL4.3} a 96°C durante 10 min para utilizarlo como control negativo de la activación como antígenos derivados del VIH desnaturalizados.

3.2.2 Cuantificación del aislado VIH-1_{NL4.3}

La titulación viral del sobrenadante recogido en las células MT-2 y CMSP que contenía el VIH-1_{NL4.3} se cuantificó utilizando el kit de ELISA de Ag p24^{gag} “Innotest HIV antigen mAb” (Innogenetics), según las especificaciones del fabricante.

3.2.3. Citometría de CD40L en células MT-2 y CMSP

Se recogieron las células MT-2 y CMSP de los cultivos, se centrifugaron a $300\ \text{g}$ 10 minutos a 4°C , se resuspendieron con solución de bloqueo de citometría (apartado 3.1.1.e) y se dejaron incubando a 4°C durante 30 minutos. Se añadió el Ac anti-CD40L marcado con ficoeritrina (PE) (Beckman Coulter) y se incubó durante 1 hora a 4°C . Se lavaron 3 veces las células y se cuantificó la señal del Ac por citometría de flujo con el citómetro Gallios (BeckmanCoulter). El análisis de los resultados se hizo con el programa FlowJo versión 7.6.1 (Tree Star Inc).

3.2.4. Tratamiento de las células B

- a) **Tratamientos con VIH-1.** Se trataron 10^6 células B con 25 ng o 125 ng de p24^{gag} de VIH-1_{NL4.3}, 125 ng de p24^{gag} de VIH-1_{NL4.3} inactivado por calor, $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de lipopolisacárido (LPS; Sigma-Aldrich) y $20\ \text{ng}/\text{ml}$ de interleuquina 4 (IL-4; Immunotools) o con $200\ \text{ng}/\text{ml}$ de CD40L (eBioscience) y $20\ \text{ng}/\text{ml}$ de IL-4. Para la condición control se trataron las células con los sobrenadantes de las células MT-2 o CMSP sin infectar, dependiendo de la producción viral utilizada.

- b) **Experimentos de bloqueo del VIH-1.** Se incubó el VIH-1_{NI4.3} a los ratios de volumen de 1/10, 1/20 y 1/50 con suero anti-VIH-1 neutralizante del Dr. Luba Vujcic [281] (AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH) durante 1 hora a 37°C antes del tratamiento de células B.
- c) **Tratamientos con inhibidores de quinasas.** Se trataron las células B con el inhibidor de CXCR4 (AMD3100 a 100 µM) y con inhibidores de quinasas GF109203 (inhibidor de las PKC clásicas a 0,5 µM), wortmannin (inhibidor de PI3K a 100 nM), PD98059 (inhibidor de MEK1 a 5 µM), PDTC (inhibidor de NF-κB a 5 µM), SP600125 (inhibidor de JNK a 5 µM), SB203580 (inhibidor de p38 a 5 µM) y con ER27319 (inhibidor de SYK a 50 µM) durante 4 horas antes de la estimulación con 25 ng/10⁶ células B de VIH-1 generado en las CMSP (apartado 3.2.1.b) o con 200 ng/ml de CD40L y 20 ng/ml de IL-4.

3.2.5. Ensayos de citotoxicidad en las células B con 7AAD

Las células B se trataron con los estímulos (apartado 3.2.4.a y 3.2.4.c) y después de 1, 3 y 6 días de tratamiento (para los ensayos con VIH-1 descritos en 3.2.4.a) o solamente después de 24 horas (para los ensayos con inhibidores de quinasas descritos en 3.2.4.c) se recogieron las células y se determinó la viabilidad celular por marcaje con 0.5 mg/ml de 7-animoactinomycin D (7AAD; Sigma-Aldrich) en solución de citometría. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se fijaron las células añadiendo el 2% de formaldehído (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Se analizaron por citometría de flujo con el citómetro Gallios. El análisis de los resultados se hizo con el programa FlowJo versión 7.6.1.

3.2.6. Ensayo de proliferación de las células B

Después de aislar las células B a partir de las CMSP, se pusieron 2·10⁶ células/ml en PBS en un Falcon y se añadió *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE; Invitrogen) a 5 µM, se incubó durante 10 minutos a 37°C. Después se añadieron 5 volúmenes de RPMI con 5% FCS, se incubó 5 minutos en hielo. Se realizaron 3 lavados con RPMI a 1200 rpm 10 minutos. Se resuspendieron para contarlas, y finalmente plaquearon 500.000 células por pocillo en placas de 48 pocillos y se trataron con los estímulos correspondientes. Después del tiempo de tratamiento se fijaron las células con 2% de formaldehído y se analizaron las células por citometría de flujo utilizando el citómetro Gallios. Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo 7.6.1.

3.2.7. Determinación de la activación y fenotipo de las células B

Para estudiar la activación de las células B, se trataron las células con los estímulos durante 1 y 4 días (para los ensayos con VIH-1 descritos en 3.2.4.a) o solamente 24 horas (para los ensayos con inhibidores de quinasas descritos en 3.2.4.c). Se recogieron las células, se centrifugaron a 600 g 10 minutos a 4°C y se resuspendieron con solución de bloqueo para citometría con 100 µl por condición, se incubaron 30 minutos a 4°C. Después, se incubaron con el Ac monoclonal marcado con fluoresceína (FITC) anti-CD71 (Beckman Coulter) y con el Ac monoclonal marcado con ficoeritrina-cianina 5.1 (PC5) anti-CD69 (Beckman Coulter). Se lavaron 3 veces las células con solución de citometría y se resuspendieron en 400 µl por tubo, se añadió el 2% de formaldehído. Se analizaron por citometría de flujo utilizando el citómetro Gallios. Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo 7.6.1.

Para estudiar la diferenciación de las células B, se trataron las células con los estímulos (apartado 3.2.4.a) durante 1 o 4 días, dependiendo del experimento. Después se recogieron las células, se centrifugaron a 600 g y se resuspendieron con solución de bloqueo para citometría con 100 µl por condición, se incubaron 30 minutos a 4°C. Después, se incubaron con los Acs monoclonales, marcado con FITC anti-CD21, marcado con PE anti-CD10, marcado con PC5 anti-CD27, Ac monoclonal marcado con ficoeritrina-cianina 7 (PC7) anti-CD20 (todos los Acs son de Beckman Coulter). Se lavaron 3 veces las células con solución de citometría y se resuspendieron en 400 µl por tubo, se añadió el 2% de formaldehído. Se analizaron por citometría de flujo utilizando el citómetro Gallios. Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo 7.6.1.

3.2.8. Extracción del mRNA y cuantificación de la proteína AID por PCR cuantitativa

Se trataron las células B durante 24 horas con el VIH-1 y los estímulos indicados en el apartado 3.2.4.a, y durante 48 horas con los indicados en el apartado 3.2.4.c. Posteriormente, se recogieron las células del cultivo, se centrifugaron a 13000 rpm 10 minutos y se realizó la extracción de RNA de las células B utilizando el kit comercial RNeasy mini kit Qiagen Plus (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La integridad del RNA se analizó con 2 µl de muestra mediante el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies), utilizando los *chips* nanoRNA (Agilent Technologies) para saber la integridad de RNA (RIN, *RNA integrity number*) solamente se utilizaron las muestras con RIN superiores a 8. Se utilizaron 100 ng de RNA para retrotranscribirlo (RT) con el sistema GoScript (Promega). La posterior Q-PCR se realizó con la mezcla comercial Master Mix Brilliant II SYBR Green (Stratagene, Agilent Technologies). Las condiciones de reacción de la Q-PCR fueron: 95°C 30 s, 1 minuto 60°C, 72°C 1 minuto durante 40 ciclos en el termociclador Mx3005P (Stratagene). Los cebadores utilizados para amplificar el mRNA de AID fueron: directo

(*forward*;Fw) 5'-CGCGCCGGGGTGCAAATAGCCATC-3', y antisentido (*reverse*;Rv) 5'-ACAGGGGCAAAAGGATGCGCC-3'. Los niveles de mRNA detectados por Q-PCR se normalizaron con los *housekeeping* YWHAZ y β 2microglobulina. Los cebadores para amplificar los *housekeeping* fueron Fw (YWHAZ) 5'-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA-3', Rv (YWHAZ) CCGCCAGGACAAACCAGTAT-3', Fw (β 2microglobulina) 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGTATGTATCT-3' y Rv (β 2microglobulina) 5'-CTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'. Las veces de inducción se calcularon con la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.2.9. Extracción de miRNA y cuantificación por PCR cuantitativa

Después de 24 horas de tratamiento de las células B (apartado 3.2.4.a), se recogieron las células del cultivo, se centrifugaron a 13000 rpm 10 minutos y se realizó la extracción de RNA de las células B utilizando el kit comercial miRNeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la RT y la Q-PCR con el sistema de miRCURY LNA (Exiqon) utilizando los cebadores específicos para la RT y para la Q-PCR (Exiqon) y según las indicaciones de la casa comercial. Las condiciones de reacción de la Q-PCR fueron: 95°C 30 segundos, 1 minuto 60°C durante 40 ciclos. Las veces de inducción se calcularon con la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.2.10. Determinación de proteínas por *western blot*

Extracción de proteínas

Se trataron las células B con los estímulos (apartado 3.2.4.a y 3.2.4.c) y después del tiempo de tratamiento (24 horas para la proteína AID), se recogieron las células B, se centrifugaron a 1500 rpm 10 minutos. Por otro lado, se trataron $3 \cdot 10^6$ células B durante 4 horas con el inhibidor de SYK, ER27319 a 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M, y posteriormente se estimularon las células con 25 ng/ 10^6 células B con el VIH-1 generado en las CMSP (apartado 3.2.1.b). Justo antes de la estimulación con el VIH-1 y después de 15 y 30 minutos de estimulación se extrajeron las proteínas de las células para verificar mediante la técnica de *western blot* la presencia de proteínas fosforiladas. Posteriormente, se lisaron las células, a razón de $1 \cdot 10^6$ células en 50 μ l de solución RIPA con 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH8.0, 1.0% NP-40, 1.0% SDS, 0.5% DOC (*deoxycholate, deoxycholic acid, sodium*) (todos los productos son de Sigma-Aldrich) y 10 μ l/ml de una mezcla de inhibidores de proteasas (ThermoScientific). Para el estudio de la fosforilación de proteínas. Las células B se recogieron y se lisaron a razón de $2 \cdot 10^6$ células en 30 μ l de solución que contiene 20mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 2.5mM MgCl₂, 250mM sucrosa, 0.05% NP-40, 0.5% Tritón X-100, y un cóctel de inhibidores de proteasas y de fosforilasas (Thermo Scientific). Se lisaron durante 30 minutos en hielo agitando cada 5 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm 30 minutos a 4°C. Para cuantificar las proteínas se utilizó el ensayo de BCA (ThermoScientific).

Electroforesis de proteínas

La cantidad de proteína cargada en los geles de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dependió de los experimentos, utilizando un rango de entre 20 y 50 µg de proteína. El marcador de tamaño molecular utilizado fue *Precision Plus Protein Prestained Standard Western C* (BioRad). El porcentaje de acrilamida/bis-acrilamida empleado en los geles dependió del tamaño molecular (KDa) de la proteína a estudiar, variando entre el 8 % (en los geles para evaluar SYK y JNK) y el 10 % (en los geles para evaluar AID). La electroforesis del gel se hizo en condiciones reductoras, a 20 mA para la fase concentradora del gel y a 30 mA para la fase de resolución. Tras la separación proteica, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (*polyvinylidenedifluoride*; Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting, BioRad) previamente hidratada y equilibrada con metanol, por electrotransferencia.

Revelado de la membrana de PVDF

La membrana de PVDF se bloqueó a temperatura ambiente durante 1 hora con una solución bloqueante, que contenía un 5% de leche deshidratada en polvo (Nestlé) y 0,5% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) en PBS, y con 3% de BSA y 0,5% de Tween 20 en PBS para el estudio de fosforilación. Posteriormente, la membrana de PVDF se incubó con el Ac primario. Se incubaron las membranas 18 horas para los Acs primarios anti-AID (Santa Cruz Biotechnology), antifosfo-SykY525/526 (R&D System), antifosfo-SykY323 (Santa Cruz Biotechnology), antifosfo-JNK (Abcam), anti-SYK (Santa Cruz Biotechnology) o anti-JNK (Santa Cruz Biotechnology), o 1 hora para anti-actina (Sigma-Aldrich). Después se lavó la membrana 3 veces, 10 minutos cada lavado en agitación con PBS + Tween 20 (Sigma-Aldrich). La detección se realizó mediante un Ac secundario frente a inmunoglobulinas de la especie de donde se había obtenido el Ac primario, marcado con peroxidasa (HRP, *horse radish peroxidase*). Las membranas se revelaron utilizando el kit *Immun-Star Wester C Chemiluminescent Kit* (BioRad) en el transiluminador GelDoc XR (BioRad).

3.2.11. Cuantificación de inmunoglobulinas en el sobrenadante celular

Las células B se trataron con los estímulos (apartado 3.2.4.a) y 5 días después se recogieron las células, se centrifugaron a 13000 rpm 10 minutos y se guardaron los sobrenadantes. La cantidad total de IgG, IgE e IgA en el sobrenadante de los cultivos celulares de las células B se cuantificó utilizando la técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), con los kit comerciales de Innovative Research, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las placas se leyeron inmediatamente con el lector de placas Synergy 4 (Biotek).

3.2.12. Cuantificación de inmunoglobulinas en las células B

Las células B se trataron con los estímulos (apartado 3.2.4.a) y 5 días después se recogieron las células, se centrifugaron a 600 g 10 minutos y se resuspendieron en solución de bloqueo de citometría. Se permeabilizaron utilizando el kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Se bloquearon durante 1 hora y posteriormente se añadió el Ac anti-CD19 (Beckman Coulter) (que se utilizó como marcador para seleccionar las células en una ventana previa), y los Acs monoclonales marcados con FITC: anti-IgD (Beckman Coulter) y anti-IgE (Thermo Scientific); marcado con PE: anti-IgG (Miltenyi Biotec); marcado con PC5: anti-IgA (Jackson ImmunoResearch); marcado con biotín: anti-IgM (Beckman Coulter). Este último Ac fue revelado por el Ac secundario PC7. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo utilizando el citómetro Gallios. Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo 7.6.1.

3.3. MÉTODOS II

3.3.1. Ensayo de citotoxicidad por MTT en los linfocitos T CD4

El ensayo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich) permite determinar aquellos daños celulares que se traducen en una disminución de la actividad mitocondrial de la célula. El ensayo se basa en la capacidad que tienen las células viables de reducir el MTT a cristales de formazán. Se trataron las células en placa de 96 pocillos con los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24 (5 μ M) (descritos en 3.1.4) o los dendriplexes con siRNA-Nef a las concentraciones indicadas en cada apartado durante 24 horas. Se añadió MTT al cultivo y transcurridas 4 horas se centrifugó la placa a 13000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO) a los pocillos para disolver los cristales de formazán. Como control de muerte celular se trataron los linfocitos con DMSO al 20% durante el mismo tiempo que los estímulos. Se midió la absorbancia las placas con el lector Synergy 4 (Biotek).

3.3.2. Ensayo de proliferación en los linfocitos T CD4

Se trataron los linfocitos T CD4 con el dendrímero 2G-NN16 y 2G-03NN24 a 5 μ M (descritos en 3.1.4), con PHA o con la combinación de 2G-NN16 + PHA o 2G-03NN24 + PHA durante 48 horas. Después, los linfocitos se trataron con 1 mCi de [³H] thymidine (PerkinElmer) durante 16 horas, se centrifugaron y se recogieron con filtros de fibra de vidrio (PerkinElmer) utilizando un colector de células automático. La radioactividad incorporada se midió con el contador de luminiscencia 1450 Microbeta Luminiscence Counter (PerkinElmer).

3.3.3. Silenciamiento específico de la proteína Nef

Los siRNA fueron sintetizados por Dharmacon RNA Technologies. La secuencia utilizada para el siRNA-Nef fue 5'-GUGCCUGGCUAGAAGCAC-3', y para el siRNA-random 5'-ACACGAAGAUCGGUCCGUG-3'. Se transfectaron las células HeLa CD4 con el plásmido pNefG2A-GFP utilizando lipofectamina (Invitrogen). 48 horas después se trataron las células con siRNA-Nef a 50, 100, 200 y 400 nM, y con siRNA-random a 400 nM durante 48 horas. Para la cuantificación por citometría de flujo, se resuspendieron en 400 µl por condición y se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo utilizando el citómetro Gallios. Para la cuantificación por *western blot*, se recogieron las células del cultivo después de las 48 de tratamiento, y se lisaron y analizaron como se indica en el apartado 3.2.10. En este caso, los Acs primarios utilizados fueron anti-GFP (Roche) y RhoA (Santa Cruz Biotechnology) que se incubaron durante 1 hora a 4°C. Los anticuerpos secundarios fueron frente a inmunoglobulinas de la especie de donde se había obtenido el Ac primario, marcados con peroxidasa (HRP).

3.3.4. Formación del dendriplex, estabilidad y protección frente a las RNAsas

Se pusieron en contacto individualmente el siRNA-Nef (250 nM) y el siRNA-random (250 nM) (descritos en el apartado 3.3.3) con el dendrímero 2G-03NN24 (descrito en el apartado 3.1.4) a los ratios de cargas 1:2, 1:4, 1:8 y 1:10 en medio de cultivo RPMI. Después de 30 minutos, 5 horas y 24 horas se cogió parte de cada una de las muestras y se cargaron en geles de agarosa al 2% añadiendo el marcador de ácidos nucleicos *gel red* (Biotium) a 1/10000. Como marcador de peso molecular se utilizó *100bp DNA ladder* (Promega).

Por otro lado, después de 30 minutos de la formación del complejo 2G-03NN24/siRNA-Nef, se añadieron 2 U heparina (por cada µg de siRNA) para promover la liberación del siRNA por parte del dendrímero. En otros tubos, se añadió 0.25% de RNAsa (Invitrogen) para degradar el siRNA, y en otros tubos se trataron los complejos con RNAsa y posteriormente con heparina y después se cargaron igualmente en geles de agarosa al 2%.

3.3.5. Eficiencia de transfección del siRNA-Nef en linfocitos T CD4

El siRNA-Nef547 fue sintetizado por Dharmacon RNA Technologies. La secuencia utilizada fue 5'-GUGCCUGGCUAGAAGCAC-3'. Se puso en contacto el siRNA-Nef547 (250 nM) con el dendrímero 2G-03NN24 a ratio de cargas 1:4 en medio de cultivo RPMI. Después de 30 minutos, se trataron los linfocitos T CD4 con los dendriplexes formados durante 24 horas. Se recogieron las células del cultivo y se realizó un lavado ácido de las células con PBS-glicina, pH 3,2, para eliminar el siRNA no internalizado adherido a la superficie celular, seguido de 3 lavados con PBS antes de

sus análisis por citometría de flujo con el citómetro Gallios. Los resultados se analizaron con el programa FlowJo versión 7.6.1.

3.3.6. Efecto de inhibición de la replicación del VIH-1 en linfocitos T CD4

Se estimularon los linfocitos T CD4 con 2 µg/ml de PHA durante 48 horas. Se infectaron con 20 ng de p24^{gag} de VIH-1 (por cada 10⁶ T CD4) generado en las células MT-2 durante 3 horas, y después se lavaron 3 veces las células. Se trataron con los siRNA-random y siRNA-Nef sólo, y con los dendriplex formados (descrito en el apartado 3.3.4) 2G-NN16/siRNA-Nef y 2G-03NN24/siRNA-Nef durante 3 días y se recogieron los sobrenadantes para analizar la presencia de virus (apartado 3.2.2).

3.4. MÉTODOS III y IV

3.4.1. Ensayos de citotoxicidad en los macrófagos

A día 7 de la diferenciación se trataron los macrófagos de tipo M1 y M2 en placa de 96 pocillos con los dendrímeros 2G-S16 a 3, 5, 10 y 15 µM, 2G-NN16 a 5, 10 y 15 µM, 1G-03NN12 a 3, 5, 10 y 15 µM, 2G-03NN24 a 3, 5, 10 y 15 µM y 3G-03NN48 a 3, 5, 10 y 15 µM (descritos en 3.1.4) durante 24 horas. Se realizó el ensayo de MTT (descrito en el apartado 3.3.1).

Por otro lado, para evaluar la toxicidad mediante el marcaje con 7AAD, a día 7 de la diferenciación se trataron los macrófagos de tipo M1 y M2 en placa de 48 pocillos con los dendrímeros 2G-S16 a 5 y 10 µM, 2G-NN16 a 5 y 10 µM, 1G-03NN12 a 3 y 5 µM y 2G-03NN24 a 3 y 5 µM durante 24 horas. Se recogieron las células en tubos de citometría y se añadieron 0.5 mg/ml de 7AAD. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se fijaron las células añadiendo el 2% de formaldehído. Se analizaron por citometría de flujo con el citómetro Gallios. El análisis de los resultados se hizo con el programa Kaluza versión 1.1 (Beckman Coulter).

3.4.2. Cuantificación de proteínas en el sobrenadante celular de los macrófagos

Para determinar la presencia de TNF-α e IL-12p40 en el sobrenadante de los macrófagos de tipo M1 y M2, se trataron las células durante 10 minutos con los dendrímeros 2G-S16 a 10 µM, 2G-NN16 a 5 µM, 1G-03NN12 a 3 y 5 µM y 2G-03NN24 (descritos en 3.1.4), después se estimularon durante 24 horas con 10 ng/ml de LPS (InvivoGen). Se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante a -80°C para su posterior cuantificación. Se llevó a cabo un ensayo de ELISA para cuantificar el TNF-α

(ImmunoTools) y la IL-12p40 (BD Pharmingen) en los sobrenadantes de los M1 y M2, siguiendo los protocolos suministrados por los fabricantes.

Para determinar la presencia de IL-10 en el sobrenadante de los macrófagos de tipo M1 y M2, se trataron las células durante 10 minutos con los dendrímeros 2G-S16 a 10 μ M, 2G-NN16 a 5 μ M, 1G-03NN12 a 3 y 5 μ M y 2G-03NN24 y después se estimularon durante 24 horas con 10 ng/ml de LPS. Por otro lado se trataron primero con 10 ng/ml de LPS durante 10 minutos y 24 horas con los dendrímeros 2G-S16 a 10 μ M, 2G-NN16 a 5 μ M, 1G-03NN12 a 3 y 5 μ M y 2G-03NN24. También se incubó el LPS con los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 durante 10 minutos y después se trataron los M2 durante 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante a -80°C para su posterior cuantificación. La liberación de IL-10 por los M2 se cuantificó por ELISA (ImmunoTools) según las indicaciones de la casa comercial.

Para determinar las citoquinas IL-1 β , IL-6, CCL3 y CCL4 en el sobrenadante de los macrófagos M1, se trataron las células durante 24 horas con los dendrímeros 2G-S16 a 10 μ M, 2G-NN16 a 5 μ M, 1G-03NN12 a 3 y 5 μ M y 2G-03NN24. Se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante a -80°C para su posterior cuantificación. Las citoquinas IL-1 β , IL-6, CCL3 y CCL4 se evaluaron con el sistema Flow Cytomix (eBioscience), según las instrucciones del fabricante. Se adquirieron los eventos en el citómetro Gallios. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el programa FlowCytomixPro, versión 3.0.

Para cuantificar Activina A en el sobrenadante de los cultivos de macrófagos, se trataron los M2 con 1G-03NN12 y 2G-03NN24 a 5 μ M durante 24 horas. Posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 13000rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se analizaron con el kit de ELISA comercial human activin A (R&D Systems) según las indicaciones de la casa comercial.

3.4.3. Análisis de la expresión génica en macrófagos

Se trataron los M1 y M2 con los dendrímeros 2G-S16 (10 μ M), 2G-NN16 (5 μ M), 1G-03NN12 (5 μ M) y 2G-03NN24 (5 μ M) (descritos en 3.1.4) durante 24 horas. La extracción de RNA se realizó utilizando kit RNeasy Plus Mini kit según las indicaciones del fabricante. Se cuantificó el RNA con el Nanodrop. La retrotranscripción se hizo con el kit GoScript Reverse Transcription System según instrucciones del fabricante (Promega). El cDNA de cada condición se analizó por duplicado en las *Gene Card* (Roche), diseñadas por el Dr. Corbí López (Grupo de Biología de las células mieloides, Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones. CIB, CSIC, Madrid).

3.4.4. Análisis de la expresión del mRNA en macrófagos

Para analizar la expresión del mRNA de quimioquinas y receptores de quimioquinas en los M1, se trataron las células con el dendrímero 2G-03NN24 (5 μ M) durante 24 horas. Para analizar la expresión de genes definitorios de los M1 y los M2, se trataron los M2 con los dendrímeros 1G-03NN12 (5 μ M) o 2G-03NN24 (5 μ M) durante 24 horas. Posteriormente, se lisaron las células y la extracción de mRNA se realizó utilizando kit RNeasy Plus Mini kit según las indicaciones del fabricante. Se cuantificó el RNA con el Nanodrop. La integridad del RNA se analizó mediante el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) usando nanochips de RNA (Agilent Technologies). La retrotranscripción se hizo con el kit GoScript Reverse Transcription System según instrucciones del fabricante. Para la reacción de Q-PCR, el RNA se amplificó utilizando los cebadores específicos para CCR2A, CCR2B, CCR7, CCL2, CCL3, CCL4, CCL22, EMR1, IGF1, FOLR2, SLC40A1, HTR2B, INHBA, SERPINE1, FLT1, EGLN3, ALDH1A2 (Eurogentec) diseñados con el Universal Human Probe Roche library system (Roche Diagnostics), junto con las sondas específicas (Roche). Cada experimento se realizó por triplicado y los resultados se analizaron en el programa iQ5 2.0 (Bio-Rad).

3.4.5. Ensayo de proliferación de las células K562

Se trataron los macrófagos de tipo M1 con el dendrímero 2G-S16 a 10 μ M, y con los dendrímeros 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 a 5 μ M durante 24 horas (descritos en 3.1.4) y posteriormente se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares. Por otro lado, se trataron los M2 con 1G-03NN12 y 2G-03NN24 a 5 μ M durante 24 horas. Después del tiempo de tratamiento, se recogieron los sobrenadantes de los macrófagos tratados y también de los M1 y M2 sin tratar, se diluyeron a $\frac{1}{2}$ y se utilizaron para cultivar las células K562 durante 72 horas. Posteriormente se analizó la proliferación celular por recuento de células K562 viables por citometría de flujo con el citómetro Gallios. Los macrófagos se seleccionaron respecto al tamaño y complejidad de la población total, pudiéndose de este modo distinguir las células vivas de los restos celulares. El análisis de los resultados se hizo con el programa Kaluza versión 1.1.

3.4.6. Ensayo de fagocitosis en los macrófagos de tipo M2

En primer lugar se recogieron M2 sin tratar y se analizaron por citometría de flujo para evaluar la autofluorescencia que emitían los macrófagos y establecer los valores de referencia en los parámetros de adquisición del citómetro de flujo, evitando falsos positivos. Posteriormente, se trataron los macrófagos de tipo M2 con el dendrímero 1G-03NN12 y 2G-03NN24 a 5 μ M (descritos en 3.1.4) durante 24 horas. Se recogieron los macrófagos tratados del cultivo, junto con los M1 sin tratar y los M2 sin tratar, y se añadieron partículas de *E.coli* marcadas (*E.coli-pHrodo*; Invitrogen). Por otro lado, se incubaron los macrófagos de tipo M1 y M2 con *E.coli* a 4°C como

control negativo de fagocitosis y a 37°C como control positivo de la fagocitosis basal de los M1 y los M2. Todas las condiciones se dejaron 15 minutos incubando a las temperaturas correspondientes. Se paró la fagocitosis de todas las condiciones con hielo, se centrifugaron los macrófagos para lavar el exceso de *E.coli*, y se resuspendieron en solución de citometría. Se analizó con el citómetro Gallios, y los macrófagos se seleccionaron respecto al tamaño y complejidad de la población total, pudiéndose de este modo distinguir las células vivas de los restos celulares, y después, de la población de células vivas, se analizó la fluorescencia que se basaba en la acidificación de las partículas de *E.coli* cuando se fagocitaban. El análisis de los resultados se hizo con el programa Kaluza versión 1.1.

3.4.7. Análisis de la fosforilación de proteínas en los macrófagos de tipo M2

Se trataron los macrófagos de tipo M2 con los dendrímeros 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 (descritos en 3.1.4) a 5 µM durante 24 horas. Posteriormente se lisaron las células con solución RIPA y 10 µl/ml de una mezcla de inhibidores de proteasas (ThermoScientific), durante 30 minutos en agitación en hielo. Se cuantificó la cantidad de proteína extraída por el ensayo de BCA. Se realizó el *array* de fosfo-quinasas Human Phospho-kinase Array (R&D Systems). El análisis se hizo con el programa GenePixPro versión 6.0 (Molecular Devices).

Posteriormente se realizó un estudio de redes de asociaciones entre proteínas utilizando el programa String versión 9.05. La asociación entre proteínas se calculó teniendo en cuenta el *score* de datos experimentales y de las asociaciones en bases de datos como pruebas que sugerían un vínculo funcional. Se calcularon las asociaciones tomando como valor mínimo de *score* 0.4, y por otro lado, se realizó otro análisis más restrictivo tomando como valor mínimo aceptable un *score* de 0.9.

3.4.8. Inducción y estudio de tumores en ratones C57BL/6

Se cultivaron las células MC38 (descrito en el apartado 3.1.3.d) durante dos semanas para obtener un número suficiente de células. Se recogieron las células de los cultivos, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS. Se utilizaron ratones C57BL/6 de 8 semanas y se les inyectaron subcutáneamente en el lomo $5 \cdot 10^5$ células MC38 a cada ratón. Tres días después de la inoculación de las células tumorales se trataron los ratones con el dendrímero 2G-03NN24 a 15 µM (descrito en el apartado 3.1.4) o con PBS peri-tumoralmente. Este tratamiento se repitió cada 24 horas durante 18 días. Durante este período de tiempo se evaluó el crecimiento del tumor mediante mediciones del tamaño de la masa tumoral cada 24 horas. Los días 8, 9, 15 y 16 post-inyección del dendrímero no se realizaron mediciones del tamaño del tumor. Esta medición la realizaron los técnicos del animalario del CIB, centro del CSIC.

El día 21 post-inyección de las MC38 se sacrificaron los animales. Se extrajeron los tumores de dos ratones control y de tres ratones tratados, se lavaron con PBS y se mantuvieron en formaldehído al 4,0% tamponado a pH 7 y estabilizado con metanol. Se obtuvieron dos secciones longitudinales de la masa tumoral que se incluyeron en bloques de parafina para su estudio histopatológico y su tinción con Hematoxilina/Eosina. Para calcular los parámetros de índice mitótico, macrófagos peritumorales y vasos intratumorales, se utilizaron 10 campos de 40X de cada muestra y se calculó el promedio de todos ellos. Los estudios histológicos y celulares se externalizaron a la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense.

También se extrajeron los tumores de dos ratones control y de dos ratones tratados. Se lavaron con PBS y se incluyeron en OCT (Dako) para su congelación con nitrógeno líquido. Posteriormente se realizaron criocortes para su estudio por inmunofluorescencia. Se descongelaron los cristales con las muestras, se hidrataron con PBS y se bloquearon con medio de bloqueo (descrito en el apartado 3.1.1.f) durante 1 hora. Se añadió el Ac primario anti-iNOS (generado en conejo; Santa Cruz Biotechnology) a 1:100 y se incubó durante 1 hora. Se lavaron los cristales con PBS 3 veces. La detección de iNOS se realizó incubando durante 1 hora el Ac anticonejo marcado en Cy3, y al mismo tiempo se añadió el Ac anti-F4/80 marcado con Cy5 a 1:100 (Santa Cruz Biotechnology). Se lavaron los cristales 3 veces con PBS y una vez con agua destilada. Se añadió DAPI (Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:5000 y se incubó 1 minuto. Se montaron los cristales con medio de montaje (Dako mounting médium; Dako) se dejaron secar y se guardaron en oscuridad a 4°C para el posterior análisis por microscopía confocal (Plataforma de Microscopía Confocal del Hospital General Universitario Gregorio Marañón).

3.4.9. Análisis de la expresión de iNOS por citometría de flujo

Se cultivaron las células RAW 264.7^{NO(-)} que son macrófagos murinos y expresan iNOS de un modo inducible (descrito en el apartado 3.1.3.f) durante dos semanas. Se trataron las células de dos placas P100 durante 24 horas con 100 ng/ml de LPS y 100 U/ml de IFN γ como control positivo para inducir la expresión de iNOS. Por otro lado, se trataron las células MC38 durante 24 horas con el dendrímero 2G-03NN24 a 5 μ M. Se recogieron todas las células, se bloquearon con solución de citometría suplementada con 10% BSA y 1:500 IgG de ratón durante 1 hora a 4°C. Se añadió el Ac anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology) a 1:100 y se incubó 1 hora a 4°C. Se lavaron las células y se marcaron con anti-F4/80 monoclonal marcado con Cy5 a 1:100 (Santa Cruz Biotechnology), y con anticonejo marcado con FITC a 1:100. Se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con el 2% de formaldehído. Se analizó con el citómetro Gallios, y el análisis de los resultados de adquisición se realizó con el programa Kaluza versión 1.1.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los experimentos con marcadores de superficie y de las subpoblaciones de las células B se realizó utilizando el test no paramétrico U de Mann-Whitney, debido a que el número de donantes fue pequeño. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa SPSS versión 17.0 (IBM Inc.). Los resultados de los experimentos realizados en las secciones II, III y IV se analizaron utilizando el test pareado no paramétrico de Wilcoxon con el programa GraphPad Prism 5 versión 5.01 (GraphPad software Inc.). Los resultados del experimento de medición del tamaño del tumor en ratones se analizaron con el test no paramétrico U de Mann-Whitney, para tener en cuenta la variabilidad entre condiciones que pueda deberse a las diferencias intrínsecas que presentan los animales entre ellos. Los resultados se han representado como la media o el promedio, y se ha representado la desviación estándar (SD) o el error estándar de la media (SEM) dependiendo de los experimentos (en cada caso se indica en el pie de figura). Se consideró estadísticamente significativo un valor de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

4. Resultados

4.1. DESREGULACIÓN DE LAS CÉLULAS B POR EL VIH-1

4.1.1. Desregulación fenotípica de las células B por el VIH-1

a) Viabilidad de las células B *in vitro*

Las células B se obtuvieron a partir del procesamiento de *buffy coat* de voluntarios sanos y se cultivaron *in vitro* con medio de cultivo en presencia o ausencia de factores estimulantes. Para estudiar la viabilidad de las células B, se realizó un marcaje con 7AAD y se analizó por citometría de flujo.

Como se observa en la **figura 16A**, la viabilidad de las células B sin tratar (NT) descendió un 50% en menos de 3 días como era de esperar, puesto que estas células son difíciles de mantener en un cultivo *in vitro*. Sin embargo, la supervivencia de las células B expuestas al VIH-1 (VIH 25 ng y VIH 125 ng de p24^{gag}) fue más elevada que el control (NT), llegando a tener un 60% de células vivas después de 6 días de tratamiento. El aumento de viabilidad también se observó con las células tratadas con LPS e IL-4 (LPS/IL-4) y con CD40L e IL-4 (CD40L/IL-4) que presentaron viabilidades de un promedio del 40-50%. En cambio, las células expuestas al VIH-1 inactivado por calor (VIH inactivado), que correspondería con una estimulación por Ags del VIH-1 desnaturalizados, presentaron viabilidades inferiores al 30%, aproximándose a los valores de las células sin tratar. Los valores de porcentajes de viabilidad se calcularon tomando como valor de referencia 100% para la condición de células NT en el día 1 post-estimulación (**figura 16A**).

El VIH-1 utilizado para los experimentos se generó mediante la infección de células MT-2. Las células MT-2 no contienen CD40L en la membrana celular, por lo tanto, las partículas virales producidas no contienen CD40L en su superficie, y en consecuencia, la mejor supervivencia observada con las células B expuestas al VIH-1 sería independiente de la vía de activación de CD40L/CD40 (**figura 16B**).

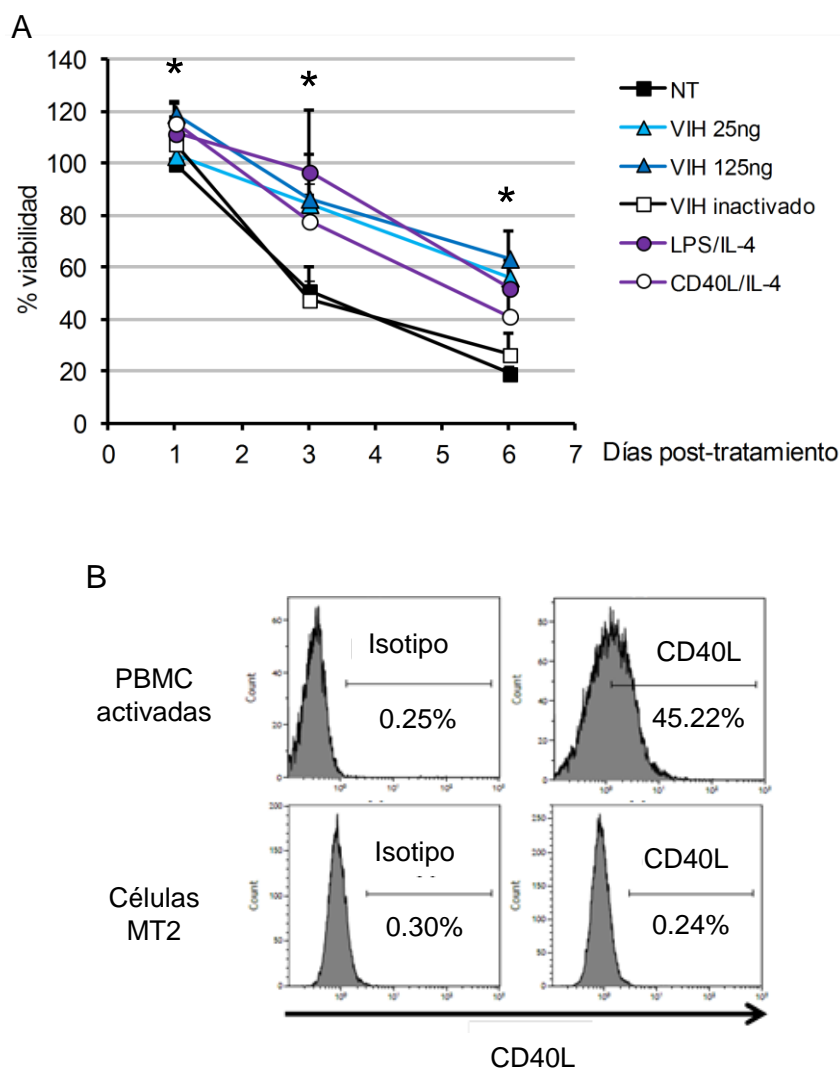


Figura 16. Supervivencia de las células B. (A) Se muestran los porcentajes de supervivencia de las células B sin tratar (NT), expuestas a 25 ng y 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 (VIH 25 ng y VIH 125 ng), a 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 inactivado por calor (VIH inactivado) y activadas con LPS e IL-4 (LPS/IL-4), y con CD40L e IL-4 (CD40L/IL-4). Se indica el porcentaje de células viables cuantificado como la población 7AAD negativa, tras 1, 4 y 6 días de tratamiento. Como valor de referencia se ha utilizado la condición de células sin tratar (NT) en el día 1 post-tratamiento referido al 100%. Los porcentajes se calcularon del siguiente modo, células vivas tratadas/células vivas NT día 1 x 100. Se muestra el promedio de 7 donantes para las condiciones 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 y 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 inactivado, de 5 donantes para el tratamiento con CD40L/IL-4, y de 12 donantes para las células sin tratar y expuestas a 25 ng de p24^{gag} de VIH-1 con los símbolos indicados en la leyenda, se indica la desviación estándar (SD). * p<0.05 para las condiciones VIH-1, LPS/IL-4 y CD40L/IL-4 comparadas con las células NT. **(B)** La expresión de CD40L se analizó por citometría de flujo en CMSP activadas y en la línea celular MT-2. Se muestran los resultados de un experimento representativo, se hicieron dos experimentos.

b) Proliferación de las células B *in vitro*

El aumento de supervivencia observado en las células B expuestas al VIH-1 podía ser debido a una mayor resistencia al proceso de apoptosis, o a la proliferación de las células B en presencia del virus. Para determinar si las células B estaban proliferando cuando se trataban con el VIH-1, se marcaron con CFSE y posteriormente se trataron con los estímulos del mismo modo que se ha detallado en el apartado anterior. Tras 1, 3 y 6 días de tratamiento se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la **figura 17A**, la proliferación se cuantificó como la pérdida de señal de CFSE, puesto que las células al dividirse pierden la intensidad de fluorescencia que tenía el marcador en la célula progenitora.

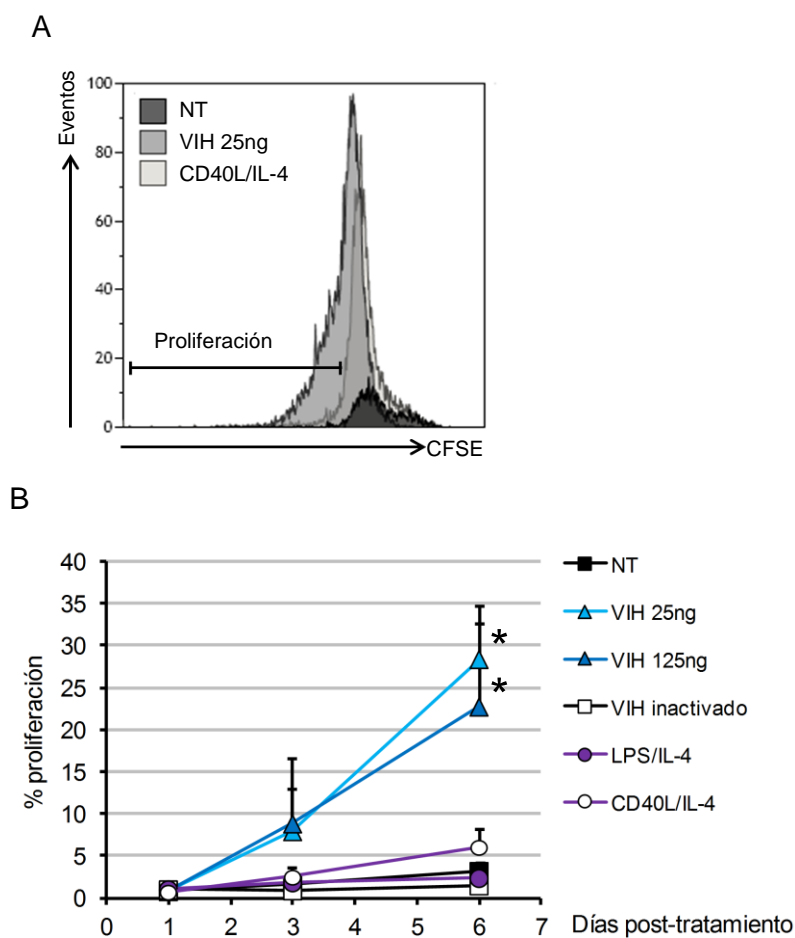


Figura 17. Proliferación de las células B. (A) Se representa la intensidad de fluorescencia de CFSE de las células B sin tratar (NT), expuestas a 25 ng de p24^{gag} VIH-1 (VIH 25 ng) y con CD40L e IL-4 (CD40L/IL-4) durante 6 días. (B) Se muestra el porcentaje de proliferación de las células viables tras 1, 3 y 6 días de tratamiento de las células NT, expuestas a 25 ng y 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 expuestas a 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 inactivado por calor (VIH inactivado), y activadas con LPS e IL-4 (LPS/IL-4), y con CD40L e IL-4 (CD40L/IL-4). Los resultados representan el promedio +SD de 7 donantes para las condiciones 125 ng de p24^{gag} VIH-1 y 125 ng de p24^{gag} VIH-1 inactivado, de 5 donantes para el tratamiento con CD40L/IL-4, y de 12 donantes para las células sin tratar y expuestas a 25 ng de p24^{gag} de VIH-1. * $p < 0.05$ para las condiciones de 25 ng y 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 comparadas con las células NT.

En la **figura 17B** se observa que las células expuestas al VIH-1 a concentraciones de 25 ng y de 125 ng de p24^{gag} VIH-1 proliferaron más que con el resto de condiciones, tanto a día 3 como a día 6 post-tratamiento. Sin embargo, las células tratadas con LPS/IL-4 o con CD40L/IL-4 no mostraron signos de proliferación (**figura 17B**), a pesar de que indujeron una mayor supervivencia que las células sin tratar (**figura 16A**). Estos resultados sugieren que las vías de señalización para la supervivencia inducidas por el VIH-1 y por LPS/IL-4 y CD40L/IL-4 podrían ser independientes.

c) Activación de las células B

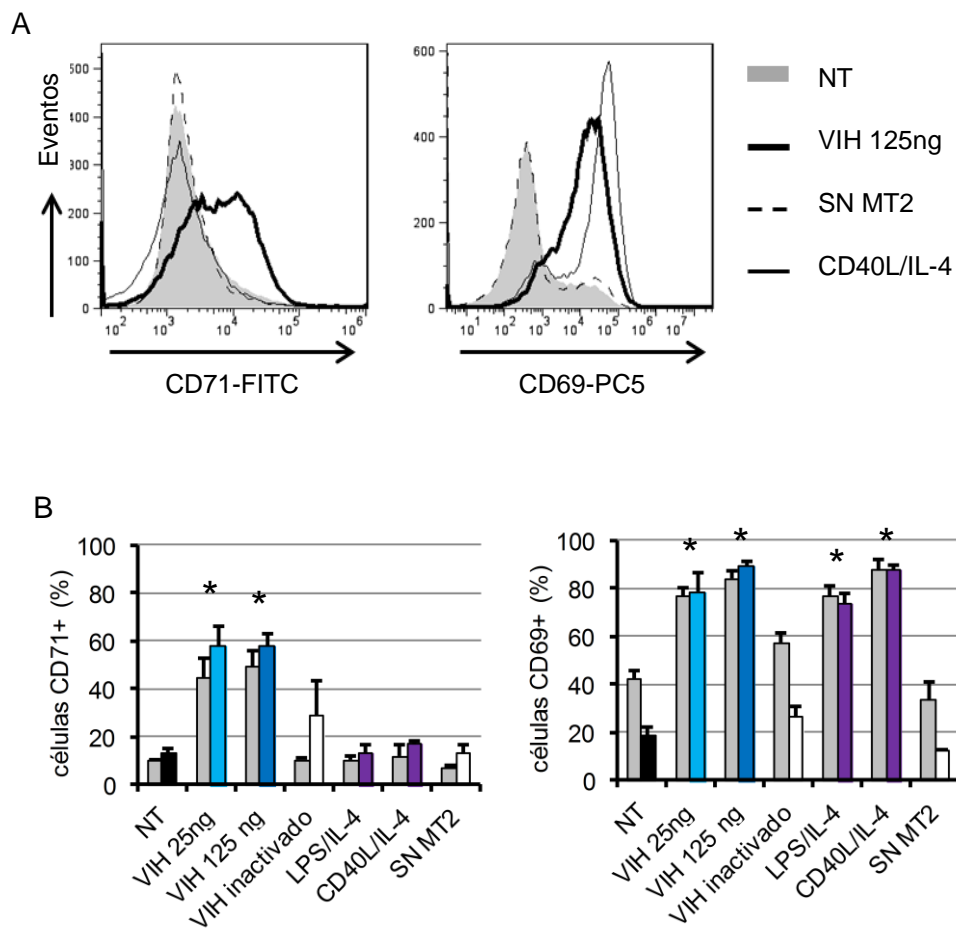


Figura 18. Expresión de CD71 y CD69 en las células B. (A) Histogramas de la expresión de los marcadores de superficie CD71 (izquierda) y de CD69 (derecha) en las células B con los tratamientos que se indican. (B) Se muestran las células NT, estimuladas con VIH-1 a 2 concentraciones distintas (25 ng y 125 ng de p24^{gag} de VIH-1), con VIH-1 inactivado por calor (VIH inactivado), con LPS/IL-4, con CD40L/IL-4 y tratadas con el sobrenadante de las células MT-2 como control (SN MT2). Se indican los porcentajes tras un día (en gris), y 4 días de tratamiento de CD71 (izquierda) y de CD69 (derecha). Se muestra el promedio más la SD de 7 donantes para todas las condiciones, excepto para la condición SN MT-2 y CD40L/IL-4 donde los datos corresponden a 3 donantes. *p<0.05 respecto a la condición de las células NT.

El aumento de la viabilidad y proliferación observada en las células B expuestas al VIH-1 podría explicarse por una activación celular. Con el objetivo de estudiar la activación se analizó mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores de superficie CD71 y CD69 (**figura 18A**) en las células B, comparando las condiciones indicadas. A las 24 horas post-tratamiento (en gris) las células expuestas a 125 ng de p24^{gag} VIH-1 (VIH 125 ng) mostraron una mayor expresión de CD71 y CD69, llegando a valores de 49.2% y 83.8% respectivamente; mientras que las células B sin tratar tenían una expresión del 9.6% de CD71 y 42.4% de CD69 (**figura 18B**). Después de 4 días de tratamiento, los valores de expresión de CD71 fueron de 57.7% con 125 ng VIH y de 88.83% para CD69 con 125 ng VIH. Estos valores de las células expuestas al VIH-1 continuaban siendo elevados respecto a los controles utilizados, que fueron las células B sin tratar o tratadas con el sobrenadante de las células MT-2 (SN MT2), que son las células que se utilizaron para producir el VIH-1.

Para confirmar que la activación celular observada en las células B se debía al contacto con las partículas del VIH-1, se incubó el virus con concentraciones diferentes de suero neutralizante anti-VIH-1 durante una hora y posteriormente se expusieron las células B durante 24 horas, tiempo al que se evaluó la expresión de CD71 y de CD69 por citometría de flujo. El tratamiento del VIH-1 con la concentración de suero más elevada (ratio 1/10) mostró una reversión en la expresión de los marcadores de activación CD71 y CD69 a valores del 17% y 53.5% respectivamente (comparado con un 39.9% de CD71 y 75.8% de CD69 de las células expuestas a 125 ng de p24^{gag} de VIH-1) (**figura 19**).

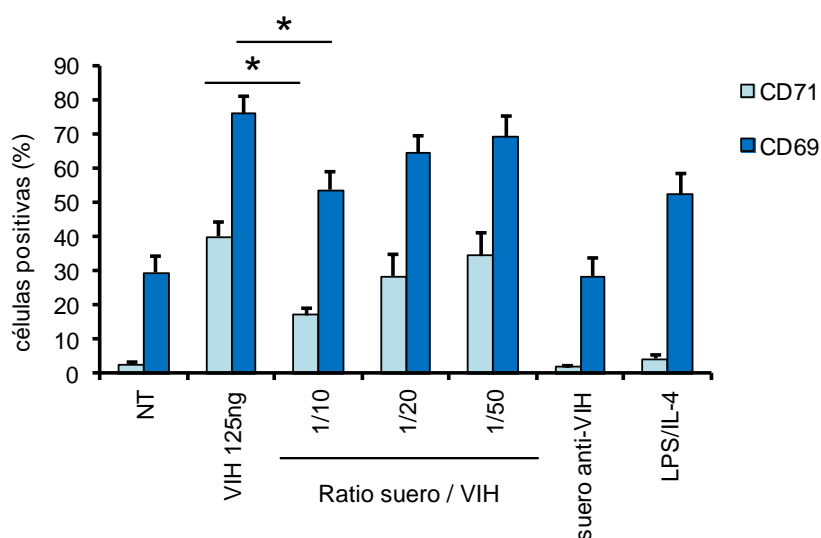


Figura 19. Especificidad del VIH-1 en la activación de las células B. Se muestran las células B NT, expuestas a 125 ng de p24^{gag} VIH-1 (VIH 125 ng), expuestas al VIH-1 pre-tratado con suero anti-VIH (se indica el ratio volumen suero/volumen virus), con suero anti-VIH y con LPS/IL-4. Se muestra el porcentaje de expresión de los marcadores CD71 y CD69 tras un día de tratamiento. Se representa la media de 3 donantes más la desviación estándar (SD). *p<0.05

Los resultados obtenidos mostraron que el VIH-1 tenía la habilidad de inducir la activación de las células B respecto al aumento de la expresión de los marcadores de superficie CD71 y CD69. Además, el VIH-1 fue el único estímulo que aumentó la expresión de CD71, a diferencia de las condiciones de LPS/IL-4 y de CD40L/IL-4. Por lo tanto, estos resultados sugirieron que la vía de activación de las células B mediante el VIH-1 era independiente de la vía de activación del resto de los estímulos utilizados en este trabajo.

d) Desregulación del fenotipo de las células B

Una vez determinado que el VIH-1 modificaba receptores celulares como CD71 y CD69, se estudió si el virus podría modificar el fenotipo de las células B, que se define por la combinación de distintos marcadores. Para ello, se cuantificó la expresión de los distintos marcadores que definen a las subpoblaciones de las células B, que son CD21, CD10, CD27 y CD20. En la [figura 20](#) se muestra la secuencia de cómo se determinó la expresión de cada uno de los marcadores.

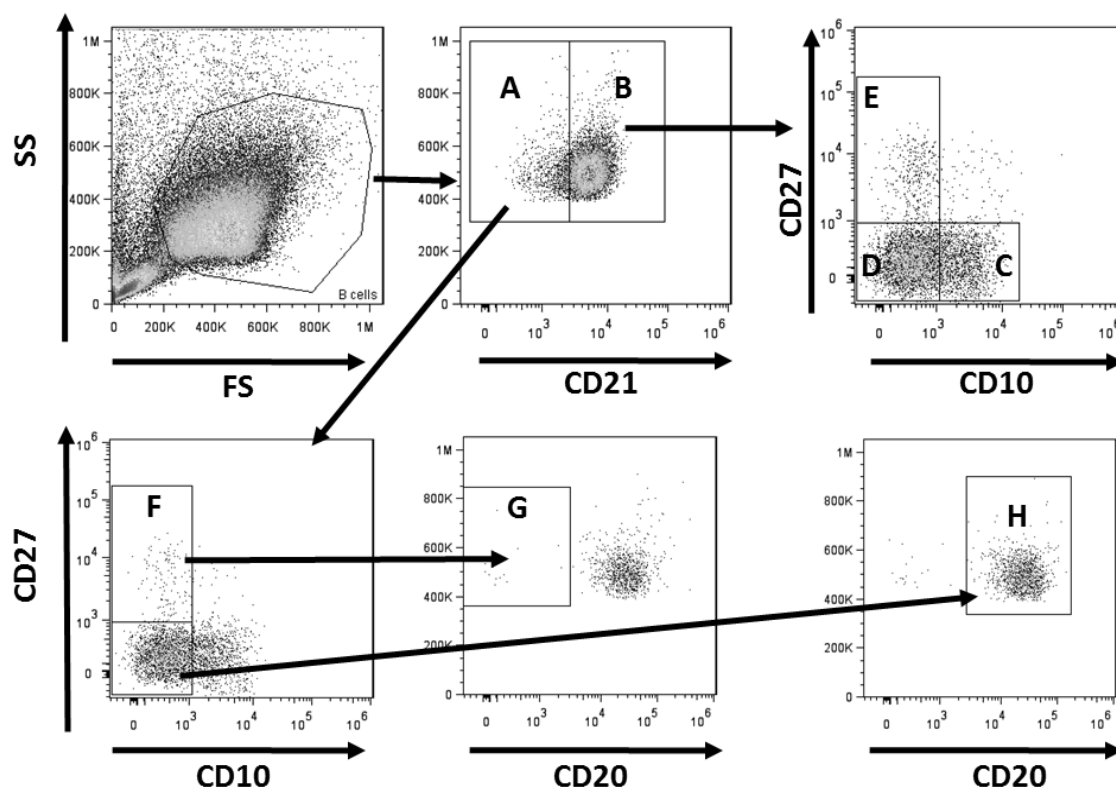


Figura 20. Secuencia para la determinación de las subpoblaciones de las células B. Las subpoblaciones de células B se determinaron por las combinaciones de los marcadores CD21, CD10, CD27 y CD20. En primer lugar se seleccionó la población de células según el tamaño (FS) y la complejidad (SS), y se analizó la expresión de CD21, separando las subpoblaciones con una baja expresión de CD21 (CD21^{low}, A) y CD21 con una expresión elevada (CD21^{high}, B). En la subpoblación CD21^{high} se analizó la expresión de CD10 y CD27 (C, D y E) y en la subpoblación CD21^{low}, se analizó CD10, CD27 y CD20 (F, G y H).

Mediante la secuencia de análisis se determinaron las poblaciones de células B inmaduras (CD21^{high} CD10⁺ CD27⁻, C), maduras *naive* o vírgenes (CD21^{high} CD10⁻ CD27⁻, D), memoria en reposo (CD21^{high} CD10⁻ CD27⁺, E), maduras activadas (CD21^{low} CD10⁻ CD27⁺, F), células plasmáticas de vida larga (CD21^{low} CD10⁻ CD27⁺ CD20⁻, G) y *exhausted tissue like memory* o células B memoria agotadas parecidas a las tisulares (CD21^{low} CD10⁻ CD27⁻ CD20⁺). Para analizar si el VIH-1 estaba modificando las subpoblaciones de las células B, estas se expusieron a: 25 ng y 125 ng de p24^{gag} VIH, 125 ng de p24^{gag} de VIH inactivado por calor (VIH inactivado) y al LPS e IL-4 (LPS/IL-4). Después de un día de tratamiento se analizó el fenotipo de las subpoblaciones por citometría de flujo siguiendo la secuencia descrita en la **figura 20**. Tras 24 horas de tratamiento solamente la presencia de la subpoblación de células B inmaduras aumentó con el tratamiento de 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 (**tabla 1**).

Poblaciones de las células B	NT	VIH 25ng	VIH 125ng	VIH inactivado	LPS/IL-4
<i>Marcaje múltiple</i>					
Inmaduras	2.24 ^b (±0.39)	4.53 ^a (±1.15)	4.17 ^{*b} (±0.51)	2.72 ^a (±0.46)	4.60 ^b (±1.16)
Maduras <i>naive</i>	33.52 ^b (±6.34)	35.37 ^a (±7.71)	41.07 ^b (±6.87)	33.63 ^a (±6.67)	34.20 ^b (±6.75)
Maduras activadas	5.71 ^b (±1.71)	4.45 ^a (±1.25)	3.20 ^b (±0.99)	4.75 ^a (±1.35)	5.51 ^b (±1.71)
Memoria en reposo	34.73 ^b (±5.38)	28.90 ^a (±5.65)	29.42 ^b (±3.57)	35.89 ^a (±6.17)	30.31 ^b (±4.24)
<i>Exhausted tissue like memory</i>	8.71 ^b (±2.01)	5.16 ^a (±1.66)	4.42 ^b (±1.01)	5.08 ^a (±1.09)	6.68 ^b (±1.91)
Plasmáticas	0.36 ^b (±0.13)	0.36 ^a (±0.14)	0.38 ^b (±0.12)	0.30 ^a (±0.15)	0.37 ^b (±0.12)
<i>Marcaje simple</i>					
CD27 ⁺	47.66 ^c (±7.91)	45.12 ^b (±8.36)	41.43 ^c (±7.96)	46.25 ^b (±9.78)	48.81 ^b (±8.09)
CD21 ^{high}	81.45 ^c (±2.71)	84.86 ^a (±3.38)	88.92 ^{*b} (±1.65)	84.23 ^a (±3.17)	83.40 ^b (±3.06)
CD10 ⁺	11.77 ^c (±3.40)	19.54 ^a (±7.57)	16.31 ^b (±5.29)	13.57 ^a (±4.37)	18.02 ^b (±7.23)

Tabla 1. Cuantificación de la expresión de marcadores de superficie de las células B y análisis de las subpoblaciones después de 24h de tratamiento. Se indica el promedio expresado en porcentaje de los marcadores de superficie (*marcaje simple*) y de las subpoblaciones de las células B (*marcaje múltiple*) según las combinaciones detalladas en la **figura 20**. Se muestran las células NT, expuestas al VIH (25 ng de p24^{gag} VIH, azul celeste y 125 ng de p24^{gag} VIH azul), expuestas al VIH inactivado por calor (VIH inactivado) y estimuladas con LPS e IL-4 (LPS/IL-4 morado) después de 24 horas de estimulación. Los resultados promedio se obtuvieron de 6 (a), 7 (b) y 10 (c) donantes independientes, se indica el promedio ± SEM (*standard error of the mean*). *p<0.05 comparado con la condición sin tratar (NT).

Las diferencias observadas en los marcadores de superficie en presencia del VIH-1 fueron mayores a tiempos más largos, por lo que se analizaron los cambios en las subpoblaciones a más largo plazo. Después de cuatro días de tratamiento con el VIH-1 (125 ng VIH), se observó un aumento en los porcentajes de las células B inmaduras y maduras vírgenes o *naive*, sin embargo las células B maduras activadas, las células memoria en reposo y las *exhausted tissue like memory* mostraron una disminución significativa en sus porcentajes, comparado con los valores de las células sin tratar (**figura 20; tabla 2**, marcaje múltiple). Estos resultados indicaron que el VIH-1 estaba promoviendo un cambio en el fenotipo de las células B, puesto que disminuyó el porcentaje de las poblaciones más diferenciadas y aumentó el de las células inmaduras.

Las variaciones provocadas por el VIH en las distintas subpoblaciones podían ser debidas a cambios individuales en uno de los marcadores utilizados para definir dichas subpoblaciones. Para estudiar los cambios a nivel individual se comprobó el porcentaje de expresión de cada uno de los marcadores, en cada una de las condiciones indicadas (**tabla 2**, marcaje simple). Después de 4 días de tratamiento, se observó que la expresión del marcador CD21^{high} aumentó cuando las células se expusieron al VIH (125 ng VIH, 73.58±5.99%) en comparación con los controles de las células sin tratar (NT, 46.43±4.31%) y tratadas con sobrenadante de las MT-2 (SN MT2, 61.38±7.00%). Paralelamente, el porcentaje de expresión de CD27⁺ disminuyó tras 4 días de tratamiento, pasando de un 35.64±5.46% en la condición SN MT-2 a un 9.85±3.24% en las células expuestas al VIH-1 (125 ng VIH).

Como se muestra en la **tabla 2**, los porcentajes de cada una de las subpoblaciones de las células B variaron cuando estuvieron en contacto con el VIH durante 4 días; además, estos cambios no se detectaron con los tratamientos de LPS/IL-4 o CD40L/IL-4. Estos resultados mostraron que los dos estímulos clásicos utilizados (LPS/IL-4 y CD40L/IL-4) tenían una vía de actuación distinta a la del VIH-1 y que *in vitro* no eran capaces de inducir los cambios que se detectan *in vivo*, sugiriendo que sería necesaria una segunda señal para producir los cambios descritos. Por lo tanto, el VIH-1 tendría la capacidad por si solo de inducir los cambios fenotípicos observados en las células B.

Poblaciones de las células B	NT	VIH 125ng	VIH inactivado	LPS/IL-4	CD40L/IL-4	SN MT2
<i>Marcaje múltiple</i>						
Inmaduras	2.68 ^d (±0.67)	16.06* ^a (±3.58)	3.84 ^a (±1.35)	2.66 ^a (±1.03)	2.27 ^a (±0.79)	2.23 ^a (±0.40)
Maduras <i>naive</i>	16.53 ^d (±2.95)	42.08* ^a (±5.85)	20.87 ^a (±4.29)	10.11 ^a (±3.75)	13.83 ^a (±2.05)	31.29 ^a (±5.91)
Maduras activadas	13.28 ^d (±0.60)	1.59* ^a (±0.65)	7.93 ^a (±1.14)	18.01 ^a (±2.36)	17.35 ^a (±1.24)	9.05 ^a (±1.73)
Memoria en reposo	19.89 ^d (±2.48)	4.32* ^a (±1.06)	25.28 ^a (±5.31)	19.28 ^a (±4.51)	19.32 ^a (±3.24)	22.14 ^a (±4.76)
<i>Exhausted tissue like memory</i>	28.98 ^d (±3.12)	13.46* ^a (±3.04)	19.99 ^a (±3.97)	23.96 ^a (±3.01)	30.18 ^a (±1.82)	24.06 ^a (±3.59)
Plasmáticas	0.65 ^d (±0.21)	0.33 ^a (±0.14)	0.36 ^a (±0.14)	0.80 ^a (±0.22)	1.11 ^a (±0.33)	1.35 ^a (±0.95)
<i>Marcaje simple</i>						
CD27+	39.91 ^f (±3.81)	9.85* ^f (±3.24)	39.17 ^b (±6.83)	32.83 ^d (±6.42)	44.57 ^a (±6.95)	35.64 ^a (±5.46)
CD21 ^{high}	46.43 ^e (±4.31)	73.58* ^e (±5.99)	61.21 ^a (±8.46)	37.28 ^b (±6.57)	40.58 ^a (±4.11)	61.38 ^a (±7.00)
CD10+	16.22 ^e (±2.28)	22.90 ^e (±4.17)	15.82 ^a (±3.35)	19.21 ^b (±4.27)	14.60 ^a (±1.93)	8.58 ^a (±2.13)

Tabla 2. Expresión de marcadores de superficie de las células B y análisis de las subpoblaciones después de 4 días de tratamiento. Se indica el promedio expresado en porcentaje de los marcadores de superficie (*marcaje simple*) y de las subpoblaciones de las células B (*marcaje múltiple*) según las combinaciones detalladas en la **figura 20**. Se muestran las células NT, expuestas al VIH (125 ng VIH, azul), al VIH inactivado por calor (VIH inactivado), estimuladas con LPS e IL-4 (LPS/IL-4, morado), CD40L e IL-4 (CD40L/IL-4, morado) y con el sobrenadante de las células MT-2 (SN MT2) después de 4 días de estimulación. Los resultados promedio se obtuvieron de 4 (a), 6 (b), 7 (c), 8 (d), 10 (e) y 12 (f) donantes independientes, se indica el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ comparado con la condición NT. Marcaje no determinado (ND).

4.1.2. Desregulación de la expresión de la proteína AID, de los miRNA asociados a su expresión y de la inducción de CSR

a) Expresión de la proteína AID

Durante un proceso infeccioso, las células B se activan y en consecuencia se inducen los mecanismos de CSR y SHM regulados por la proteína AID. Para estudiar si el VIH-1 modificaba la expresión de esta proteína, se cuantificó la expresión de AID por PCR cuantitativa (Q-PCR) en las células B cultivadas *in vitro*.

Se trataron las células B durante 24 horas con VIH-1, con 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 inactivado por calor o con LPS e IL-4. Posteriormente se extrajo el mRNA, se evaluó la calidad mediante un bioanalizador y solamente las muestras con valores de RIN superiores a 8 sobre 10 se utilizaron para la cuantificación por Q-PCR. En la **figura 21** se puede observar el aumento de la expresión de la proteína AID hasta 10 veces en las células expuestas al VIH-1 (25 ng VIH, azul celeste y 125 ng VIH, azul) mientras que las células B expuestas al VIH-1 inactivado por calor (VIH inactivado) no presentaron ningún cambio en los niveles de expresión de AID. Se demostró así que era necesaria la plena integridad de las partículas virales para inducir la expresión de la proteína AID.

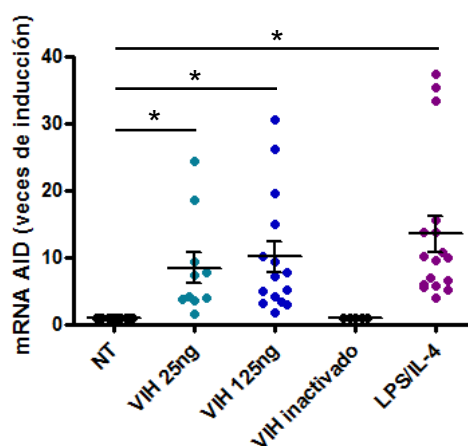


Figura 21. Cuantificación de la expresión del mRNA de AID en las células B. Se muestra la expresión del mRNA de AID tras 24 horas de tratamiento con 25 ng de p24^{gag} de VIH-1 (VIH 25 ng, azul celeste), 125 ng de p24^{gag} de VIH-1 (VIH 125 ng, azul), VIH-1 inactivado por calor (VIH inactivado) y con LPS e IL-4 (LPS/IL-4, morado). Las veces de inducción se calcularon como el ratio de la expresión en la condición tratada entre la NT. Como genes de referencia se utilizaron YWHAZ y β 2microglobulina. Cada punto representa el valor de un experimento, se indica la media \pm SD. * p<0.05

b) Desregulación de los miRNA asociados a la proteína AID

Una de las funciones de la proteína AID es inducir mutaciones en la cadena doble de DNA, por este motivo está altamente regulada en las células B mediante varios mecanismos. Uno de los mecanismos de regulación es la vía de miRNA, en concreto los miRNA-155 (miR-155) y miRNA-181b (miR-181b) reprimen la expresión de la proteína AID.

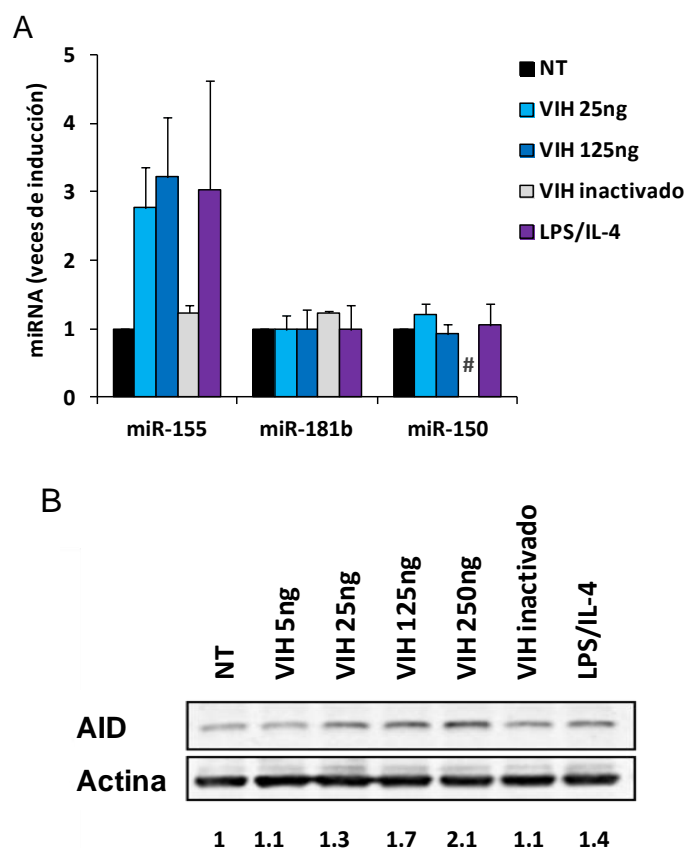


Figura 22. Expresión de distintos miRNA y de la proteína AID en las células B tras 24 horas de tratamiento. (A) Se representa la expresión de miR-155, miR-181b y miR-150 en las células B NT, expuestas al VIH-1 (VIH 25 ng y VIH 125 ng), con VIH-1 inactivado por calor (VIH inactivado) y con LPS e IL-4 (LPS/IL-4, morado). Se indica el promedio de 9 donantes para miR-155, 7 donantes para miR-181b y 3 donantes para miR-150. Las veces de inducción se calcularon comparando las cantidades de las células expuestas con las no expuestas al VIH-1. # No determinado. (B) Se muestra la imagen de *western blot* de las proteínas AID y actina en las células B sin tratar (NT), expuestas al VIH (VIH 5 ng, 25 ng, 125 ng y 250 ng), con VIH inactivado por calor (VIH inactivado) y con LPS e IL-4 (LPS/IL-4). Se indica bajo la imagen el ratio de expresión de la proteína AID/actina tomando como valor de referencia la condición sin tratar (NT, valor =1).

Con el objetivo de estudiar si los cambios observados en la proteína AID se debían a que el VIH-1 estaba afectando a la vía de miRNA, se estudió la expresión de distintos miRNA en las células B expuestas al VIH-1 durante 24 horas. Posteriormente se extrajeron los miRNA de las células B para cuantificar mediante Q-PCR la expresión de miR-155 y miR-181b, así como la expresión de miR-150, lo cual se había relacionado con la infección por el VIH-1. El miR-155 fue el único que aumentó su expresión en las células B expuestas al VIH-1 (VIH 25 ng y VIH 125 ng) y con LPS e IL-4 (LPS/IL-4) (**figura 22A**).

El aumento de la expresión de la proteína AID está relacionado con una baja expresión de miR-155 y miR-181b, teniendo en cuenta el aumento de miR-155 detectado, se estudió si el aumento observado en el mRNA de AID se correspondía con un cambio en los valores de proteína. Para ello, se trataron las células B durante 24 horas con el VIH-1 y con LPS/IL-4. Como se puede observar en la **figura 22B**, las células B aumentaron los valores de proteína AID en tan solo 24 horas de tratamiento con el VIH-1 (VIH 5 ng, 25 ng, 125 ng y 250 ng). Por lo tanto, estos resultados sugirieron que el aumento de miR-155 no fue suficiente para controlar la expresión de la proteína AID.

c) Recombinación de cambio de clase de las inmunoglobulinas

Una vez determinamos que el VIH-1 aumentaba la expresión de la proteína AID, se estudió si el aumento de AID se asociaba con un aumento de CSR en la producción de las Igs. Para ello, se cuantificaron las IgG, IgA e IgE en el sobrenadante de los cultivos de las células B, cinco días después del tratamiento. En los diez donantes analizados se observó un ligero aumento de IgG sin que llegara a ser significativo cuando las células se trataron con 25 ng de p24^{gag} de VIH-1 (**figura 23A**). La producción de IgA solamente se detectó en dos donantes de los diez analizados, y en ambos donantes la producción fue muy baja (**figura 23B**), además, solamente en uno de ellos se observó un aumento de IgA cuando las células se expusieron al VIH-1. Sin embargo, en los dos donantes se observó un aumento con el tratamiento de LPS e IL-4. Por último, se evaluó la producción de IgE, la cual se detectó en cuatro de los diez experimentos analizados aunque los niveles de expresión fueron también muy bajos (**figura 23C**). Dos de los cuatro experimentos que se muestran tuvieron niveles indetectables en las células sin tratar, # verde y # naranja), sin embargo sí se detectaron cuando las células se expusieron al VIH-1.

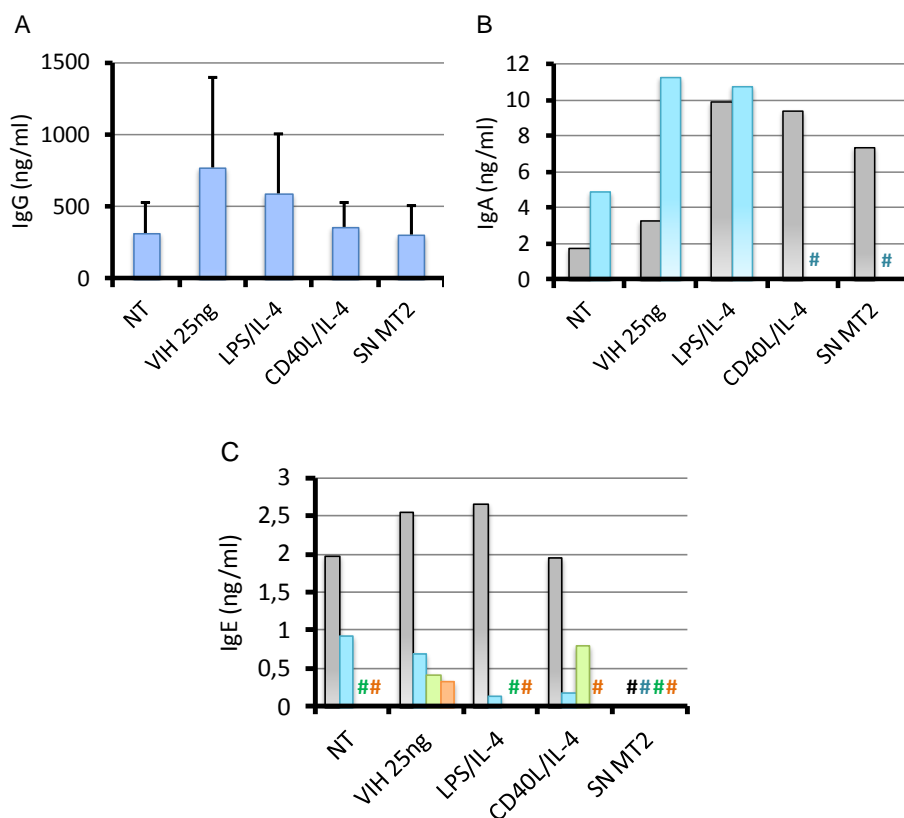


Figura 23. Cuantificación de las Igs por las células B. Se muestra la producción de IgG (A), IgA (B) e IgE (C) cuantificada en el sobrenadante de los cultivos de las células B por ELISA. Se indica la media de diez experimentos más SD (A), se muestran 2 donantes (uno con cada color) (B), se muestran 4 donantes (uno en cada color) (C). # No detectable.

Los valores bajos de expresión de IgA y de IgE en el sobrenadante de los cultivos, hizo pensar que tal vez 5 días no fueran suficientes para detectar la producción de las Igs en el sobrenadante de los cultivos celulares, por lo que se analizaron los valores de Igs a nivel celular. Para ello, se realizó el mismo experimento que anteriormente se ha descrito y tras 5 días de tratamiento se realizó un marcaje de superficie de las células B con el Ac anti-CD19 (que se utilizó como marcador para seleccionar las células en una ventana previa), y marcajes intracelulares de IgM, IgD, IgA, IgE e IgG. Posteriormente se analizaron las células B por citometría de flujo.

La mayor parte de los cambios detectados en la expresión de IgM e IgD se observaron en la intensidad de fluorescencia, y por ello se expresaron los resultados como la mediana de la intensidad de fluorescencia integrada, iMFI (*integrated mean fluorescence intensity*), calculada como la MFI (*mean fluorescence intensity*) multiplicada por el porcentaje de células positivas para el marcador estudiado. Como se muestra en la **figura 24A**, la expresión de IgD no varió con ninguno de los tratamientos estudiados, mientras que IgM aumentó de manera significativa en las células tratadas con LPS e IL-4 (LPS/IL-4) y con CD40L e IL-4 (CD40L/IL-4). Además, el tratamiento con LPS e IL-4 (LPS/IL-4) intensificó la producción de IgG, IgA e IgE (**figura 24B**), mientras que CD40L e

IL-4 (CD40L/IL-4) solamente afectó a IgG e IgA. Por último, el tratamiento con VIH aumentó la producción de IgE sin modificar los valores de IgG e IgA. Estos resultados demostraron que el VIH-1 era capaz de inducir CSR mediante vías distintas a los tratamientos con LPS e IL-4 o con CD40L e IL-4, ya que el perfil de Ig producidas fue distinto.

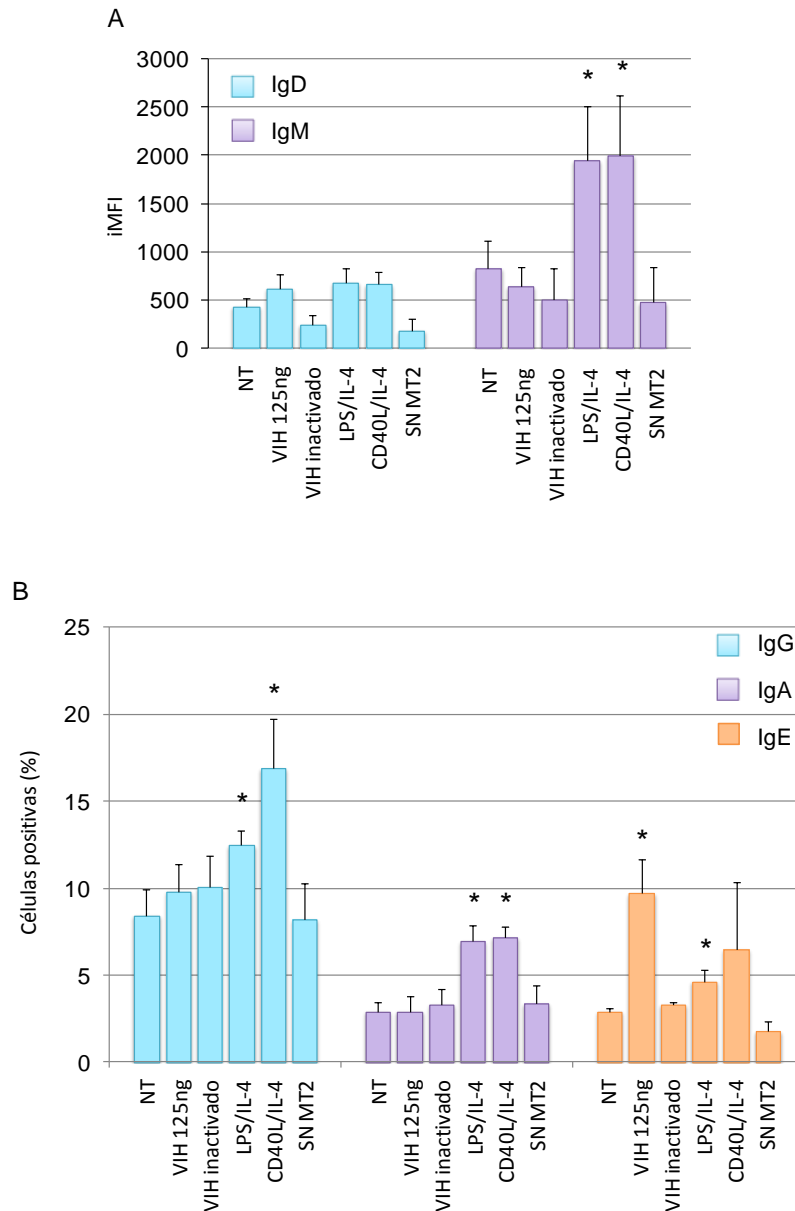


Figura 24. Recombinación de cambio de clase en las células B estimuladas. Se muestran los resultados de los marcajes intracelulares expresados en iMFI para IgM e IgD (A), y en porcentaje de células positivas para IgG, IgA e IgE (B) en las células CD19 positivas previamente seleccionadas. Después de 5 días de tratamiento se analizaron los marcadores por citometría de flujo. Se muestra la media de 5 donantes independientes +SEM. *p<0.05

4.1.3. Implicación de JNK y del BCR en la desregulación de las células B

a) Expresión de los marcadores de activación y vías de señalización de JNK y SYK

Todos los resultados que se han mostrado hasta el momento sobre la función del VIH en la desregulación de las células B se han generado utilizando un virus producido en las células MT-2, que como anteriormente se ha expuesto, no expresan CD40L. Se demostró así que este virus sin CD40L era capaz de inducir cambios fenotípicos y funcionales en las células B. Para los siguientes ensayos, se utilizó un modelo más fisiológico, el VIH-1 producido en CMSP. Con este tipo de producción viral no se puede asegurar que la superficie del virus esté libre de CD40L. Para verificar que las células B eran sensibles al estímulo con esta nueva producción de VIH-1, se expusieron al VIH-1-CMSP y con CD40L e IL-4. Como se muestra en la **figura 25**, los resultados obtenidos con el VIH-1 procedente de las CMSP fueron similares a los anteriormente descritos con el virus VIH-1 producido en MT-2, promoviendo un aumento de la expresión de CD71 (**figura 25A**) y de CD69 (**figura 25B**) en la superficie de las células B (se indica con asteriscos en negro las diferencias significativas entre la condición correspondiente al estímulo *versus* NT), mientras que la estimulación con CD40L e IL-4 aumentó la expresión de CD69 (**figura 25B**) sin afectar a CD71 (**figura 25A**).

Para estudiar qué rutas de señalización estaban implicadas en la activación celular promovida por el VIH-1, se trataron las células B con inhibidores de las quinasas PKC, PI3K, MEK1 (*dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1*), JNK, p38 (*p38 mitogen-activated protein kinases*), y SYK 4 horas antes de la estimulación con el VIH-1 (**figura 25A-C**). Después de 24 horas de estimulación se verificó que las concentraciones utilizadas de los inhibidores de quinasas no fueran tóxicas (**figura 25C**), y para ello se analizó la viabilidad celular marcando las células con 7AAD y el posterior análisis por citometría de flujo. Se consideró que los compuestos utilizados no fueron tóxicos, puesto que el porcentaje de células vivas fue superior al 80% en todos los casos (**figura 25C**). Se analizaron también los marcadores de activación por citometría de flujo a las 24 horas post-estimulación. Los inhibidores SP600125 y ER27319 revirtieron (SP600125 totalmente y ER27319 parcialmente) la activación observada con la expresión de CD71 y de CD69, (se indica con asteriscos en azul las diferencias significativas entre las condiciones del estímulo solo *versus* inhibidor + estímulo) inducida por el tratamiento con VIH-1 (**figura 25A**). Además, se puede observar que el tratamiento con PDTC mostró una tendencia a la reversión de la expresión de CD71 inducida por el VIH-1 (**figura 25C**). Los compuestos que mostraron cambios en la reversión de los marcadores fueron SP60125 que inhibe a las quinasas JNK, y ER27319 que es un inhibidor de SYK.

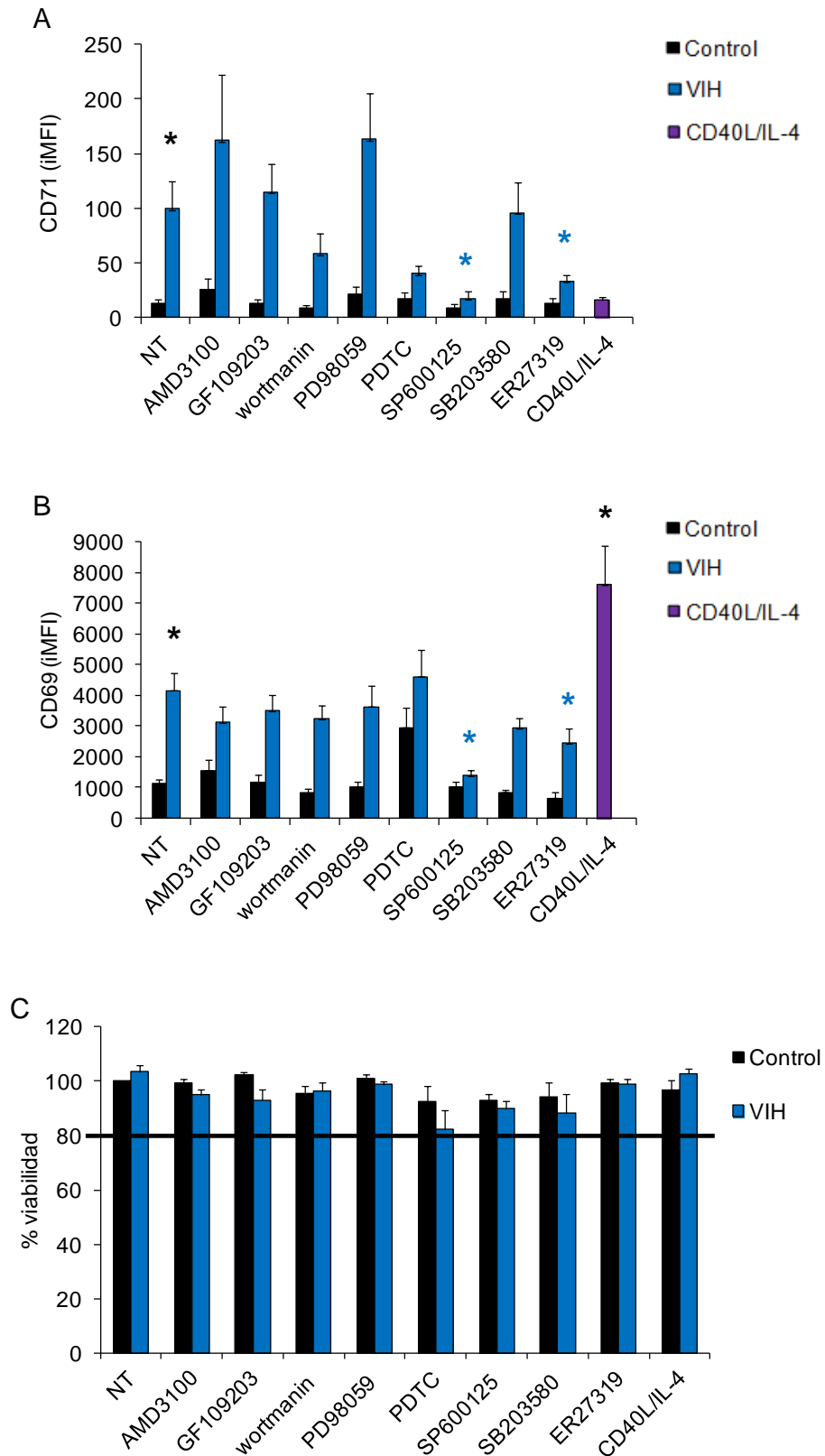


Figura 25. Reversión de la activación de las células B estimuladas con el VIH-1. Se muestran las células B sin tratar (control, NT), expuestas al VIH (VIH, NT), pre-tratadas con el inhibidor de CXCR4 (AMD3100 (100 μ M)) y con inhibidores de quinasas (GF109203 (PKC clásicas, 0,5 μ M); wortmannin (PI3K, 100 nM); PD98059 (MEK1, 5 μ M); PDTC (NF- κ B, 5 μ M); SP600125 (JNK, 5 μ M); SB203580 (p38, 5 μ M) y con ER27319 (SYK, 50 μ M)) durante 4 horas antes de la estimulación con VIH-1 (VIH), y tratadas solamente

con CD40L/IL-4, analizadas 24 horas después del tratamiento. Se representa la iMFI de los marcadores de superficie CD71 (A) y CD69 (B) analizados por citometría de flujo. (C) Se muestra la viabilidad cuantificada mediante el marcaje con 7AAD y tomando como valor de referencia las células sin tratar no estimuladas como el 100% de viabilidad (NT, control). (A-C) Se muestra la media de al menos 5 experimentos independientes (de 5 a 12 experimentos dependiendo de las condiciones). * $p < 0.05$ respecto al control NT. * $p < 0.05$ respecto al VIH-1 NT.

b) Fosforilación de JNK y SYK

Una vez determinados los inhibidores de quinasas que estaban revirtiendo el efecto del VIH-1 sobre la expresión de CD71 y CD69, se estudió si la fosforilación de las proteínas JNK y SYK se podía relacionar con la estimulación inducida por el VIH-1. Se trataron las células B durante 4 horas con diferentes concentraciones del inhibidor de SYK, ER27319, y posteriormente se expusieron las células al VIH-1. Después de 15 y 30 minutos de exposición se extrajeron las proteínas de las células para verificar mediante la técnica de *western blot* la presencia de proteínas fosforiladas. Los residuos de las posiciones 525 y 526 de SYK, a pesar de estar fosforilados al principio del experimento (tiempo 0), aumentaron ligeramente su fosforilación (15 y 30 minutos) con la exposición al VIH-1 (figura 26A). El aminoácido 323 mostró un aumento de la fosforilación tras 30 minutos de tratamiento con el VIH-1, sin embargo, esta fosforilación no se revirtió con el pre-tratamiento de ER27319 (figura 26A). La no reversión mediante el tratamiento con ER27319 se podía explicar basándonos en publicaciones de otros autores que demostraron que ER27319 bloqueaba la señalización de SYK sin impedir la fosforilación de sus residuos, ya que su efecto era el de impedir el contacto de SYK con las proteínas de la cascada de señalización.

Respecto a la fosforilación de JNK, se observó que el pre-tratamiento con ER27319 inhibía la fosforilación de JNK (1/2) después de 30 minutos de estimulación con el VIH-1 (figura 26B). Estos resultados demostraron que al menos una parte de la estimulación que el VIH inducía sobre las células B estaba relacionada con la proteína SYK, responsable de la activación de las JNK.

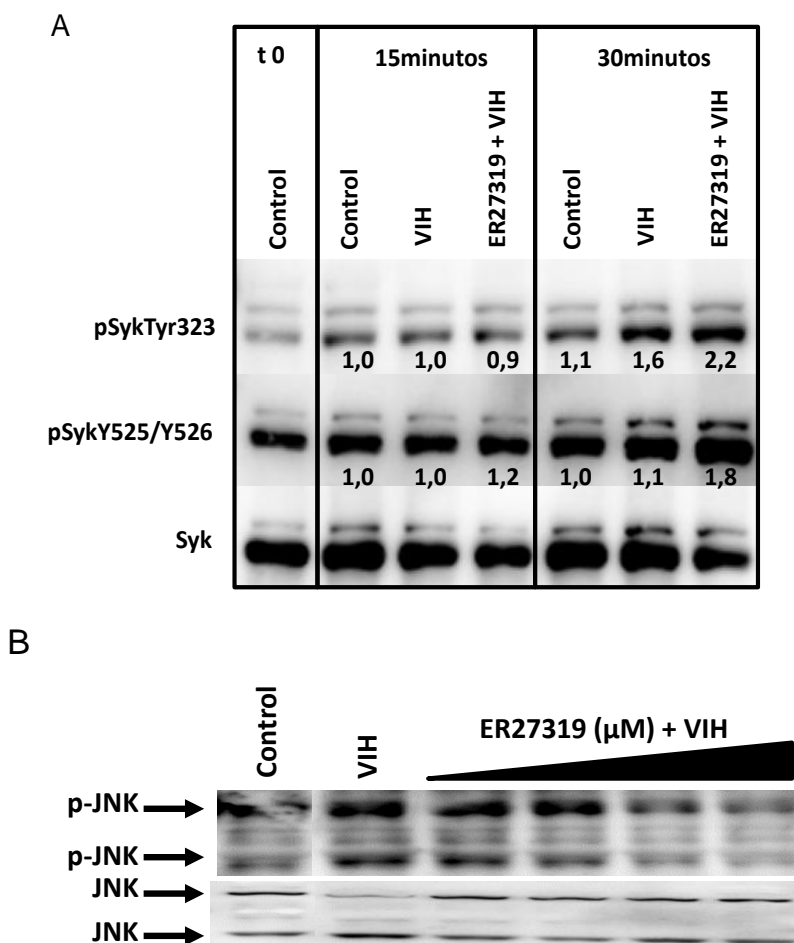


Figura 26. Fosforilación de SYK y JNK en células B estimuladas por el VIH-1. (A) Se muestra la fosforilación de SYK extraída a distintos tiempos de las células B pre-tratadas con ER27319 (50 μM) durante 4 horas y posteriormente estimuladas con el VIH-1. Se muestran las imágenes de fosfo-Y323-SYK (pSykY323), fosfo-Y525/Y526-SYK (pSykY525/Y526) y SYK (SYK) con los distintos tratamientos indicados. La imagen del tiempo 0 corresponde a la extracción de proteínas antes de la estimulación con el VIH-1, 15 y 30 minutos corresponden al tiempo tras la estimulación con el VIH. Se muestran los resultados de un experimento representativo de un total de tres realizados. **(B)** Se muestra la fosforilación de JNK (p-JNK, isoformas de 49 kDa y de 55 kDa de JNK1+2, fosfo-T183+Y185) de las células B tratadas con concentraciones crecientes de ER27319 (5 μM, 10 μM, 50 μM y 100 μM) durante 4 horas y posteriormente estimuladas con el VIH-1 durante 30 minutos. Se muestran los resultados de un experimento representativo, se realizaron dos experimentos más con una sola concentración (ER27319 a 50 μM).

c) Inhibición de la expresión de AID mediante los inhibidores de quinasas

Por último, se estudió la expresión de la proteína AID en las células B tratadas con inhibidores de quinasas. Se trataron las células con los inhibidores durante 4 horas y se estimularon con VIH-1 o con CD40L/IL-4. Dos días después de la estimulación se realizó la extracción de mRNA. Varios inhibidores disminuyeron la sobreexpresión del mRNA de AID cuando las células se estimularon con VIH-1, pero solamente los inhibidores SP600125 y ER27319 mostraron una reversión estadísticamente significativa (figura 27). Por otro lado, ningún inhibidor indujo la reversión de la expresión del mRNA de AID estadísticamente cuando las células se estimularon con CD40L e IL-4 (figura 27).

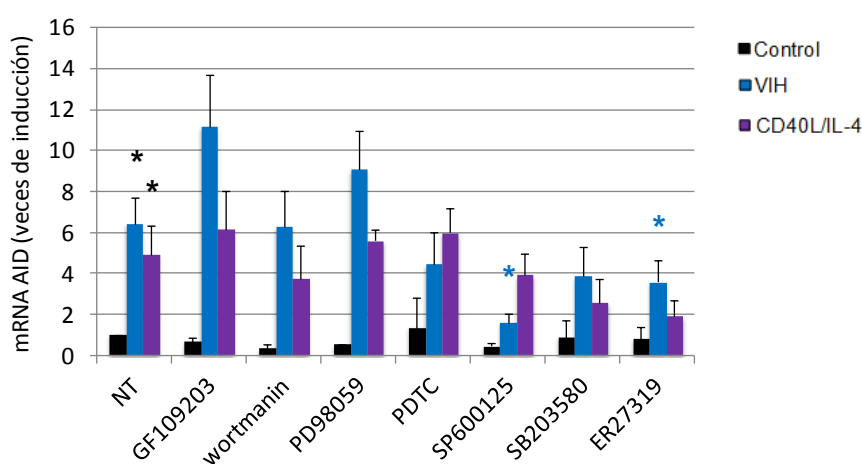


Figura 27. Expresión del mRNA de AID en células B estimuladas. Se representa la expresión del mRNA de la proteína AID en las células B sin tratar, tratadas con inhibidores de quinasas durante 4 horas y posteriormente estimuladas con el VIH-1 o con CD40L e IL-4 durante 2 días. Se indican las veces de inducción calculadas como el ratio de la expresión en la condición tratada entre la no tratada del control (NT, control). Como genes de referencia se utilizaron YWHAZ y β 2microglobulina. Media de 3 a 7 experimentos independientes representado dependiendo de las condiciones (+SEM). Los asteriscos negros ($p < 0.05$) indican las diferencias significativas entre el tratamiento indicado y la condición NT del control. Los asteriscos en azul ($p < 0.05$) indican las diferencias significativas entre los estímulos indicados y de la condición VIH-1-NT.

Los datos sugieren que el VIH-1 por sí solo y sin necesidad de una señal secundaria es capaz de inducir la activación y diferenciación celular vía BCR, así como la expresión de AID, que es indispensable para el proceso de CSR y en consecuencia para la producción de Acs.

4.2. ESTUDIO DE LOS DENDRÍMEROS 2G-NN16 Y 2G-03NN24 COMO AGENTES TRANSFECTANTES EN LINFOCITOS T CD4

Debido a las características químicas de los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24, se estudió su capacidad como agentes transfectantes en linfocitos T CD4. Previamente, se ha estudiado la actividad como transfectante del dendrímero 2G-NN16 y la inhibición de la replicación por el VIH-1 en líneas T establecidas, en CMSP y en astrocitos, pero es la primera vez que se utiliza en linfocitos T CD4 [98, 285]. Se estudiaron ambos dendrímeros en el contexto de la infección por el VIH-1 y se utilizaron los linfocitos T CD4 como células primarias para la transfección de siRNA, puesto que son la diana principal del virus.

a) Citotoxicidad de los dendrímeros en linfocitos T CD4

Con el objetivo de establecer las concentraciones a las que se pueden utilizar los dendrímeros sin producir toxicidad en los linfocitos T CD4, se realizó un ensayo de MTT. Se trataron los linfocitos T CD4 con los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24 durante 24 horas a la concentración de 5 μ M, puesto que era la concentración establecida para otros tipos celulares con el dendrímeros 2G-NN16 [285]. Los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24 no presentaron efectos de toxicidad a la concentración de 5 μ M (**figura 28**).

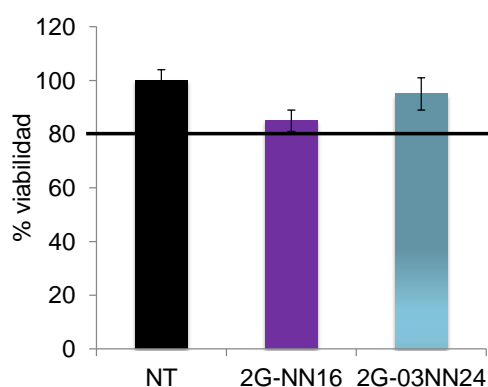


Figura 28. Viabilidad de los linfocitos T CD4 tratados con diferentes dendrímeros. Viabilidad de los linfocitos T CD4 cuantificada por el ensayo MTT. Se muestran los linfocitos T CD4 sin tratar con los dendrímeros (NT, negro), control al que se refieren el resto de los datos, y tratados con 2G-NN16 (morado) y con 2G-03NN24 (azul) a la concentración de 5 μ M durante 24 horas. Los resultados representan la media \pm SD de tres donantes independientes, cada uno de los tres experimentos se realizó por triplicado.

b) Proliferación de los linfocitos T CD4

Puesto que el objetivo es la aplicación biológica de los dendrímeros es importante que no sean considerados como un Ag proliferativo. Para analizar si los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24 alteraban la proliferación de los linfocitos T CD4 se realizó un ensayo de proliferación, utilizando fitohemaglutinina (PHA) como control mitogénico. El tratamiento de los linfocitos T CD4 con los dendrímeros 2G-NN16 y con 2G-03NN24 no afectó a la proliferación celular comparado con las distintas concentraciones de PHA ([figura 29](#)).

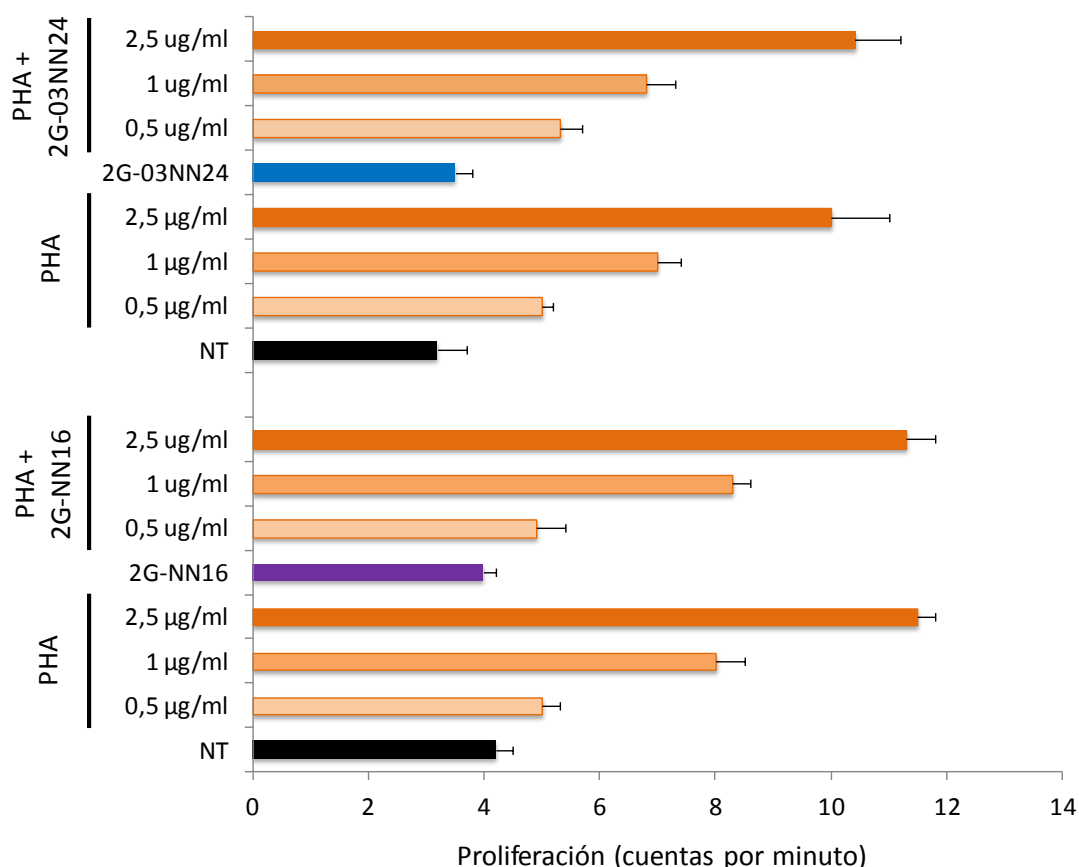


Figura 29. Proliferación de los linfocitos T CD4 tratados con los dendrímeros catiónicos. Se representa la proliferación de los linfocitos T CD4 tratados con 1 mCi de $[^3\text{H}]$ thymidine, expresada en número de cuentas por minuto. Se indican los linfocitos T CD4 sin tratar (NT, negro), tratados con distintas concentraciones de PHA (naranja) como estímulo de proliferación, tratados con 2G-NN16 (morado) y con 2G-03NN24 (azul) a la concentración de 5 μM , tratados con 2G-NN16 junto con distintas concentraciones de PHA, y tratados con 2G-03NN24 junto con distintas concentraciones de PHA durante 48 horas. Los experimentos con el 2G-NN16 y 2G-03NN24 se realizaron de modo independiente, se muestran los valores de los controles sin tratar y de proliferación junto a cada dendrímero. Los resultados representan la media + SD de tres donantes independientes.

c) Silenciamiento específico de la proteína Nef mediante el uso de siRNA-Nef

Para evaluar la capacidad como transfectante de ambos dendrímeros en linfocitos T CD4, en primer lugar se estudió la funcionalidad del siRNA-Nef para silenciar de un modo específico la proteína Nef del VIH-1. Se trataron las células HeLa CD4, transfectadas previamente para que expresaran la construcción NefG2A-GFP, con concentraciones crecientes de siRNA-Nef (50, 100, 200 y 400 nM) durante 48 horas. Posteriormente se analizó la expresión de GFP (*green fluorescent protein*) en las células por citometría de flujo y *western blot*.

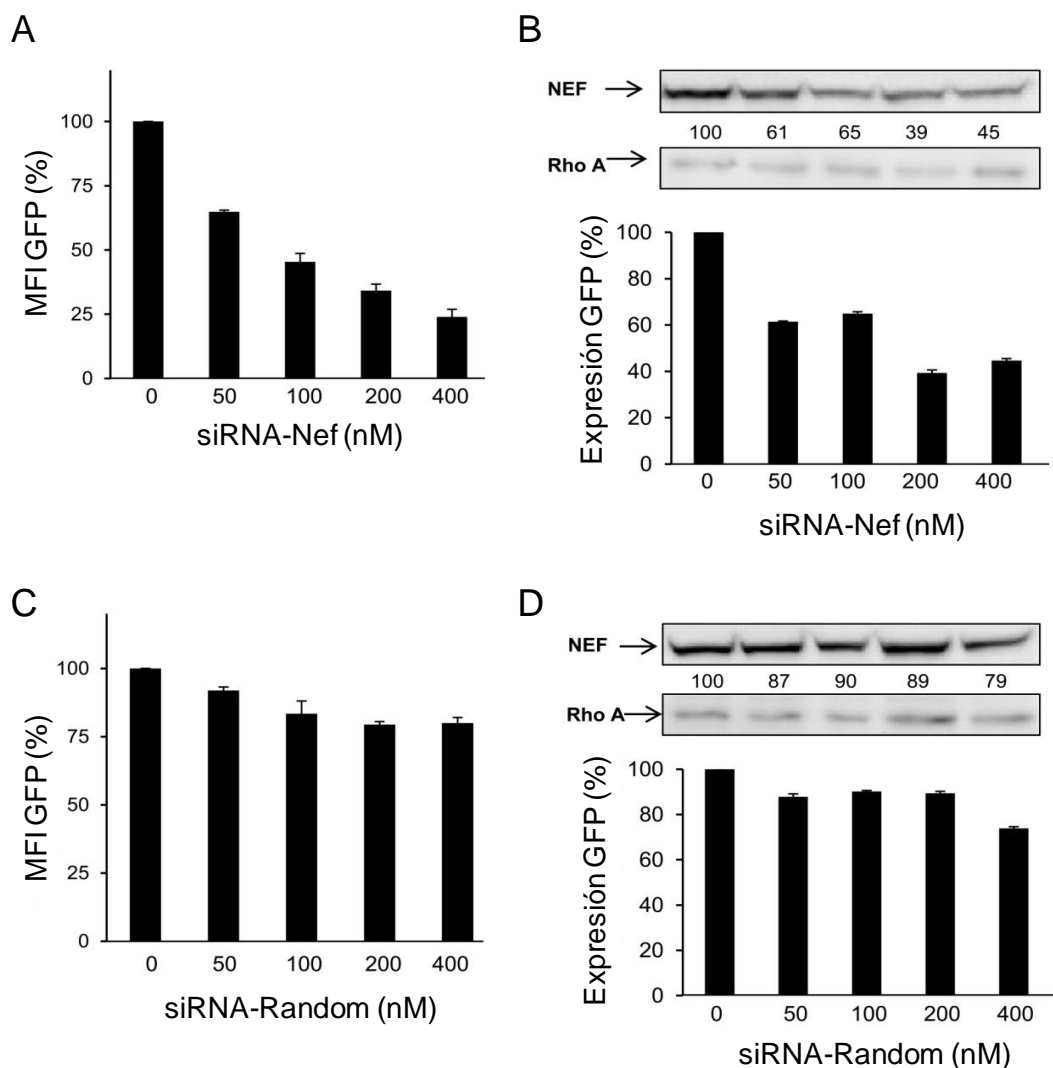


Figura 30. Validación *in vitro* del silenciamiento de la proteína Nef por siRNA-Nef en células HeLa CD4. Se representa la expresión de GFP cuantificada por citometría de flujo (**A y C**) y por *western blot* (**B y D**) en las células HeLa Nef-G2A-GFP transfectadas con siRNA-Nef (**A y B**) y con siRNA-random (**C y D**). (**A y C**) Se indican los valores de MFI de la media + SD de 3 experimentos independientes, referidos a las células sin tratar (0). (**B y D**) Se indica en porcentaje, la media + SD de los valores obtenidos mediante densitometría del *western blot* en tres experimentos independientes. La expresión de GFP se normalizó con la expresión de RhoA que se utilizó como control. Se muestra una fotografía del *western blot* representativa de los tres experimentos realizados.

La MFI de GFP se redujo un 76% utilizando la concentración de 400 nM de siRNA y un 70% con 200 nM de siRNA (**figura 30A**) cuando se cuantificó por citometría de flujo, y mediante la cuantificación por *western blot*, se obtuvo una reducción del 61% con la concentración de 200 nM (**figura 30B**). El tratamiento con siRNA-random, como era de esperar no modificó la expresión de Nef (**figura 30 C y D**). Estos resultados indican que el siRNA-Nef reducía de un modo eficiente y específico la expresión de la proteína Nef, y por lo tanto, se podía utilizar para cuantificar la eficiencia de transfección de los dendrímeros.

d) Formación del dendriplex, estabilidad y protección frente a las RNAsas

Para evaluar la capacidad como transfectante del dendrímero de nueva síntesis 2G-03NN24, se utilizó el siRNA-Nef y el siRNA-random como control, para la formación de los dendriplexes. La formación de los complejos 2G-NN16/siRNA-Nef y 2G-NN16/siRNA-random se describió en resultados previos de nuestro grupo [285]. Los complejos se formaron en medio RPMI sin suero, utilizando el siRNA-Nef y el siRNA-random a la concentración de 250 nM e incrementando las concentraciones del dendrímero 2G-03NN24. Posteriormente, se analizaron mediante geles de agarosa al 2% para detectar la retención del siRNA por el dendrímero, debido a la interacción entre las cargas. La liberación de los siRNA retenidos por el dendrímero 2G-NN16 se publicó con anterioridad y se producía entre las 6 y las 24 horas [285]. En esta Memoria se presenta la retención y los tiempos de liberación de los siRNA por el dendrímero 2G-03NN24.

La retención completa de los siRNA en los pocillos del gel indica que el siRNA-Nef y el siRNA-random estaban siendo retenidos por el dendrímero 2G-03NN24, que les impedía migrar, lo que indicó la formación de complejos a los 30 minutos y la estabilidad de los mismos a las 5 horas. Por el contrario, la presencia de siRNA en la parte baja del gel indica que ha sido liberado del dendrímero (**figura 31**). Los dendriplexes 2G-03NN24/siRNA-Nef y 2G-03NN24/siRNA-random permanecieron estables y no migraron en el gel a los ratios de 1:2, 1:4 y 1:8 tras 30 minutos y 5 horas. A las 24 horas de la formación de los complejos se detectó la presencia de siRNA en la parte baja del gel, indicando que los dendriplexes habían liberado a los siRNA completamente a las 24 horas, ya que la intensidad de banda que se observó en todas las condiciones fue la misma que en el caso del siRNA solo (1:0) (**figura 31**). Los dendriplexes formados a ratios 1:2 parecían no contener la cantidad suficiente de dendrímero o de cargas para retener completamente al siRNA, puesto que a los 30 minutos se observa una cantidad baja de siRNA-Nef y de siRNA-random que no estaba siendo retenido por el dendrímero. El ratio mayor que se probó fue el de 1:8 puesto que este contenía el dendrímero a la concentración máxima no tóxica que era 5 μ M.

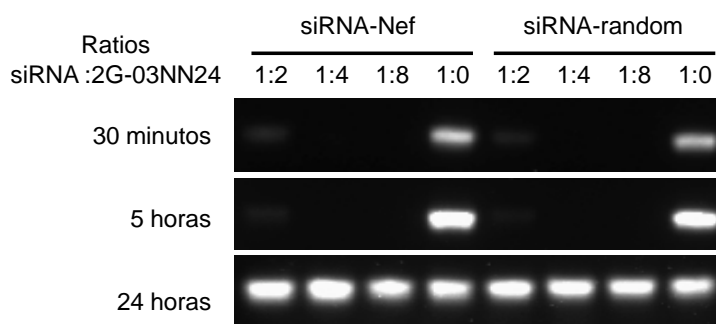


Figura 31. Formación del dendriplex entre el dendrímero 2G-03NN24 y los siRNA-Nef y siRNA-random. Se muestra el siRNA solo (1:0) y los dendriplexes, se indica los ratios de cargas, por cada carga negativa del siRNA hay 2 (1:2), 4 (1:4) y 8 (1:8) cargas positivas del dendrímero. Se muestra las fotografías de la parte baja del gel tras 30 minutos, 5 y 24 horas de formación del dendriplex. Se muestra el resultado de un experimento representativo de 2 realizados.

También se estudió si el dendrímero 2G-03NN24 tenía la capacidad de liberar el siRNA cuando el dendriplex con siRNA-Nef se exponía a la heparina, un polianión con una alta densidad de carga que competía con el siRNA para unirse al dendrímero. Los resultados muestran que el dendrímero liberaba al siRNA en todos los ratios analizados cuando se realizó el ensayo de competición con heparina (**figura 32**).

Por otro lado, se estudió si el dendrímero protegía al siRNA frente a la degradación por las RNAsas. Se trataron los dendriplexes con RNAsa, posteriormente se inactivó la enzima y se trataron con heparina para promover la liberación del siRNA retenido por el dendriplex. El siRNA solo se degradó completamente en presencia de RNAsa (**figura 32**), mientras que el siRNA retenido por el dendrímero prácticamente no mostró signos de degradación por la RNAsa (1:2, 1:4 y 1:8), indicando que el dendrímero estaba protegiendo al siRNA de la degradación.

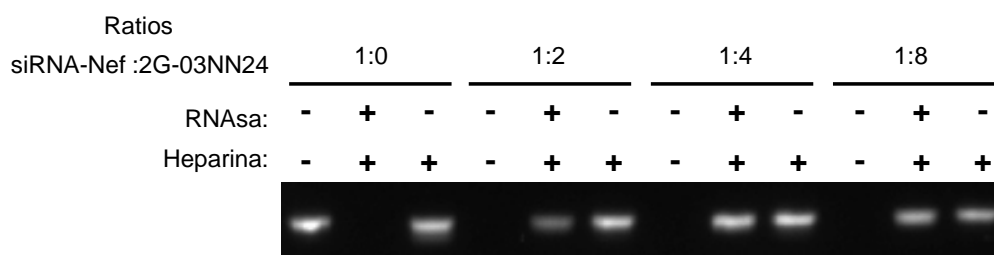


Figura 32. Formación del dendriplex, liberación del siRNA y protección frente a la RNAsa. Se muestra el siRNA solo (1:0) y los dendriplex formados en medio RPMI, tratados o no con RNAsa y posteriormente con o sin heparina para conseguir la liberación del siRNA-Nef (1:2, 1:4 y 1:8). El signo + representa tratamiento y el signo – no tratamiento. Se indican los ratios de cargas de la formación de los dendriplexes, por cada carga negativa del siRNA hay 2 (1:2), 4 (1:4) y 8 (1:8) cargas positivas del dendrímero. Se muestra el resultado de un experimento representativo de 2 realizados.

e) Citotoxicidad de los dendriplex en los linfocitos T CD4

Para establecer si los dendriplex eran tóxicos para los linfocitos T CD4, se realizó un ensayo de MTT tras 24 horas de tratamiento con los dendriplexes formados con los dendrímeros 2G-NN16 o 2G-03NN24, utilizando un siRNA-Nef y un siRNA-random a ratios 1:4. Los dos dendrímeros formaron dendriplexes sin tener un efecto tóxico en los linfocitos T CD4, ya que la viabilidad fue superior al 80% en todos los casos (**figura 33**).

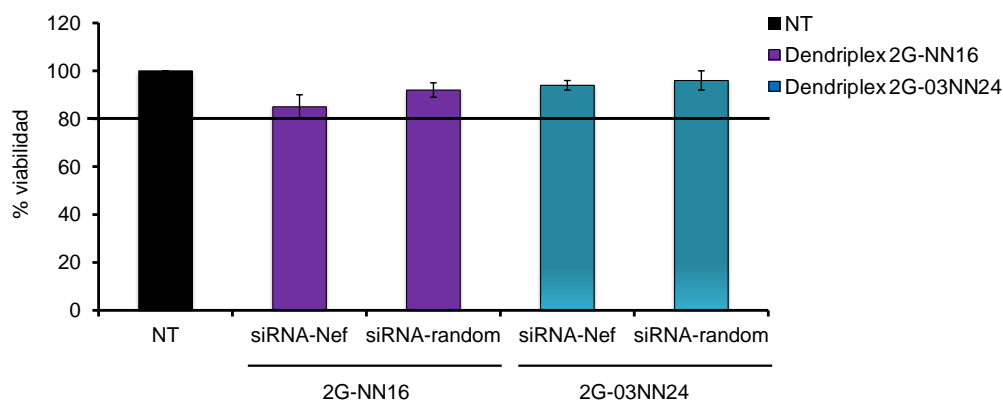


Figura 33. Viabilidad de los linfocitos T CD4 tratados con dendriplexes. Viabilidad de los linfocitos T CD4 cuantificada por el ensayo MTT. Se muestran los linfocitos T CD4 sin tratar (NT), control al que se refieren el resto de los datos, y tratados con los dendriplexes formados con el 2G-NN16 (morado) o con el 2G-03NN24 (azul) a ratios de 1:4 durante 24 horas. Los resultados representan la media + SD de tres donantes independientes por triplicado.

f) Eficiencia de transfección del siRNA-Nef en linfocitos T CD4

Para estudiar la eficiencia de transfección del dendrímero de nueva síntesis 2G-03NN24, se utilizó un siRNA-Nef marcado con un fluorocromo en 547 (siNef547) para cuantificar la entrada de siRNA mediante citometría de flujo. Se formó el dendriplex 2G-03NN24/siNef547, y la eficiencia de transfección del siRNA se cuantificó teniendo en cuenta el número de células viables, y posteriormente la subpoblación que era positiva para el fluorocromo. En el ensayo de transfección se observó una entrada de siNef547 del 36%, cuando este se transfectó con el dendriplex 2G-NN16/siNef547 (**figura 34**). Mientras que con el dendrímero 2G-03NN24, solamente se observó una entrada del 16% de siNef547 en los linfocitos T CD4 (**figura 34**).

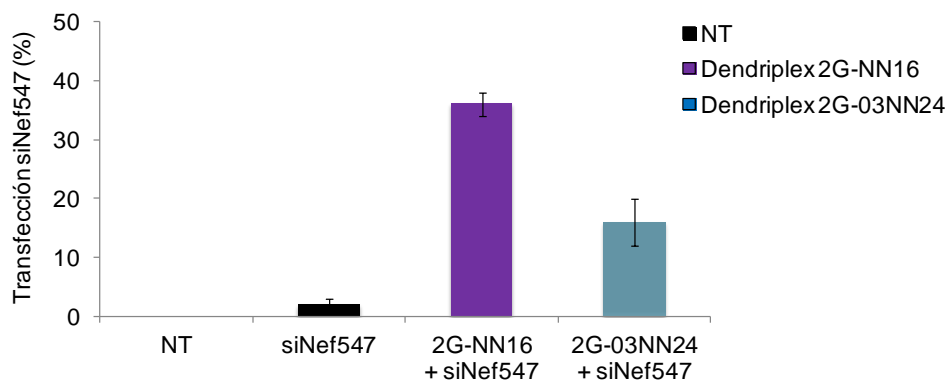


Figura 34. Transfección de los linfocitos T CD4 tratados con los dendriplexes. Entrada de siRNA-Nef en los linfocitos T CD4 mediada por el dendrímero 2G-NN16 y 2G-03NN24 y cuantificada por citometría de flujo. Se muestra la entrada del siRNA-Nef en los linfocitos tratados con siRNA-Nef solo (negro) y con los dendriplex 2G-NN16/siRNA-Nef (morado) y 2G-03NN24/siRNA-Nef (azul) durante 24 horas. Los resultados representan la media + SD de tres donantes independientes.

g) Efecto de inhibición de la replicación del VIH-1 en linfocitos T CD4

Se estudió la inhibición del VIH-1 en linfocitos T CD4 transfectados con el siRNA-Nef y con los dendriplexes. Se utilizó el siRNA-Nef porque la proteína Nef se produce rápidamente y en grandes cantidades después de la infección, además de ser un determinante de infectividad viral y patogénesis. Se utilizó también un siRNA-random como control que no tenía efecto sobre la replicación viral [285].

El siRNA-Nef liberado en los linfocitos T CD4 por el dendrímero 2G-NN16 alcanzó una inhibición del VIH del 25% tras 24 horas de transfección (**figura 35A**). Por lo tanto, el dendriplex 2G-NN16/siRNA-Nef mejoró 3.5 veces la reducción en la producción de Ag p24^{agg} mediada por el siRNA-Nef frente al siRNA-solo (7%). El dendriplex 2G-03NN24/siRNA-Nef, presentó una mejora de 4.1 veces en la inhibición de la replicación viral (50%) frente a la inhibición del siRNA-Nef solo (12%) y frente a la inhibición del dendriplex 2G-NN16/siRNA-Nef (25%) (**figura 35B**).

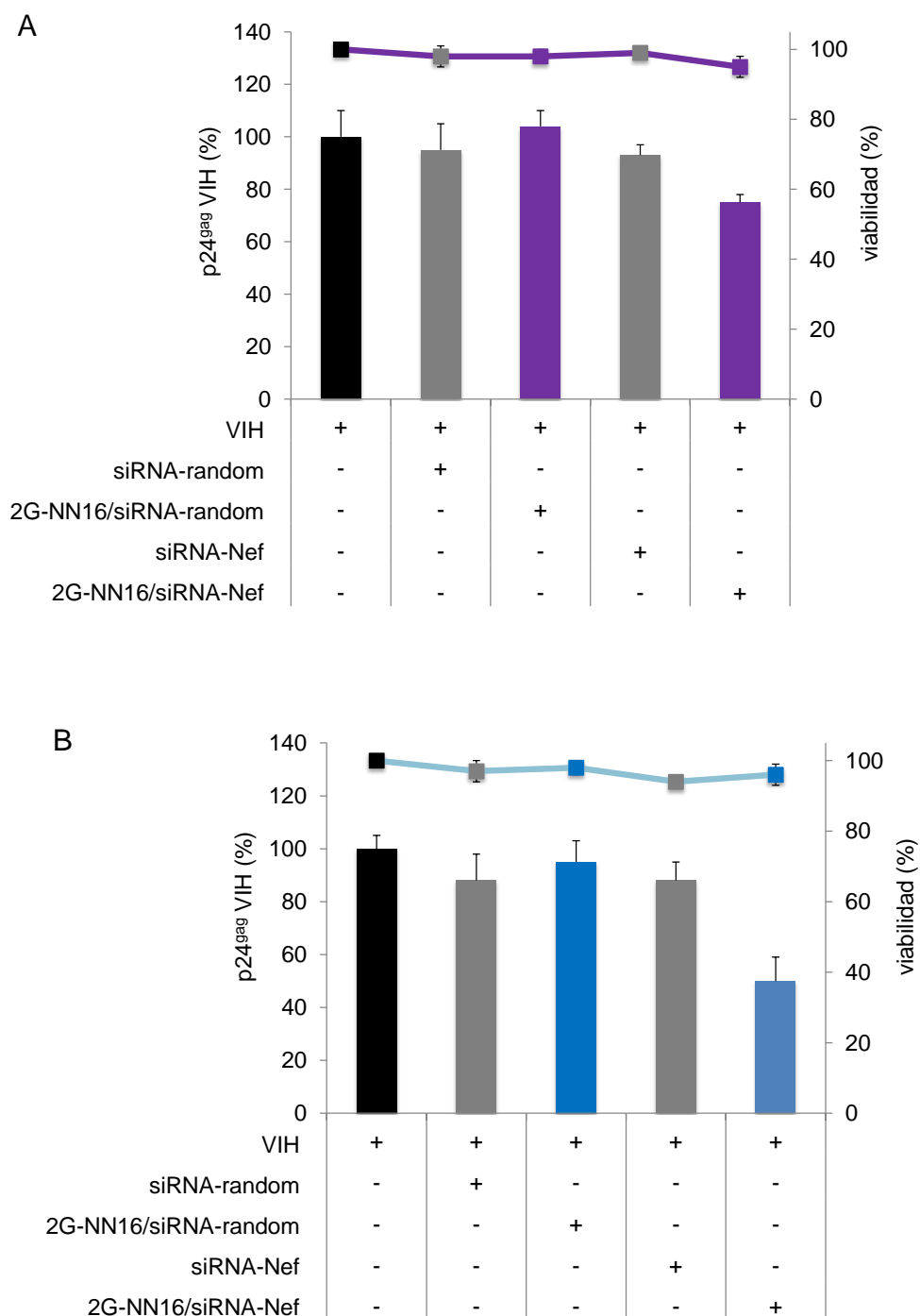


Figura 35. Liberación de Ag p24^{agg} por los linfocitos T CD4 transfectados con los dendriplexes. (A y B) Se indica mediante barras el porcentaje de la liberación de p24^{agg} cuantificada por ELISA de los linfocitos T CD4 sin tratar (VIH, negro), tratados con siRNA-random y siRNA-Nef (gris), y tratados con los dendriplexes formados con el dendrímero 2G-NN16 (**A**, morado) y 2G-03NN24 (**B**, azul) durante 24 horas. (**A y B**) Se indica mediante puntos la viabilidad celular referida a los linfocitos T CD4 sin transfectar (VIH, negro). Los resultados representan la media + SD de tres donantes independientes.

4.3. EFECTO DE LOS DENDRÍMEROS CARBOSILANO EN MACRÓFAGOS DE TIPO M1

Se estudió el efecto de dendrímeros aniónicos y catiónicos, como candidatos para su posible aplicación como inmunoterapia, en macrófagos de tipo M1 ya que son células que actúan como primera línea de defensa del sistema inmune. El objetivo fue descartar la utilización de aquellos dendrímeros que pudieran promover una respuesta inflamatoria mediada por macrófagos M1 en la traslación de las aplicaciones biomédicas descritas en distintas líneas celulares *in vitro* a modelos *in vivo* [63, 81, 149, 150, 171].

Se presentan los resultados del dendrímero aniónico de segunda generación con 16 grupos sulfonato en la superficie, 2G-S16, que actúa como microbicida frente al VIH-1 [52], el dendrímero catiónico inestable de segunda generación con núcleo de silicio y 16 cargas positivas en la periferia, 2G-NN16, que actúa: i) como transfectante en cultivos primarios y en líneas celulares establecidas [98], ii) como agente transportador de siRNA en CMSP y células del sistema nervioso (astrocitos) [129] mostrando que se puede utilizar como una terapia alternativa frente a la infección por el VIH [285]; iii) como transportador de péptidos que ha demostrado que no produce cambios en las características principales de las CD y que pueden jugar un papel como inmunoterapia frente a la infección por el VIH [215] y iv) como nanocompuesto que por sí solo es capaz de inhibir la respuesta Th17 *in vitro* e *in vivo* [104-106]. Además, en esta Memoria se muestran por primera vez los resultados de tres generaciones de una nueva familia de dendrímeros catiónicos inestables derivada de un núcleo polifenólico [234], 1G-03NN12, 2G-03NN24 y 3G-03NN48, con 12, 24 y 48 cargas positivas, respectivamente.

a) Citotoxicidad de los dendrímeros en macrófagos tipo M1

Con el objetivo de establecer las concentraciones máximas a las que se pueden utilizar los diferentes dendrímeros sin producir toxicidad en los macrófagos tipo M1, se realizaron dos tipos de ensayos, el ensayo de MTT basado en la actividad mitocondrial, y el marcaje con 7AAD para cuantificar las células viables por citometría de flujo.

Se trataron los macrófagos M1 con los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12, 2G-03NN24 y 3G-03NN48 durante 24 horas a las concentraciones indicadas en la **figura 36**. Los dos ensayos muestran que el dendrímero 2G-S16 no fue tóxico a la concentración de 10 μM (**figura 36A y B**), y que el dendrímero 2G-NN16 comenzaba a ser tóxico a partir de la concentración de 10 μM cuando se analizó por 7AAD (**figura 36B**), pero no por MTT (**figura 36A**). Los macrófagos M1 se trataron durante 24 horas con las tres generaciones de dendrímeros de núcleo polifenólico y se observó que la toxicidad aumentaba conforme incrementaba la generación, mostrando un efecto

generación dependiente. El dendrímero 1G-03NN12 comenzó a ser tóxico a la concentración de 15 μM , el 2G-03NN24 a la de 10 μM y el dendrímero 3G-03NN48 fue tóxico a todas las concentraciones analizadas (figura 36A), por lo que este dendrímero se descartó para los siguientes estudios. Los dendrímeros 1G-03NN12 y 2G-03NN24 no fueron tóxicos a las concentraciones de 3 y 5 μM analizadas por 7ADD (figura 36B). Por lo que se utilizaron a 10 μM el 2G-S16 y 5 μM el 1G-03NN12 y el 2G-03NN24 en los siguientes experimentos.

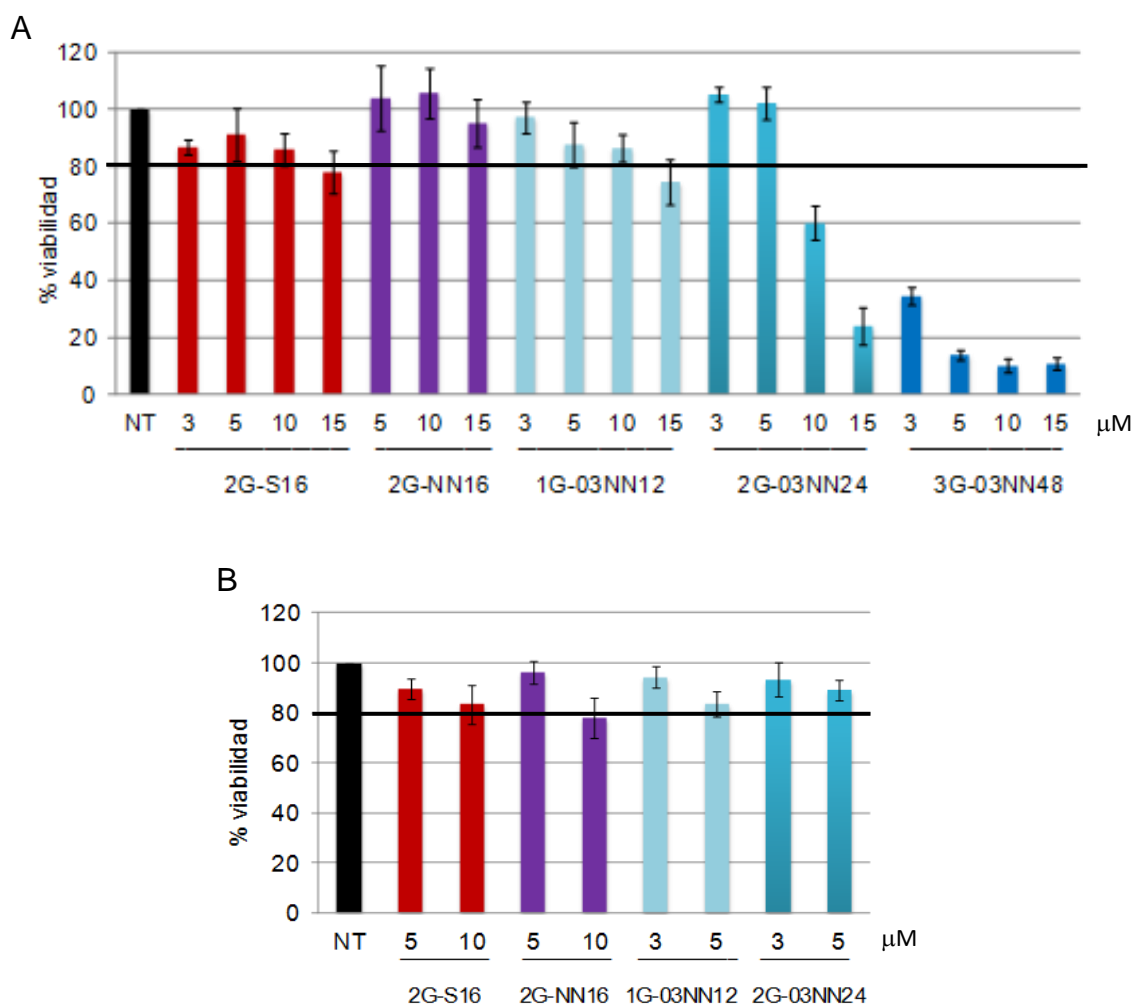


Figura 36. Viabilidad de los macrófagos tipo M1 tratados con diferentes dendrímeros. Viabilidad de los macrófagos M1 cuantificada mediante el ensayo MTT (A) y mediante el marcaje con 7ADD (B). En ambos métodos los macrófagos M1 se trataron durante 24 horas con los distintos dendrímeros a las concentraciones indicadas (A y B). Se muestran los macrófagos M1 sin tratar con los dendrímeros (NT, negro), control al que se refieren todos los datos, y tratados con 2G-S16 (rojo), 2G-NN16 (morado) y con la nueva familia de dendrímeros 1G-03NN12, 2G-03NN24 3G-03NN48 (diferentes escalas de azul) a las concentraciones con las que se han tratado los macrófagos M1. Los resultados representan la media \pm SD de tres donantes independientes en ambos casos, cada uno de los tres experimentos se realizó por triplicado.

b) Respuesta inflamatoria de los macrófagos de tipo M1

Cuando se estudia el perfil de biocompatibilidad de una molécula nueva, es muy importante evaluar si puede inducir una respuesta inflamatoria mediada por los macrófagos M1. Con el objetivo de estudiar el comportamiento de los macrófagos M1 frente a los distintos dendrímeros, se cuantificaron las citoquinas proinflamatorias más relevantes.

Se trataron los macrófagos M1 con los cuatro dendrímeros seleccionados durante 10 minutos, se estimularon durante 24 horas con 10 ng/ml de LPS y posteriormente se evaluó la liberación de TNF- α y de IL-12p40. Se cuantificó la subunidad p40 de la IL-12 porque también forma parte del heterodímero de IL-23 y ambas citoquinas promueven respuestas inflamatorias (Th1 y Th17, respectivamente). En la **figura 37A** se observa que los dendrímeros analizados disminuían la producción de TNF- α por parte de los macrófagos M1 cuando se trataron posteriormente con LPS. Sin embargo, solamente los dendrímeros catiónicos de segunda generación, 2G-NN16 y 2G-03NN24 disminuyeron estadísticamente la liberación de IL-12p40 por parte de los M1, mientras que el dendrímero aniónico 2G-S16 y el catiónico de primera generación 1G-03NN12 no afectaron a la producción de esta citoquina (**figura 37B**). En todos los experimentos se observó una tendencia de los dendrímeros a disminuir la producción de las citoquinas proinflamatorias, aunque no fuera significativa.

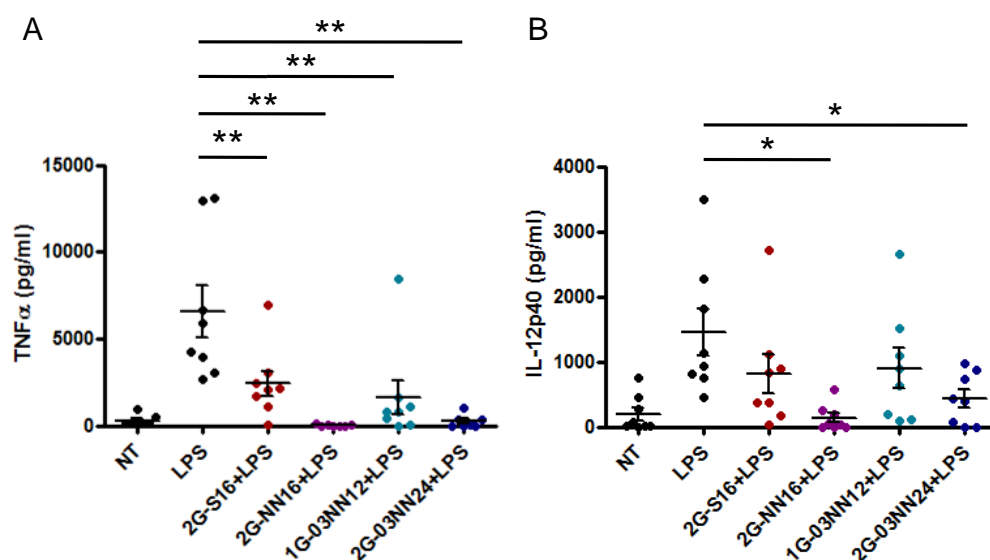


Figura 37. Cuantificación de la liberación de TNF- α e IL-12p40 por los macrófagos tipo M1. Se muestran los valores de TNF- α (A) e IL-12p40 (B) secretados por los macrófagos M1 sin tratar (NT), estimulados con LPS (LPS), tratados con los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 durante 10 minutos y posteriormente estimulados durante 24 horas con LPS (2G-S16+LPS, 2G-NN16+LPS, 1G-03NN12+LPS y 2G-03NN24+LPS). Cada punto representa el valor de un experimento y se muestra la media \pm SD. *p<0.05, **p<0.01.

También se estudió la producción de IL-1 β e IL-6 en los macrófagos M1 tratados con dendrímeros durante 24 horas. En ninguno de los experimentos los dendrímeros *per se* aumentaron la expresión de IL-1 β (figura 38A) e IL-6 (figura 38B).

Los macrófagos también pueden secretar quimioquinas relacionadas con la respuesta inflamatoria Th1, como CCL3 y CCL4. En la figura 38 se observa que en ningún caso los macrófagos M1 tratados con los dendrímeros aumentaron la expresión de CCL3 (figura 38C) o CCL4 (figura 38D) 24 horas después del tratamiento.

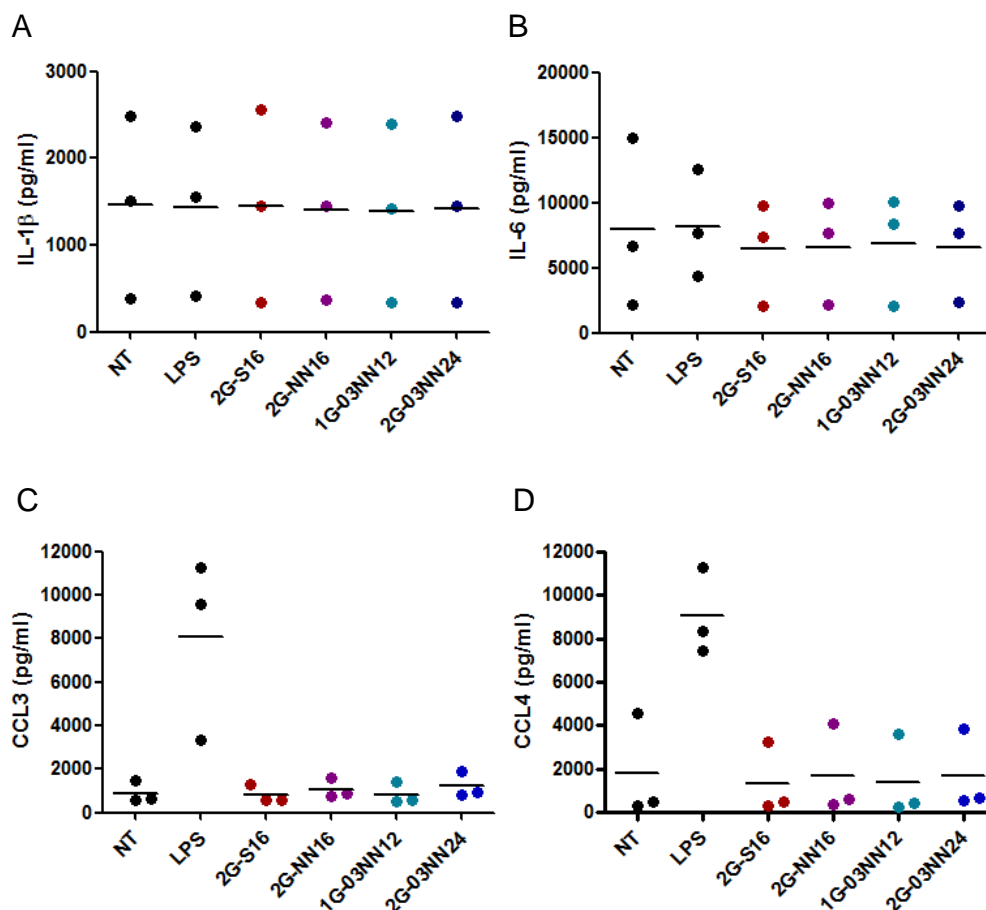


Figura 38. Cuantificación de la liberación de citoquinas y quimioquinas por los macrófagos tipo M1.

Se muestran los valores de IL-1 β (A), IL-6 (B), CCL3 (C) y CCL4 (D) secretada por los macrófagos M1. Se indica los M1 sin tratar (NT), estimulados con LPS (LPS) y tratados con los dendrímeros 2G-S16 (rojo), 2G-NN16 (morado), 1G-03NN12 (azul celeste) y 2G-03NN24 (azul) durante 24 horas. Cada punto representa el valor de un experimento, y se muestra la media.

c) Patrón de expresión génica de los macrófagos tipo M1

Con el objetivo de estudiar si alguno de los cuatro dendrímeros modificaba el patrón de expresión génica de los macrófagos M1, se trataron las células con los dendrímeros durante 24 horas y posteriormente se analizó la expresión de los genes descritos en la tabla 3 mediante *GeneCard* (Q-PCR). El dendrímero aniónico 2G-S16 aumentó la expresión del gen *ADORA3*

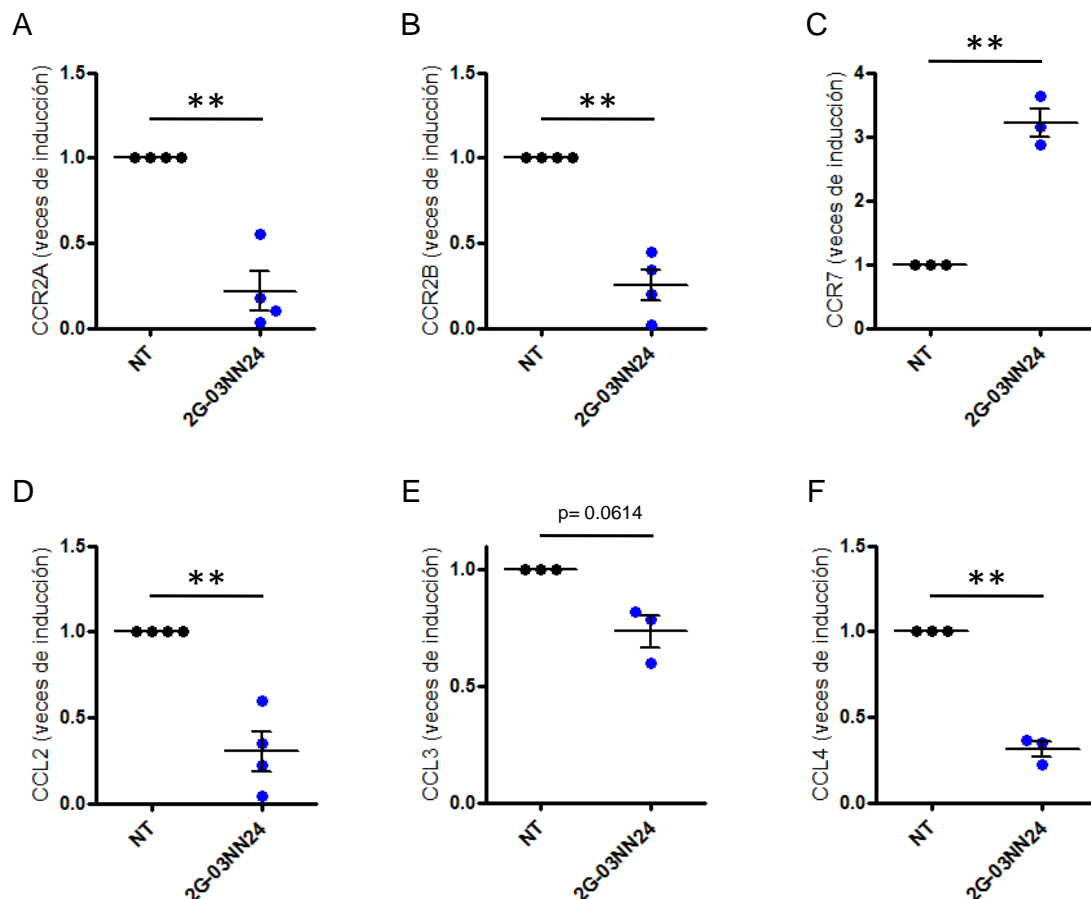
(*adenosine A3 receptor*), relacionado con los macrófagos de tipo M2. El dendrímero catiónico 2G-NN16 modificó la expresión de 11 genes, disminuyendo *CCR2*, *CSF1* (*colony stimulating factor 1* (*macrophage*)), *INHBA* (*inhibin beta A*), *IL12A* (*interleukin 12 alpha*) e *IL12B* (*interleukin 12 beta*) que están relacionados con los macrófagos M1, y aumentó la expresión de genes propios de los macrófagos M2, como *FOLR2* (*folate receptor beta*), *CCL2*, *STAB1* (*stabilin-1*) y *FOS* (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*). El dendrímero 1G-03NN12 disminuyó la expresión de *IL12A*, gen relacionado con el metabolismo de los macrófagos M1 puesto que codifica la IL-12p35, y del gen *SERPINB2* (*serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2*) relacionado con los macrófagos M2. Sin embargo, el resultado más relevante de esta parte de la Memoria se obtuvo con el dendrímero 2G-03NN24 que disminuyó la expresión de *CCR2*, correceptor implicado en la infección por el VIH-1, y la expresión de su ligando *CCL2*, que pese a ser un gen definitorio de M2, induce su expresión por IFN- γ y LPS, ya que es una quimioquina implicada en el reclutamiento de monocitos y linfocitos durante un proceso inflamatorio. En resumen, ninguno de los cuatro dendrímeros aumentó la expresión de genes asociados a los macrófagos M1

2G-S16		2G-NN16		1G-03NN12		2G-03NN24	
Gen	veces de inducción	Gen	veces de inducción	Gen	veces de inducción	Gen	veces de inducción
ADORA3	2,515	CCR2	0,238	IL12A	0,136	CCR2	0,301
		CSF1	0,159	SERPINB2	0,218	CCL2	0,203
		INHBA	0,338				
		IL12A	0				
		IL12B	0,233				
		COL23A1	0,216				
		SERPINB2	0,132				
		FOLR2	3,426				
		CCL2	2,515				
		STAB1	>2,5*				
		FOS	>2,5*				

Tabla 3. Expresión génica de los macrófagos tipo M1 tratados con los dendrímeros. Se muestran los resultados de las veces de inducción de la expresión de los genes que se modifican con el tratamiento de macrófagos M1 procedentes de un donante con 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24. Se indican los genes relacionados con el metabolismo de los macrófagos M1 (rojo), y de los M2 (verde). Los valores están relativizados a los macrófagos M1 sin tratar (valor 1). Se omiten los cambios inferiores a 2.5 veces de inducción/represión. Como genes de referencia se cuantifican *SLC25A37* (*solute carrier family 25 mitochondrial iron transporter member 37*), *ACTB* (β -actin), *SDHA* (*succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein*), *HPRT1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*), *RPLP0* (*ribosomal protein, large, P0*) y *TBP* (*TATA box binding protein*). * Valores que no se pueden calcular por los valores bajos de expresión de los macrófagos M1 sin tratar (control), se indica >2.5 puesto que es el punto de corte que se ha establecido.

d) Expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas de los macrófagos de tipo M1

El dendrímero 2G-03NN24 modificó dos genes relacionados entre sí, la quimioquina *CCL2* y su receptor *CCR2* (tabla 3). Aunque los macrófagos M1 no secretan grandes cantidades de *CCL2*, el hecho de que el dendrímero 2G-03NN24 modificara de un modo específico esta quimioquina y su receptor planteó la hipótesis de que podría estar modificando otras quimioquinas y receptores. Se cuantificó por Q-PCR la expresión de los receptores *CCR1*, *CCR2* ambas isoformas *CCR2A* y *CCR2B*, *CCR5*, *CCR7* y *CCRL2* (*chemokine (C-C motif) receptor-like 2*) ambas isoformas *CCRL2-1* y *CCRL2-2C* y de las quimioquinas tipo *C-C motif ligand* (CCL) *CCL1*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CCL7*, *CCL13*, *CCL17*, *CCL18*, *CCL19*, *CCL21*, *CCL22*, *CCL23* ambas isoformas *CCL23-8* y *CCL23-8-1*, y *CCL24* en macrófagos M1 procedentes de tres o cuatro donantes sanos tratados con el dendrímero 2G-03NN24 durante 24 horas. El dendrímero 2G-03NN24 disminuyó de forma significativa la expresión de *CCR2A* (figura 39A) y de *CCR2B* (figura 39B), y aumentó también de forma significativa la expresión de *CCR7* (figura 39C). Respecto a las quimioquinas, disminuyó de forma significativa la expresión de *CCL2* (figura 39D) y *CCL4* (figura 39F), y aunque también disminuyó la expresión de *CCL3*, esta no llegó a ser estadísticamente significativa (figura 39E). De todas las quimioquinas cuantificadas, el dendrímero 2G-03NN24 solamente aumentó la expresión de forma significativa de *CCL22* (figura 39G).



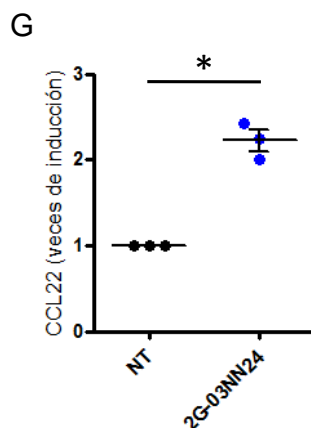


Figura 39. Expresión de quimioquinas y de receptores de quimioquinas en los macrófagos tipo M1 tratados con el dendrímero 2G-03NN24. Se muestran las veces de inducción de la expresión del mRNA de *CCR2A* (A), *CCR2B* (B), *CCR7* (C), *CCL2* (D), *CCL3* (E), *CCLA* (F) y *CCL22* (G) en M1 tratados durante 24 horas con el dendrímero 2G-03NN24. Valores relativizados a los M1 sin tratar (NT). La representación del eje de ordenadas varía según las veces de inducción obtenidas. Como genes de referencia se cuantificaron *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) y *TBP*. Cada punto representa el valor de un experimento, y se muestra la media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

e) Funcionalidad de los macrófagos de tipo M1

Se estudió si los dendrímeros afectaban a la funcionalidad de los macrófagos M1. Se realizó un ensayo de funcionalidad basado en la capacidad de los M1 de inhibir el crecimiento de la línea celular derivada de pacientes con leucemia mieloide crónica, conocida como K562 [89, 243].

Se trataron los macrófagos M1 con los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 durante 24 horas y posteriormente se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares. Los sobrenadantes se diluyeron a $\frac{1}{2}$ y se utilizaron para cultivar las células K562 durante 72 horas, posteriormente se analizó la proliferación celular por recuento de células K562 viables por citometría de flujo. Como era de esperar, el sobrenadante de los macrófagos M1 (M1 NT) disminuyó de forma significativa la proliferación de las células K562 (figura 40). Ninguno de los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 o 2G-03NN24 modificó la capacidad de los sobrenadantes de los macrófagos M1 de inhibir la proliferación de las células tumorales K562 (figura 40).

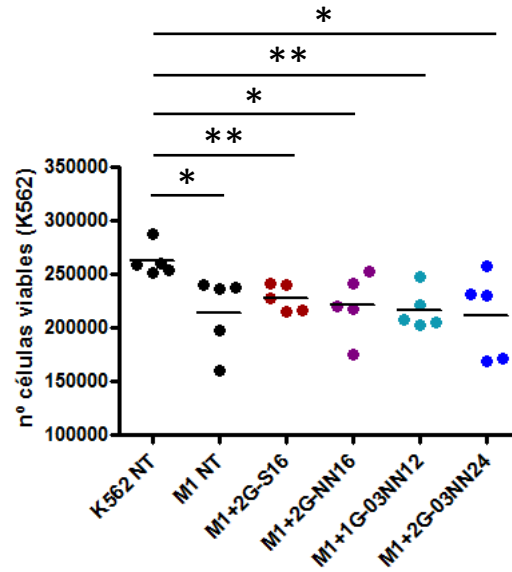


Figura 40. Proliferación de las células K562. Se indica el número de células viables sin tratar (K562 NT), tratadas con sobrenadante de M1 (M1 NT), y tratadas con sobrenadantes de M1 que previamente habían sido tratados con los dendrímeros 2G-S16 (rojo), 2G-NN16 (morado), 1G-03NN12 (azul celeste) y 2G-03NN24 (azul). Cada uno de los puntos representa el valor de un donante y se indica la media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

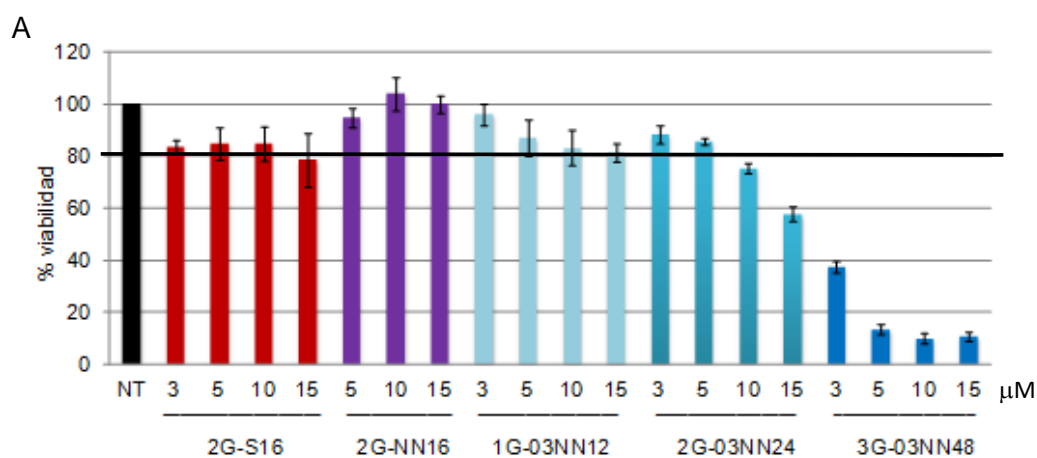
4.4. CAMBIO DE FENOTIPO DE LOS MACRÓFAGOS TIPO M2 MEDIADO POR EL DENDRÍMERO 2G-03NN24

Debido a las funciones de los TAM similares a los M2, y a las implicaciones sobre su capacidad protumoral y antiinflamatoria, se ha propuesto utilizar estas células como diana terapéutica para el tratamiento de tumores [142, 164, 251]. El objetivo principal de esta Sección ha sido utilizar los macrófagos de tipo M2 como modelo de TAM para analizar el papel que podrían tener los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12, 2G-03NN24 y 3G-03NN48 *per se* en las modificaciones del fenotipo y en la funcionalidad de los macrófagos de tipo M2.

a) Citotoxicidad asociada a los dendrímeros en los macrófagos de tipo M2

Con el objetivo de establecer las concentraciones máximas a las que se pueden utilizar los diferentes dendrímeros sin producir toxicidad en los macrófagos tipo M2, se realizaron dos tipos de ensayos, el ensayo de MTT basado en la actividad mitocondrial, y el marcaje con 7AAD para cuantificar las células viables por citometría de flujo.

Se trataron los macrófagos M2 con los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12, 2G-03NN24 y 3G-03NN48 durante 24 horas a las concentraciones indicadas en la [figura 41](#). Los ensayos de toxicidad muestran que el dendrímero estable aniónico 2G-S16 se puede utilizar a concentraciones de 10 μM sin provocar citotoxicidad 24 horas después de su tratamiento, mientras que los dendrímeros 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 se pueden utilizar a concentraciones de 5 μM ([figura 41A](#) y [B](#)). Por lo tanto, estas fueron las concentraciones de uso en los siguientes experimentos. El dendrímero de núcleo polifenólico 3G-03NN48 fue tóxico a todas las concentraciones estudiadas, por lo que se descartó para los siguientes estudios ([figura 41A](#)).



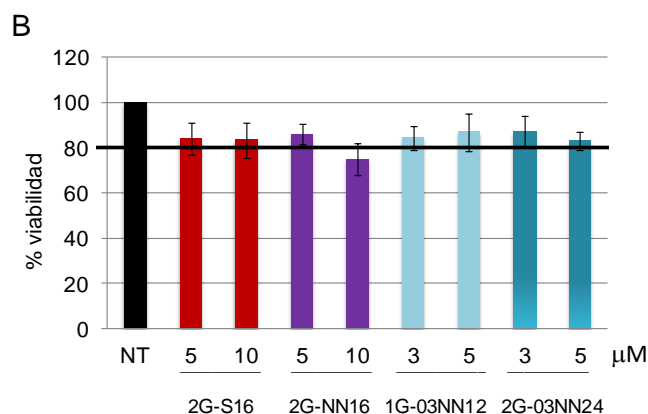


Figura 41. Estudio de la viabilidad de los macrófagos M2. Viabilidad celular cuantificada por el ensayo de MTT (A) y por el marcaje con 7ADD (B). En esta figura se indican los macrófagos sin tratar con los dendrímeros (NT, negro), control al que se refieren todos los datos, y tratados a las concentraciones indicadas con los dendrímeros 2G-S16 (rojo), 2G-NN16 (morado) y con la nueva familia de dendrímeros de núcleo polifenólico 1G-03NN12, 2G-03NN24 y 3G-03NN48 (diferentes escalas de azul) durante 24 horas. Los resultados representan la media \pm SD de tres donantes independientes por triplicado en ambos casos.

b) Modificaciones en la liberación de citoquinas de los macrófagos de tipo M2

Una de las características principales que diferencian a los macrófagos de tipo M1 y M2 es la producción de citoquinas frente a un estímulo como es el LPS. Mientras que los macrófagos M2 estimulados con LPS secretan grandes cantidades de IL-10 y una menor cantidad de IL-12 y TNF- α , los macrófagos M1 liberan grandes cantidades de IL-12 y TNF- α . Se estudió el efecto que los dendrímeros tenían sobre la producción de IL-10 en los macrófagos M2. Se trataron los macrófagos M2 con los diferentes dendrímeros durante 10 minutos, posteriormente se estimularon durante 24 horas con 10 ng/ml de LPS y se evaluó la liberación de IL-10. Los tres dendrímeros de segunda generación, 2G-S16, 2G-NN16 y 2G-03NN24 disminuyeron significativamente la producción de IL-10 en los macrófagos M2 estimulados con LPS (figura 42).

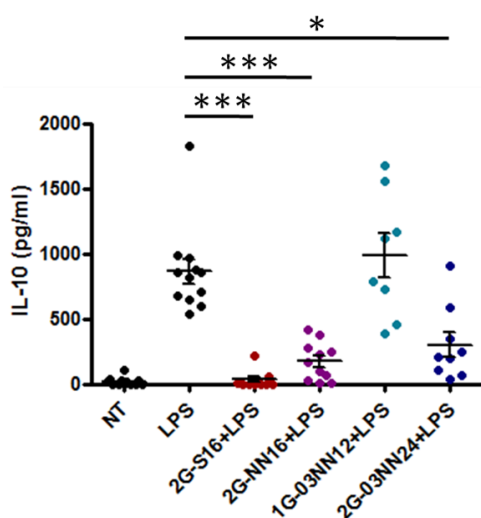


Figura 42. Cuantificación de la liberación de IL-10 por los macrófagos M2. Se muestran los valores en pg/ml de la IL-10 secretada por los macrófagos M2 sin tratar (NT), estimulados con LPS (LPS), tratados con los dendrímeros y LPS (2G-S16+LPS, 2G-NN16+LPS, 1G-03NN12+LPS y 2G-03NN24+LPS). Cada punto representa el valor de un experimento, y se muestra la media \pm SD. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Con el objetivo de dilucidar el mecanismo de acción por el cual los dendrímeros disminuían la producción de IL-10 de los macrófagos M2 cuando se tratan con LPS, se realizó un experimento similar al anterior, pero alternado el orden de añadir los estímulos al cultivo. Se trataron los macrófagos M2 solamente con los dendrímeros, sin LPS, para determinar si los dendrímeros disminuían la producción basal de IL-10 de los M2. De modo independiente, se incubaron durante 10 minutos cada uno de los dendrímeros con LPS, y posteriormente, se añadió la mezcla al cultivo de los M2, para determinar así si el dendrímero se estaba uniendo al LPS. Por otro lado, se estimularon los macrófagos M2 con LPS durante 10 minutos, y posteriormente se añadieron los dendrímeros al cultivo de M2, para establecer si los dendrímeros disminuían la producción de IL-10 actuando directamente sobre los M2, y no bloqueando el LPS (**figura 43**).

El dendrímero aniónico 2G-S16 (rojo) disminuyó la producción de IL-10 hasta valores por debajo de los que producen los M2 sin ser activados (NT), esta disminución se mantuvo incluso si los M2 se habían estimulado previamente con LPS (LPS+2G-S16). Ninguno de los dendrímeros catiónicos 2G-NN16, 2G-03NN24 disminuyó los valores basales de producción de la IL-10. Respecto al orden de cómo se añadieron los estímulos, no se observó diferencia en la producción de IL-10.

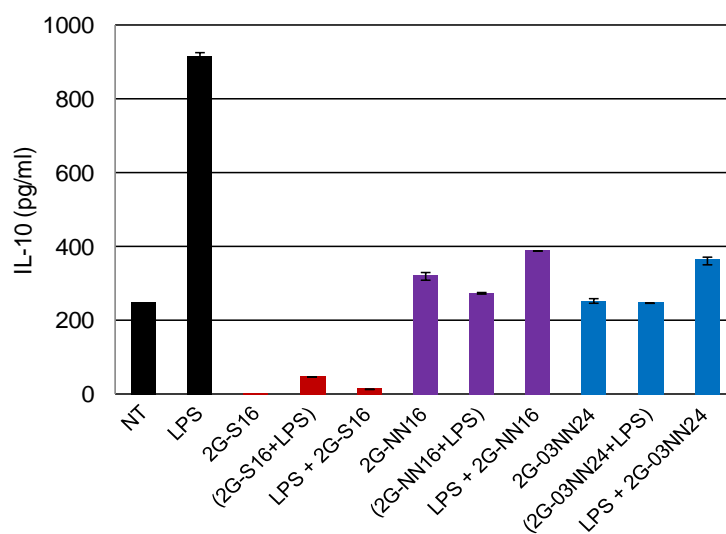


Figura 43. Cuantificación de la liberación de IL-10 por los macrófagos tipo M2. Se muestran los datos de la producción de IL-10 por los M2 sin tratar (NT), estimulados con LPS (LPS), tratados con los dendrímeros (2G-S16 rojo, 2G-NN16 morado y 2G-03NN24 azul), tratados con la mezcla dendrímero+LPS incubada previamente 10 minutos (2G-S16+LPS rojo, 2G-NN16+LPS morado y 2G-03NN24+LPS azul), y finalmente tratados primero con LPS y posteriormente con los dendrímeros (LPS+2G-S16 rojo, LPS+2G-NN16 morado y LPS+2G-03NN24 azul). Los resultados representan la media \pm SD de los triplicados de un donante.

El siguiente paso fue estudiar si los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 podrían modificar también la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los M2. Para ello, se realizaron mediciones de la producción de TNF- α y de IL-12p40 en los M2 tras 24 horas de tratamiento con los dendrímeros. Los macrófagos M2 tratados con LPS produjeron poca cantidad de TNF- α e IL-12p40 como era de esperar. El tratamiento con el dendrímero 2G-S16 (rojo) no modificó la expresión de TNF- α (**figura 44A**), pero aumentó significativamente la producción de IL-12p40 cuando se trataron los macrófagos M2 con LPS (**figura 44B**). El dendrímero 2G-NN16 (morado) disminuyó de forma significativa la expresión de TNF- α llegando a alcanzar los valores basales de los macrófagos M2 sin estimular (**figura 44A**). El dendrímero 1G-03NN12 aumentó significativamente la producción de TNF- α (**figura 44A**) y de IL-12p40 (**figura 44B**) por encima de los valores obtenidos con el tratamiento con LPS solo. El dendrímero 2G-03NN24 disminuyó significativamente la producción de TNF- α cuando se trataron los M2 con LPS (**figura 44A**). El dendrímero que modificó el fenotipo de los M2 para que actuaran produciendo citoquinas proinflamatorias típicas de los M1, fue el 1G-03NN12, aunque no disminuyó la producción de IL-10 de los M2 tratados con LPS (**figura 42**).

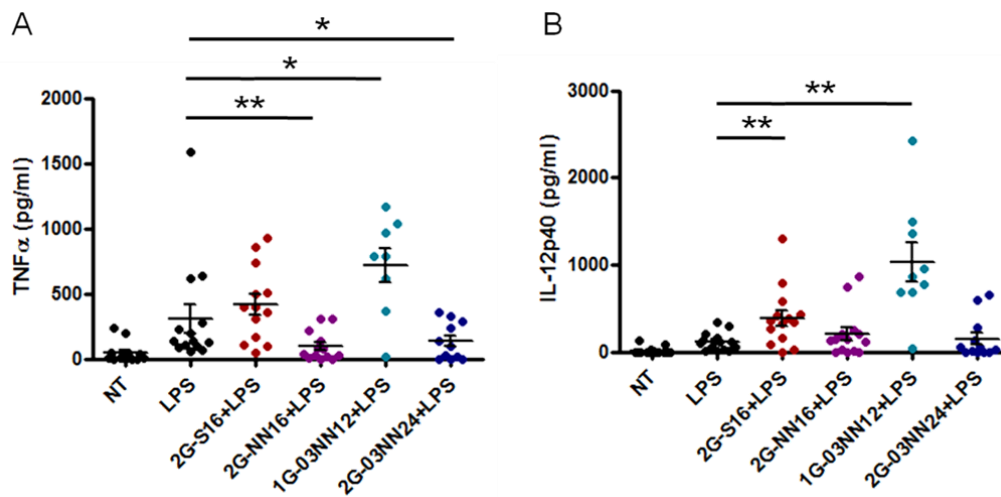


Figura 44. Cuantificación de la liberación de TNF- α e IL-12p40 de los macrófagos M2. Se muestran los valores de TNF- α (A) e IL-12p40 (B) secretadas por los M2 sin tratar (NT), estimulados con LPS (LPS), y tratados con los dendrímeros durante 10 minutos y posteriormente estimulados con LPS (2G-S16+LPS, 2G-NN16+LPS, 1G-03NN12+LPS, 2G-03NN24+LPS). Cada punto representa el valor de un experimento, y se muestra la media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

c) Cambios en el patrón de expresión génica de los macrófagos de tipo M2

Con el objetivo de estudiar si los cambios observados anteriormente se podían justificar por una modificación de la expresión génica de los macrófagos, se trataron los M2 con los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 durante 24 horas y posteriormente se analizó la expresión de *IGF1* (*Insulin-like growth factor 1*), *EMR1* (*EGF-like module-containing mucin-like hormone*

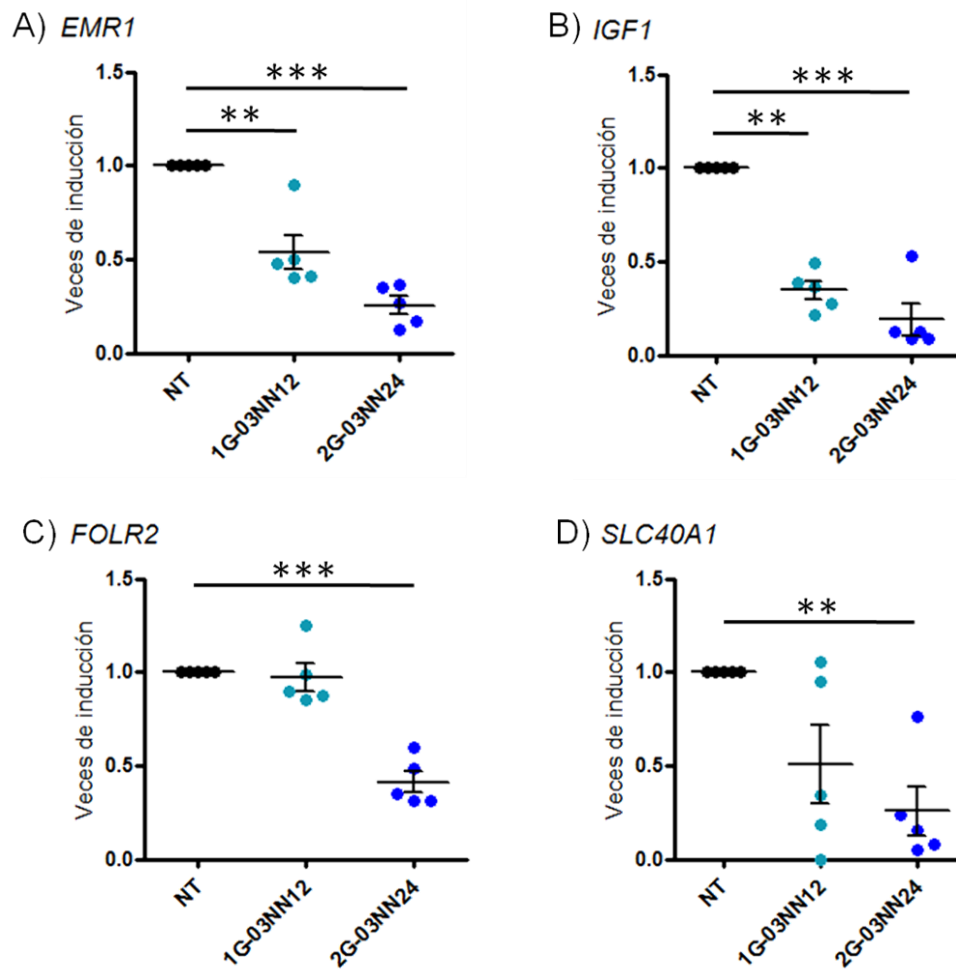
receptor-like 1), *SLC40A1* (Solute carrier family 40 member 1), *SLC46A1* (Solute carrier family 46 (folate transporter), member 1), *HMOX1* (heme oxygenase (decycling) 1), *HTR2B* (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B), *FOLR2*, *FLT1* (*fms*-related tyrosine kinase 1), *CCL2*, *STAB1*, *SERPINE1* (serpin peptidase inhibitor, clade E member 1), *ALDH1A2* (Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2), *CCR2*, *CCL17*, *ECSCR* (Endothelial cell-specific chemotaxis receptor), *TACSTD2* (tumor-associated calcium signal transducer 2), *EGLN3* (*Egl nine-like protein 3 isoform*), *INHBA* y *CSF1* mediante *GeneCard* (Q-PCR).

El dendrímero 2G-S16 no modificó la expresión de ninguno de los genes estudiados. El dendrímero 2G-NN16 disminuyó la expresión de algunos de los genes relacionados con los M2, y de genes implicados en el metabolismo de los M1 (tabla 4). Por lo tanto, se descartaron ambos dendrímeros para los siguientes estudios. El dendrímero 1G-03NN12 disminuyó la expresión de *CCR2* y de algunos genes típicamente expresados en los M2, como *IGF1*, *EMR1*, *SLC40A1* y *STAB1*, y aumentó la expresión de *EGLN3*, gen relacionado con los M1 (tabla 4). Sin embargo, los resultados más relevantes fueron los obtenidos con el dendrímero 2G-03NN24, se encontraron seis genes modificados de igual modo en los dos donantes estudiados, disminuyó la expresión de genes propiamente expresados por los M2, como son *IGF1*, *EMR1*, *SLC40A1* y *SLC46A1* y aumentó la expresión de genes típicos de los M1, como *SERPINE1* y *ALDH1A2* (tabla 4).

2G-NN16		1G-03NN12		2G-03NN24			
Donante 1		Donante 1		Donante 1		Donante 2	
Gen	veces de inducción	Gen	veces de inducción	Gen	veces de inducción	Gen	veces de inducción
IGF1	0,297	IGF1	0,275	IGF1	0,124	IGF1	0,094
SLC40A1	0,108	EMR1	0,399	EMR1	0,347	EMR1	0,182
HTR2B	0,340	SLC40A1	0,182	SLC40A1	0,050	SLC40A1	0,049
SERPINE1	2,564	STAB1	0,316	SLC46A1	0,371	SLC46A1	0,309
CCR2	0,222	CCR2	0,250	HTR2B	0,247	HMOX1	0,262
CCL17	0,289	EGLN3	3,035	SERPINE1	3,286	FOLR2	0,348
ECSCR	0,243			ALDH1A2	3,648	CCL2	7,378
TACSTD2	0,261			CCR2	0,292	FLT1	2,798
						SERPINE1	7,054
						ALDH1A2	22,589
						EGLN3	7,841
						INHBA	8,138
						CSF1	3,412

Tabla 4. Expresión génica de los macrófagos M2 tratados con los dendrímeros. Se muestran los resultados obtenidos en un donante de las veces de inducción de la expresión de los genes que se modifican por el tratamiento con 2G-NN16 (morado) y 1G-03NN12 (azul celeste). Se muestran los valores obtenidos en M2 de dos donantes tratados con 2G-03NN24 (azul). Se indican los genes relacionados con la polarización de los M2 (verde) y de los M1 (rojo). Como genes de referencia se cuantifican *SLC25A37*, *ACTB*, *SDHA*, *HPRT1*, *RPLP0* y *TBP*. Valores relativizados a los macrófagos sin tratar (valor 1), se muestran los cambios superiores a 2.5 veces de inducción/represión.

Se trataron los M2 con los dendrímeros 1G-03NN12 o 2G-03NN24 durante 24 horas, y posteriormente se analizó la expresión por Q-PCR de cinco genes definitorios de macrófagos tipo M2, y otros cinco genes típicamente expresados por los macrófagos tipo M1 (figura 45). El dendrímero 1G-03NN12 disminuyó significativamente la expresión de *EMR1* (figura 45A) y de *IGF1* (figura 45B), y aumentó notablemente la expresión de *INHBA* (figura 45F). El dendrímero 2G-03NN24 disminuyó significativamente la expresión de cuatro de los cinco genes definitorios de M2, *EMR1* (figura 45A), *IFG1* (figura 45B), *FOLR2* (figura 45C) y *SLC40A1* (figura 45D), pero no modificó la expresión de *HTR2B* (figura 45E); además, aumentó de forma relevante la expresión de los cinco genes relacionados con los macrófagos de tipo M1, *INHBA* (figura 45F), *SERPINE1* (figura 45G), *FLT1* (figura 45H), *EGLN3* (figura 45I) y *ALDH1A2* (figura 45J).



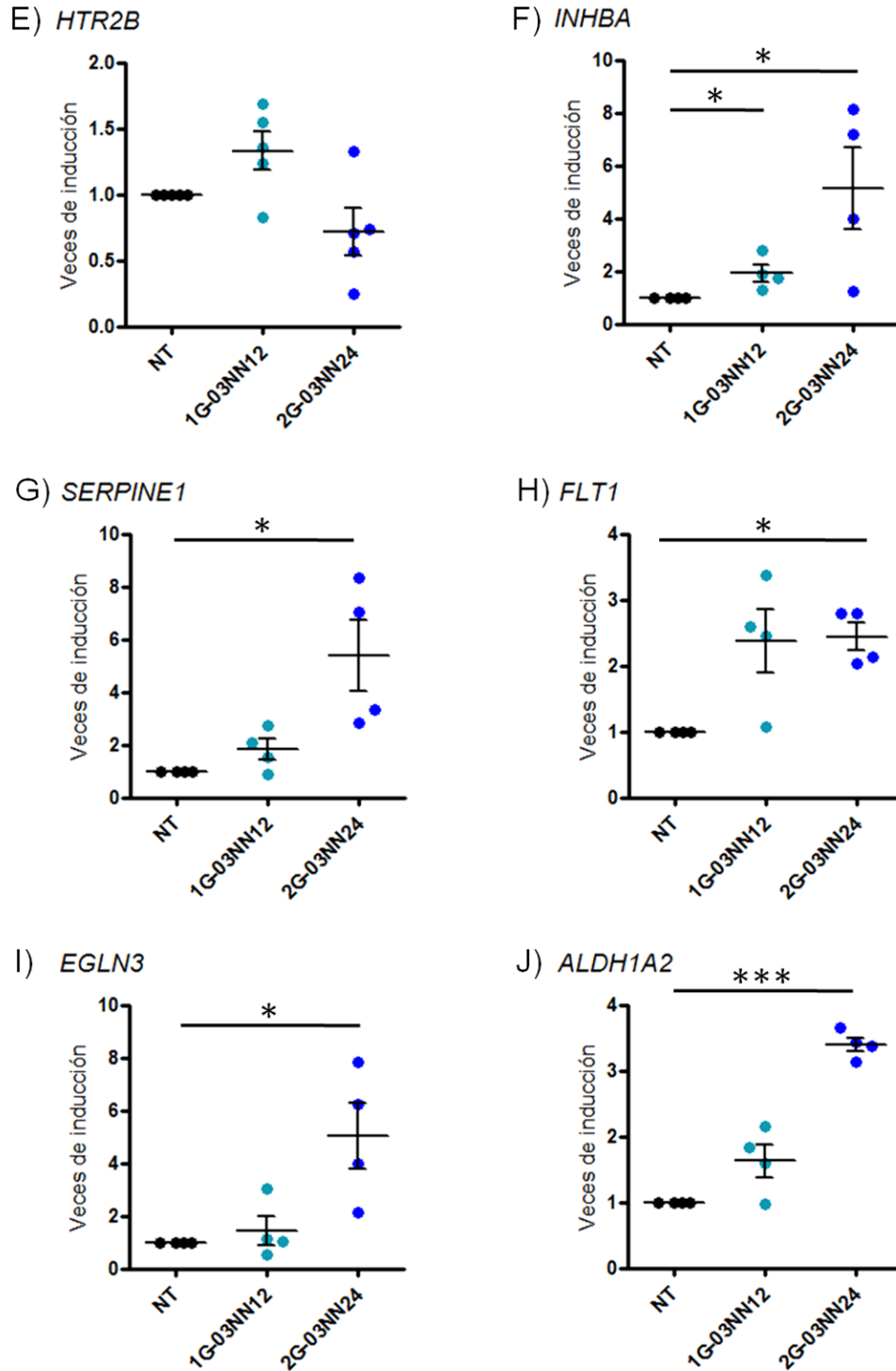


Figura 45. Cuantificación de la expresión génica en los macrófagos M2 tratados con los dendrímeros 1G-03NN12 y 2G-03NN24. Se muestran las veces de inducción de la expresión de cada uno de los genes *EMR1* (A), *IGF1* (B), *FOLR2* (C), *SLC40A1* (D), *HTR2B* (E), *INHBA* (F), *SERPINE1* (G), *FLT1* (H), *EGLN3* (I) y *ALDH1A2* (J), refiriendo los datos a los M2 sin tratar (valor 1). Se muestran los M2 sin tratar (NT), tratados con el dendrímero 1G-03NN12, y tratados con el dendrímero 2G-03NN24. Como genes de referencia se cuantificaron *GAPDH* y *TBP*. Cada punto representa el valor de un experimento, y se muestra la media ± SD. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

d) Pérdida de funcionalidad en la fagocitosis de los macrófagos de tipo M2

Se estudió si los dendrímeros 1G-03NN12 y 2G-03NN24 modificaban la funcionalidad de los macrófagos M2. Los macrófagos M2 se caracterizan por tener una capacidad de fagocitosis mayor que los M1, basándonos en esta diferencia funcional, se estudió de qué modo los dendrímeros afectaban a la capacidad de fagocitosis de los M2. Se utilizaron fragmentos de *E. coli* marcados, y se analizó la fluorescencia basándose en la acidificación de las partículas cuando se fagocitaban, esto permitió cuantificar por citometría de flujo la cantidad de macrófagos que fagocitaban partículas y la intensidad de fagocitosis de cada una de las células.

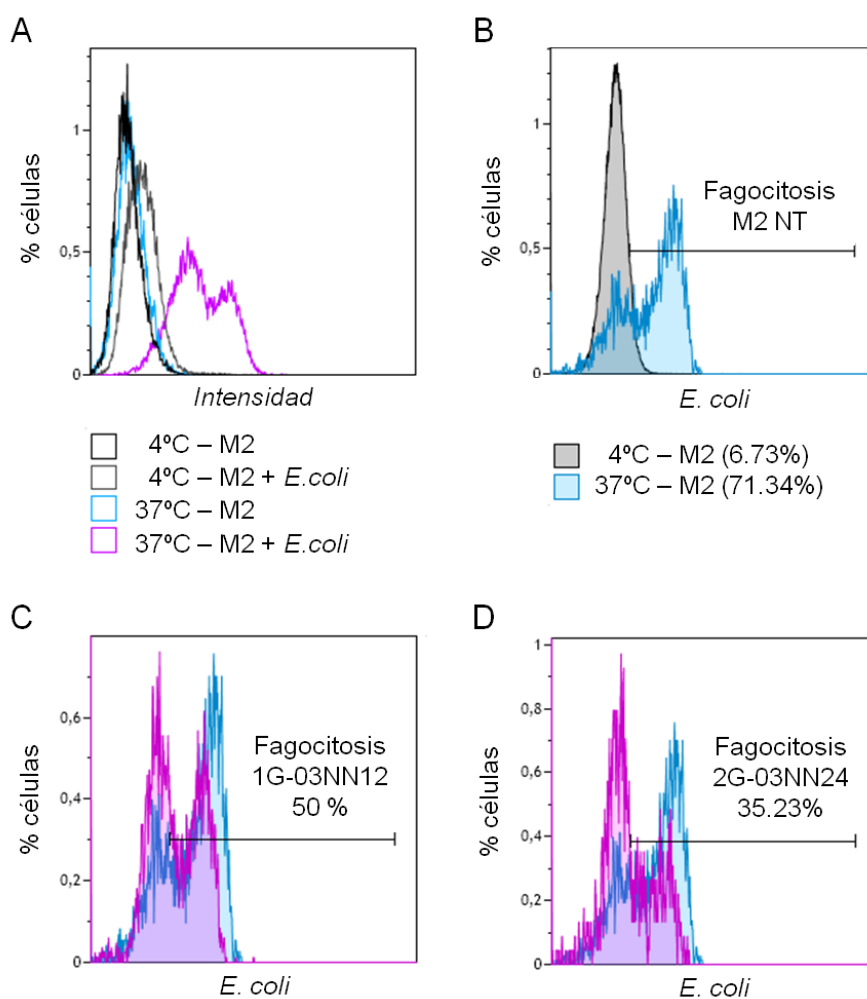


Figura 46. Cuantificación de la capacidad fagocítica de los macrófagos M2. Se muestran los datos de fagocitosis de los macrófagos M2 sin tratar (**A y B**), tratados durante 24 horas con el dendrímero 1G-03NN12 (**C**) o con el 2G-03NN24 (**D**). (**A**) En el histograma se muestra la intensidad de fluorescencia de los M2 sin tratar (M2), y de los M2 incubados con *E.coli* (M2+E.coli), ambas condiciones evaluadas a 4°C y a 37°C. (**B**) Se indica la fagocitosis de M2 incubados con *E.coli* a 4°C (gris) y a 37°C (azul). (**C**) Se muestra el porcentaje de fagocitosis de los M2 tratados con 1G-03NN12 (morado). (**D**) Se muestra el porcentaje de fagocitosis de los M2 tratados con 2G-03NN24 (morado). Resultados de un experimento representativo de 3 realizados.

En primer lugar se evaluó la autofluorescencia que emitían los macrófagos para poder establecer los valores de referencia en los parámetros de adquisición del citómetro de flujo, evitando falsos positivos. En la **figura 46** se muestra el porcentaje de células en función de la intensidad de fluorescencia, medida en el canal donde se detectaron las partículas de *E.coli*. Los M2 no emitieron autofluorescencia en este canal (**figura 46A**). Por otro lado, se incubaron los macrófagos M2 con *E.coli* a 4°C como control negativo de fagocitosis y a 37°C como control positivo de la fagocitosis basal de los M2 (rosa). Los resultados muestran que se inhibió la fagocitosis exitosamente a 4°C (gris) (**figura 46A**).

El siguiente paso fue realizar el experimento tratando los M2 durante 24 horas con los dendrímeros y evaluar si modificaban la fagocitosis. Los M2 a 4°C tenían una fagocitosis del 6.73% y a 37°C presentaban una capacidad fagocítica del 71.34% (**figura 46B**). Los M2 que se trataron con los dendrímeros 1G-03NN12 y 2G-03NN24 disminuyeron la capacidad de fagocitosis, obteniendo un 50% los tratados con 1G-03NN12 (**figura 46C**) y un 35.23% (**figura 46D**) los M2 tratados con 2G-03NN24.

Para confirmar que los datos obtenidos eran reproducibles, se realizó el mismo experimento con macrófagos de tipo M2 procedentes de tres donantes independientes e incluyendo además macrófagos de tipo M1 para cuantificar su fagocitosis basal. En la **figura 47** se observa que la fagocitosis basal de los M1 fue menor que la de los M2, ya que presentaron un promedio de 41.1% frente al 67.8% de los M2. Los M2 tratados con 1G-03NN12 disminuyeron significativamente su capacidad de fagocitosis hasta un 31.3% en promedio, mientras que los tratados con 2G-03NN24 alcanzaron valores del 24.1%, disminuyendo de forma significativa la capacidad de fagocitosis de los M2 hasta valores menores que los propios de los M1.

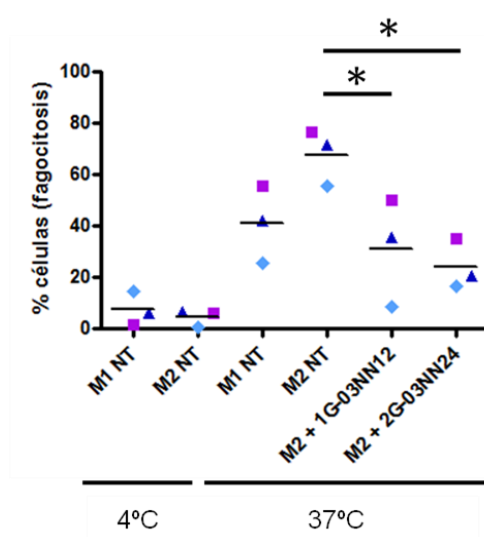


Figura 47. Cuantificación de la capacidad fagocítica de los macrófagos. Se muestra el porcentaje de M1 (M1 NT) y de M2 (M2 NT) sin tratar que fagocitaron *E.coli* a 4°C. A 37°C se indican los M1 (M1 NT) y M2 (M2 NT) sin tratar, los M2 tratados con el dendrímero de primera generación (M2+1G-03NN12) y con el de segunda generación (M2+2G-03NN24). Se muestran los datos individuales de tres donantes y la media. * $p < 0.05$

Como se observa en la [figura 47](#), ambos dendrímeros fueron capaces de disminuir la funcionalidad de los M2, indicando que los dendrímeros podrían cambiar el estado de polarización de los macrófagos M2 hacia un estado de macrófago M1.

e) Adquisición de nuevas funciones de los macrófagos de tipo M2

El siguiente objetivo fue realizar un ensayo de funcionalidad basado en una propiedad específica de los M1. Una de las propiedades definitorias de los macrófagos polarizados hacia un estado M1 es la capacidad de inhibir el crecimiento de las células tumorales [243]. Se realizaron experimentos de inhibición del crecimiento de células tumorales. Se trataron los M2 con los dendrímeros 1G-03NN12 o 2G-03NN24 durante 24 horas, y posteriormente se recogieron los sobrenadantes de los cultivos. Estos sobrenadantes se diluyeron a $\frac{1}{2}$ para cultivar la línea celular tumoral K562. La proliferación de la K562 se analizó tras cultivarlas con el sobrenadante diluido durante 72 horas por recuento de células viables en el citómetro de flujo. Los dos dendrímeros tuvieron un efecto sobre los M2 modificando la liberación de factores solubles que afectaron significativamente a la proliferación de las células K562. El dendrímero 2G-03NN24 inhibió la proliferación de las células K562 del mismo modo que los sobrenadantes de los M1 ([figura 48](#)).

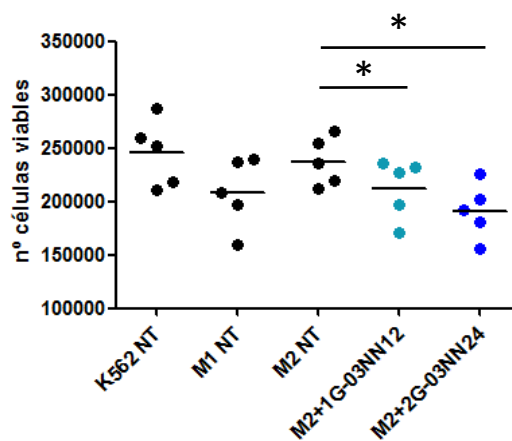


Figura 48. Proliferación de las células K562. Se indica el número de células viables sin tratar (K562 NT), tratadas con sobrenadante de M1 (M1 NT), con sobrenadante de M2 (M2 NT) y tratadas con sobrenadante de M2 que previamente habían sido tratados con los dendrímeros de primera (M2+1G-03NN12, azul celeste) y de segunda generación (M2+2G-03NN24, azul). Se muestran los datos individuales de cinco donantes (puntos) de M2 y la media (barra). * $p < 0.05$

El posible cambio de macrófagos tipo M2 a macrófagos tipo M1 biológicamente es relevante. Los M1 tienen la capacidad de secretar activina A [246], proteína responsable de inhibir el crecimiento de células tumorales [220, 226, 290], y en concreto de las K562 [89]. Además, se ha descrito que la proteína activina A induce la expresión de genes relacionados con la polarización de los M1, como *SERPINE1* e inhibe la expresión de *FOLR2* [246]. Debido a que *SERPINE1* y

FOLR2 eran dos de los genes modificados por el dendrímero 2G-03NN24, y que además se observó una tendencia en la inhibición del crecimiento de las células tumorales, se estudió si este cambio se podría deber a la liberación de activina A por parte de los M2 inducida por el dendrímero 2G-03NN24. En la **figura 49** se observa que ninguno de los dos dendrímeros aumentó la expresión de activina A por parte de los M2 a las 24 horas de tratamiento. Sin embargo, continuamos con el dendrímero 2G-03NN24 para estudiar sus efectos sobre los M2 con mayor profundidad.

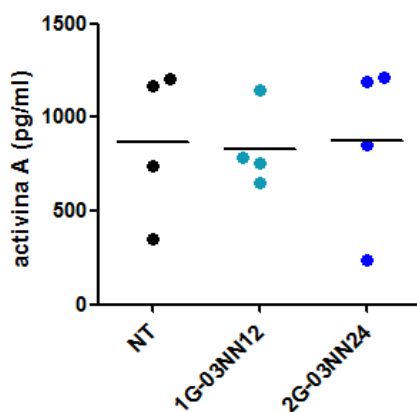


Figura 49. Cuantificación de activina A secretada por los macrófagos M2. Se muestra la liberación de activina A de los M2 sin tratar (NT) y tratados con los dendrímeros 1G-03NN12, (azul celeste) y 2G-03NN24 (azul). Cada punto representa el valor de un donante, y se muestra la media (barra).

f) Fosforilación de quinasas y de sus proteínas diana en los macrófagos de tipo M2

El análisis de los perfiles de fosforilación de quinasas y de sus proteínas diana es esencial para la comprensión de cómo las células reconocen y responden a los cambios en su entorno. Con el objetivo de analizar mediante qué rutas metabólicas el dendrímero 2G-03NN24 podría modificar a los macrófagos M2, se realizó un *array* de fosfo-quinasas, que permitió detectar simultáneamente los valores relativos de 43 sitios de fosforilación de distintas quinasas y de 2 proteínas totales relacionadas con las quinasas.

En la **figura 50**, tomando como punto de corte ± 2 veces de inducción, el dendrímero 2G-03NN24 no aumentó los valores de fosforilación de ninguna de las proteínas analizadas, sin embargo disminuyó la fosforilación en 17 de ellas, como en AKT, β -CATENINA (beta-catenina), CREB1 (*CAMP responsive element binding protein 1*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*), ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases 1 and 2*), FAK (*focal adhesion kinase*), HCK (*hemopoietic cell kinase*), HSP27 (*heat shock protein 27*), LCK (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), MSK1/2 (*mitogen- and stress-activated protein kinase 1 and 2*), p27 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), p38 α , PDGFRB (*platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide*), STAT3 en dos aminoácidos (S727 y Y705), STAT5A, STAT5B, MTOR (*mammalian target of rapamycin*) y YES (*yamaguchi sarcoma viral oncogene*).

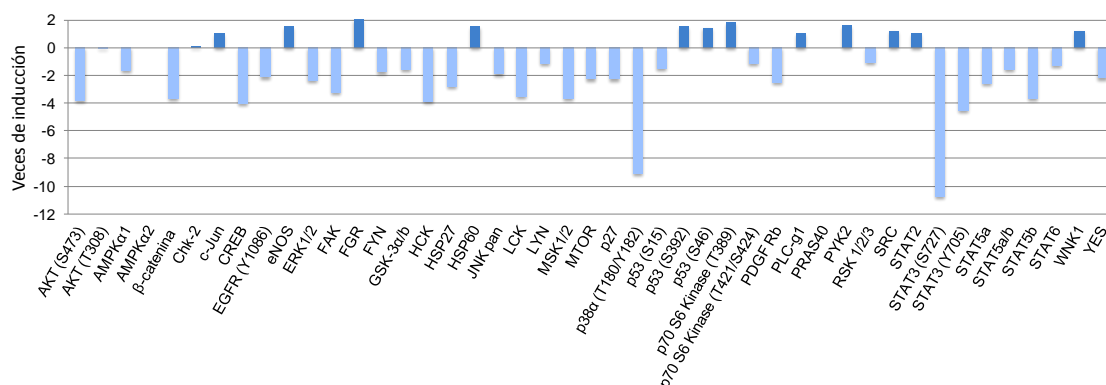


Figura 50. Resultados de la fosforilación de quinasas y de sus proteínas diana en los macrófagos M2.

Se muestran los valores relativos de fosforilación de las proteínas indicadas, referidos a la fosforilación en los M2 sin tratar. Se indican los valores de las veces de inducción calculados a partir del log ratio (M2 tratados con 2G-03NN24/M2 sin tratar). Datos analizados con el programa GenePix Pro 7. Resultados de un experimento.

El siguiente paso fue evaluar si estas proteínas estaban relacionadas entre ellas o si pertenecían a vías de activación distintas. Con el objetivo de estudiar si existía alguna relación entre las proteínas modificadas por el dendrímero se realizó un estudio de redes de asociaciones entre proteínas utilizando el programa String 9.05. En la **figura 51** se muestran las interacciones existentes entre las proteínas que se modificaron por efecto del dendrímero 2G-03NN24. La asociación entre proteínas se calculó teniendo en cuenta el *score* de datos experimentales (líneas de color rosa) y de las asociaciones en bases de datos (líneas de color azul) como pruebas que sugerían un vínculo funcional. Todas las proteínas modificadas por el dendrímero 2G-03NN24 resultaron tener asociaciones con valores de *score* de 0.4 o superiores (**figura 51A**), sin embargo, al restringir los valores aceptables hasta un *score* de 0.9, HSP27 (*HSPB1*) no se asoció con ninguna proteína (**figura 51B**).

En la **figura 51** se muestra el nombre de los genes que codifican para las proteínas estudiadas, los casos en que los genes reciben un nombre distinto a la proteína que codifican son: la proteína AKT que se indica como *AKT1*, β-catenina (*CTNNB1*), FAK (*PTK2*), HSP27 (*HSPB1*), MSK1/2 (*RPS6KA5*), ERK1/2 (*MAPK1*, *MAPK3*), p27 (*CDKN1B*), p38α (*MAPK14*), PDGFR (*PDGFRB*) y YES (*YES1*). Las proteínas que tuvieron una modificación mayor con el dendrímero 2G-03NN24 fueron STAT3 y p38α (también conocida como MAPK14), que se encuentran en posiciones centrales en los análisis de asociación (**figura 51**).

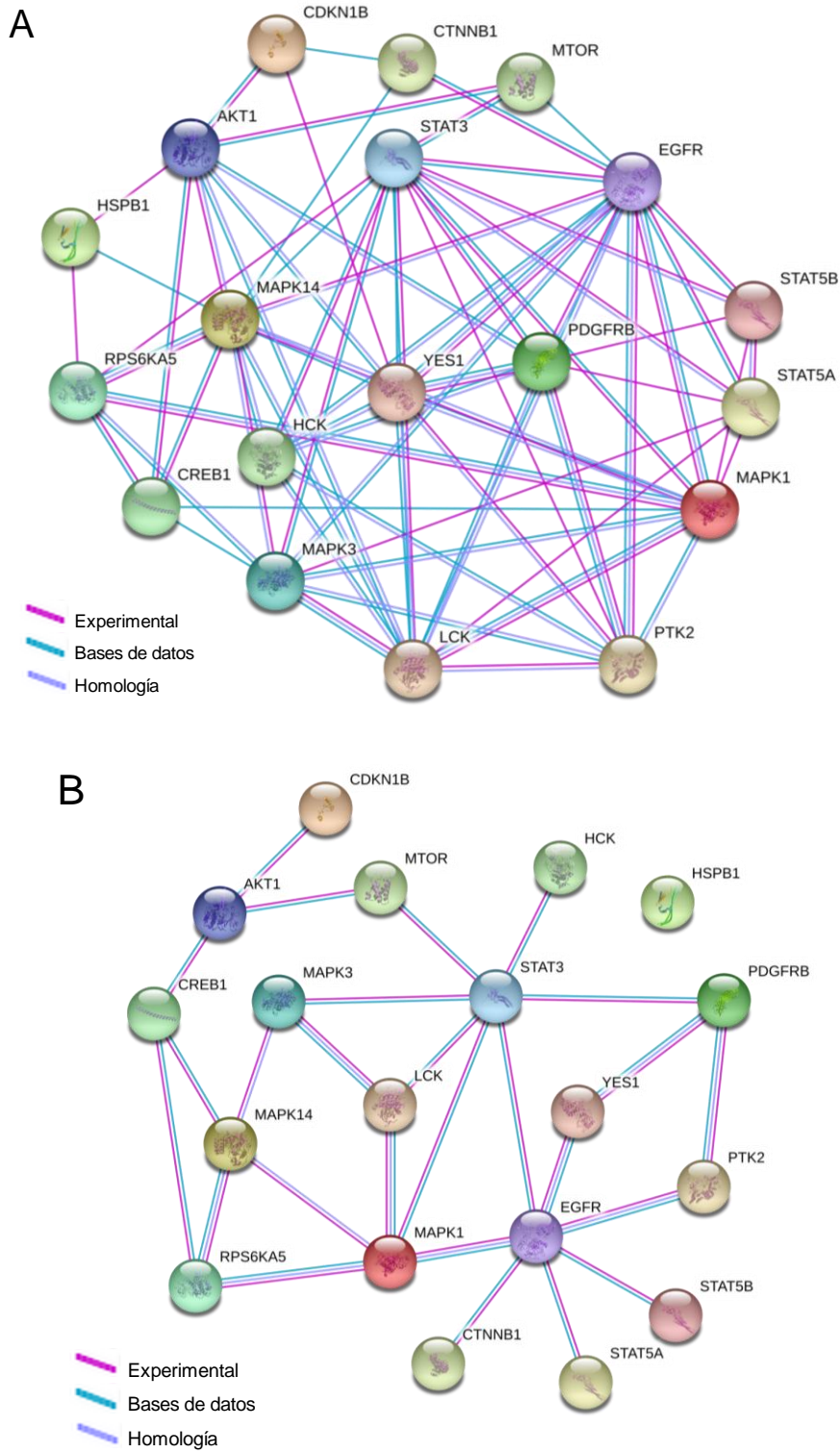


Figura 51. Representación de las asociaciones entre proteínas. Se muestran las asociaciones basadas en evidencias de datos experimentales (rosa), en evidencias de las bases de datos (azul), o las asociaciones debidas a la homología existente entre ambas proteínas (gris). Se indican las asociaciones a partir de un *score* de 0.4 (*medium confidence*) (A) y de 0.9 (*highest confidence*) (B).

g) Efectos del dendrímero 2G-03NN24 sobre los TAM en un modelo murino

Una vez determinados los cambios fenotípicos y funcionales que el dendrímero 2G-03NN24 producía sobre los M2 que se utilizaron como modelo de TAM, se estudió si el dendrímero podría modificar de igual modo a los TAM en un modelo murino.

Para ello se utilizaron ratones C57BL/6 de 8 semanas, y se les indujo la formación de un tumor sólido mediante la inyección subcutánea de células MC38. Tres días después de la inoculación de las células tumorales se trataron los ratones con el dendrímero 2G-03NN24 a 15 μM peri-tumoralmente. Este tratamiento se repitió cada 24 horas durante 18 días. Durante este período de tiempo se evaluó el crecimiento del tumor mediante mediciones del tamaño de la masa tumoral cada 24 horas. Los ratones tratados con PBS que se utilizaron como control, 21 días después de la inyección de las células MC38 tenían tumores de hasta 195 mm^3 (negro), mientras que el tamaño de los tumores de los ratones tratados con el dendrímero 2G-03NN24 fue menor, llegando a los 150 mm^3 (azul) (figura 52). Los días 8, 9, 15 y 16 post-inyección del dendrímero, no se realizaron mediciones del tamaño del tumor.

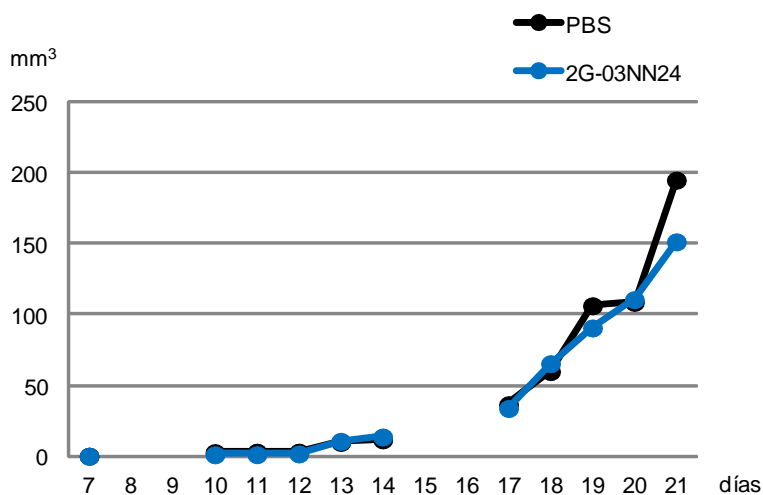
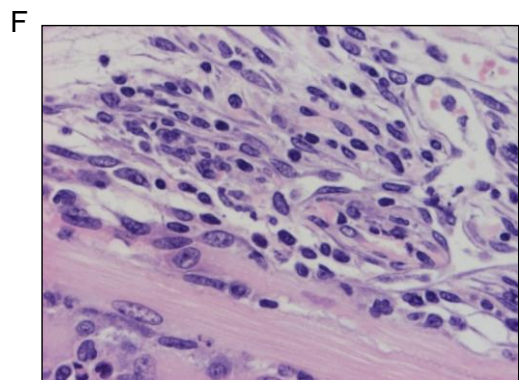
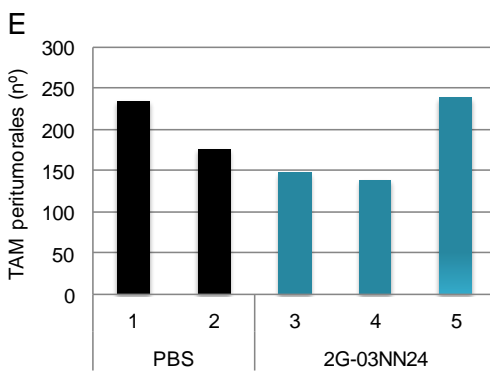
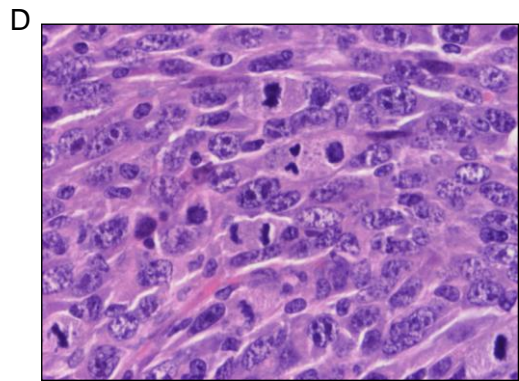
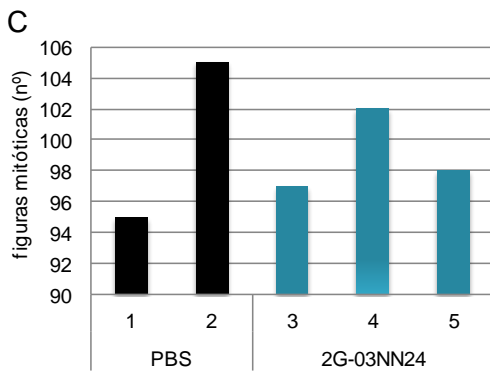
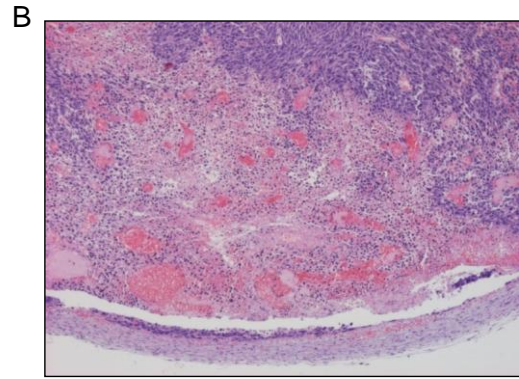
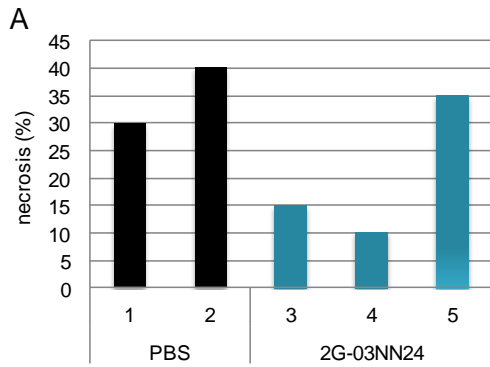


Figura 52. Medición del tamaño de los tumores en ratones C57BL/6. Se muestran las medidas diarias promedio de los ratones C57BL/6 tratados con PBS como control (PBS, negro) y tratados con 2G-03NN24 (2G-03NN24, azul). Se indica el valor promedio de 5 ratones control y de 5 ratones tratados.

Se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores de dos ratones control y de tres ratones tratados para realizar estudios histológicos y celulares. En la figura 53A se observa que dos de los tres ratones tratados con el dendrímero 2G-03NN24 (azul, 3 y 4), tenían un porcentaje de necrosis menor que los ratones control (negro, 1 y 2). En la figura 53B se muestra una fotografía del perímetro de un tumor donde se observó una zona necrosada. Respecto al número de figuras mitóticas, se encontró mucha dispersión entre los dos ratones control (figura 53C), por lo que no se pudo concluir si el dendrímero modificaba la proliferación de las células tumorales. Por otro

lado, dos de los ratones tratados con el dendrímero 2G-03NN24 presentaron un menor número de macrófagos peritumorales (**figura 53E**), y los tres ratones tratados tuvieron un número menor de vasos sanguíneos en el interior del tumor (**figura 53G**).



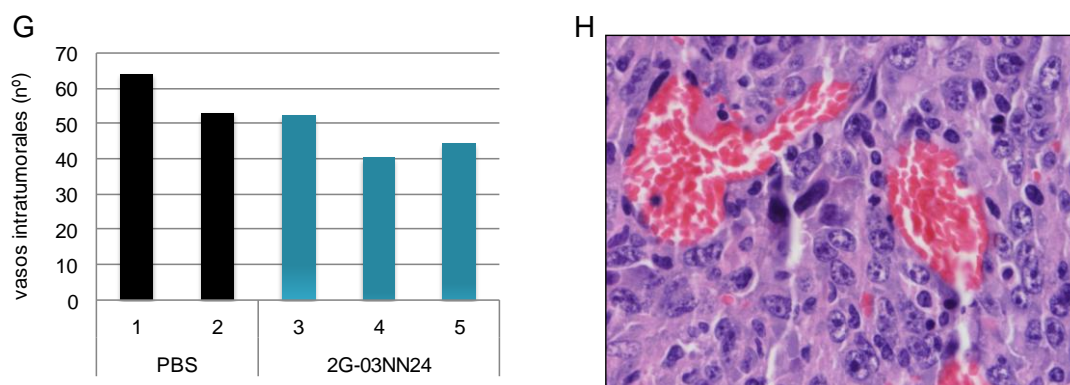


Figura 53. Estudios histológicos y celulares de los tumores. Se muestran los parámetros evaluados de dos ratones control (PBS, negro) y de tres ratones tratados con el dendrímero 2G-03NN24 (2G-03NN24, azul). **(A)** Se indica el porcentaje de necrosis de la superficie del tumor en las secciones examinadas. **(B)** Se muestra una fotografía de una zona peritumoral necrosada. **(C)** Se indica el número de figuras mitóticas totales en 10 campos de 40 aumentos (160 μm x 119 μm) para cada uno de los ratones. **(D)** Se muestra una fotografía de células donde se observan figuras mitóticas. **(E)** Se indica el número de macrófagos peritumorales (TAM peritumorales) contados en 10 campos de 40 aumentos (160 μm x 119 μm). **(F)** Se muestran macrófagos peritumorales. **(G)** Se indica el número de vasos intratumorales presentes en 10 campos distintos de 40 aumentos (160 μm x 119 μm) en cada uno de los ratones.

Se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores de dos ratones control y de dos ratones tratados para realizar criocortes y marcar las distintas poblaciones de TAM mediante inmunofluorescencia. Posteriormente, se analizaron los tumores por microscopía confocal.

Se utilizó DAPI para marcar los núcleos celulares (azul), F4/80 para marcar los macrófagos (rojo) e iNOS para marcar los TAM de tipo M1 (verde). En la [figura 54](#) se observa que los ratones tratados con el dendrímero 2G-03NN24 aumentaron la expresión de iNOS (3ª columna, verde). El aumento de expresión de iNOS colocó parcialmente con el marcaje de F4/80 (4ª columna, amarillo), indicando que el dendrímero estaba promoviendo la expresión de iNOS por parte de los TAM. Sin embargo, se observó que había células positivas para iNOS pero negativas para la expresión de F4/80 (4ª columna, verde), indicando que el dendrímero estaba induciendo la expresión de iNOS por parte de otras poblaciones celulares además de los TAM.

Como se observa con los marcajes de inmunofluorescencia ([figura 54](#)), el dendrímero estaba induciendo la expresión de iNOS en otras poblaciones celulares que eran F4/80 negativas. Este dato podría indicar que las células tumorales MC38 fueran las que estaban expresando iNOS tras el tratamiento con el dendrímero.

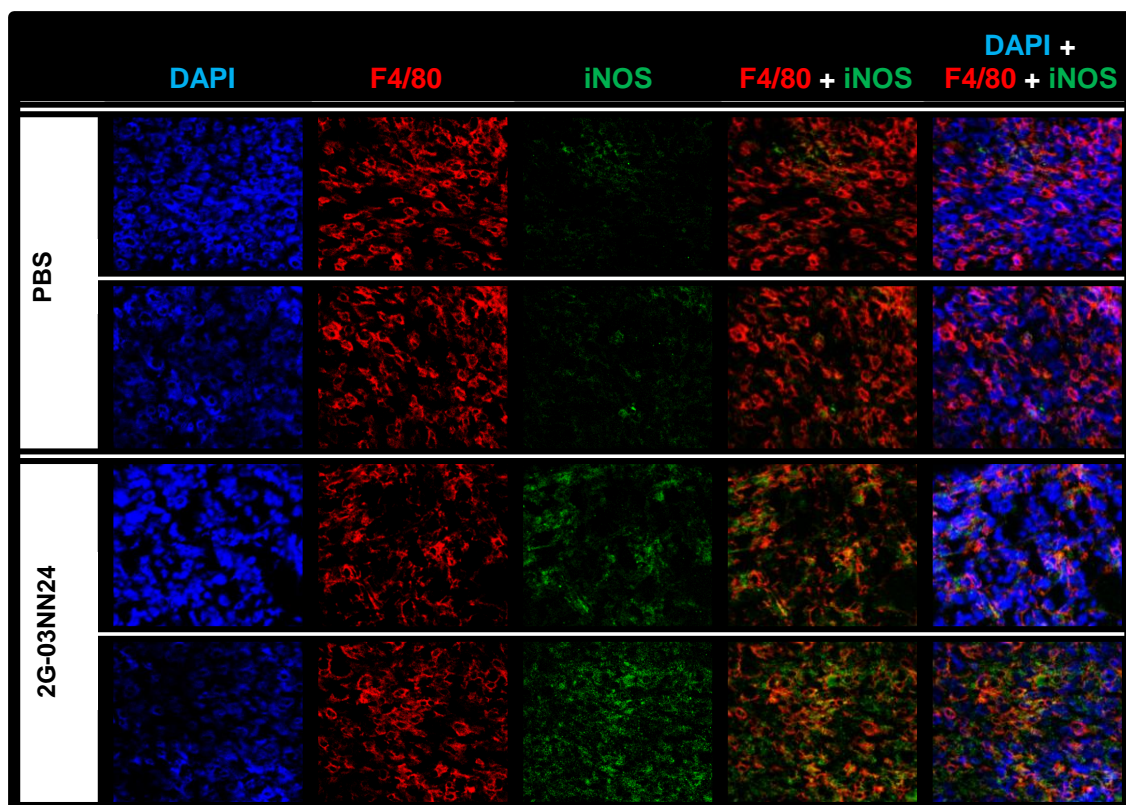


Figura 54. Inmunofluorescencia de los TAM. Se muestran los resultados de dos ratones tratados con PBS y de dos ratones tratados con 2G-03NN24. Se indica el marcaje de los núcleos con DAPI (azul), el marcaje de macrófagos con F4/80 (rojo) y de iNOS (verde). En las dos columnas de la derecha se muestran los resultados de la superposición de los marcajes indicados.

Para confirmar o descartar esta hipótesis, se realizó un marcaje de iNOS en las células MC38 sin tratar y tratadas durante 24 horas con el dendrímero 2G-03NN24. Para establecer los parámetros de adquisición del citómetro de flujo, se utilizaron las células RAW 264.7 γ NO(-), macrófagos murinos que expresan iNOS de un modo inducible. En la **figura 55** se muestra la expresión de iNOS en las células RAW sin tratar (**figura 55A**) y tratadas con LPS e IFN γ como control positivo para inducir la expresión de iNOS (**figura 55B**). Se observó que la inducción de iNOS alcanzó valores superiores al 90% cuando se trataron con LPS e IFN γ (**figura 55B**). Por otro lado, se observó que de un modo basal las células MC38 expresaban iNOS en un 32.32% (**figura 55C**), mientras que cuando se trataron con el dendrímero 2G-03NN24 la expresión se redujo más del 50%, observando sólo un 15.31% de células positivas (**figura 55D**). Por lo tanto no se podía descartar que una parte de la señal positiva de iNOS observada en inmunofluorescencia perteneciera a las células MC38 ya que de forma basal expresan iNOS. Además, se puede suponer que el aumento de iNOS observado en las células tumorales por inmunofluorescencia no se debía a un efecto directo del dendrímero sobre estas células, aunque sí podría afectarles de un modo indirecto modificando en microambiente tumoral.

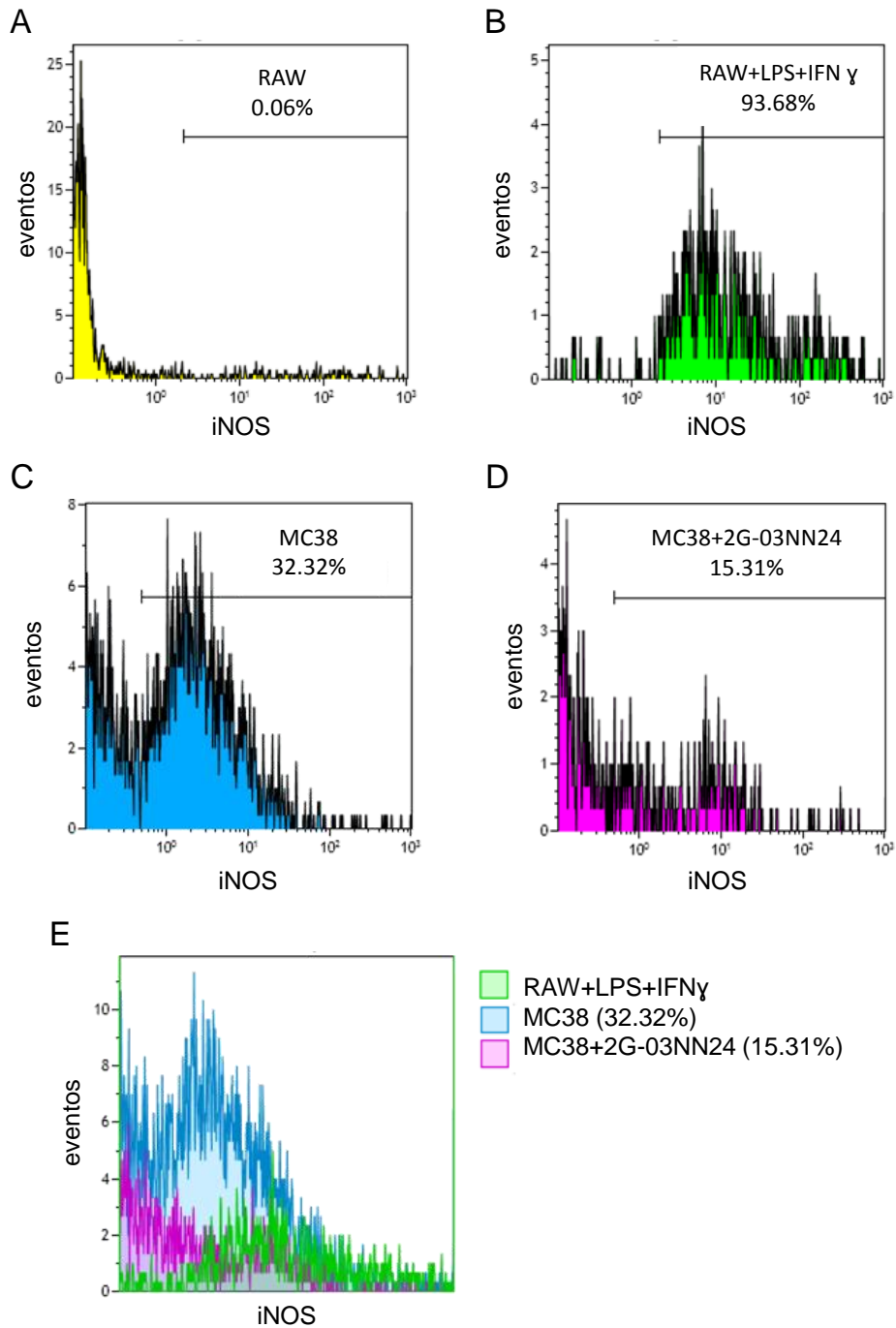


Figura 55. Cuantificación de la expresión de iNOS en las células RAW y MC38. Se muestra la intensidad de fluorescencia de iNOS de las células RAW sin tratar (A) y tratadas con LPS+IFN γ (B), así como de las MC38 sin tratar (C) y tratadas durante 24 horas con el dendrímero 2G-03NN24 (D). (A-D) Se indica el porcentaje de células positivas para la expresión de iNOS. (E) Se muestra el *overlay* de las condiciones analizadas en (B), (C) y (D).

5. Discusión

5.1. DESREGULACIÓN DE LAS CÉLULAS B POR EL VIH-1

El objetivo de este estudio fue determinar si las partículas del VIH-1 por sí solas podrían afectar al fenotipo y propiedades de las células B primarias humanas, y establecer cuál sería el mecanismo de desregulación inducido por el VIH-1.

Se ha descrito que la activación de las células B en la infección por el VIH-1 se debe esencialmente a la presencia de CD40L en la superficie de las partículas virales [169], la cual se incorpora a la envoltura de la partícula viral cuando el VIH-1 sale de la célula infectada. Para determinar si los efectos observados en las células B se debían a la presencia de esta molécula en el VIH se analizó la presencia de CD40L en las células utilizadas para producir el virus, llegando a la conclusión de que las partículas virales VIH-1 generadas en las células MT-2 no contenían CD40L en su superficie. Además, el virus se trató con suero neutralizante anti-VIH-1 que bloquea los epítomos del virus, por lo que se puede concluir que el virus mediante su unión a receptores celulares es capaz de desregular las células B de manera independiente de CD40L. Sin embargo, cabe la posibilidad de que otras proteínas presentes en la superficie del VIH-1 estén jugando un papel relevante en la desregulación de las células B.

El modelo de activación de las células B utilizado en esta Memoria está libre de células T, por tanto los procesos de activación, proliferación y diferenciación observados podrían estar relacionados con la estimulación Ag independiente como ya se ha descrito *in vitro* por otros autores [155, 254, 258]. Los resultados muestran que además de la rápida activación de las células B, las partículas del VIH-1 inducen una desregulación del fenotipo de estas células, promoviendo la pérdida de las células CD27+. Estudios realizados por otros autores demuestran que los pacientes infectados por el VIH-1 presentan una pérdida en el porcentaje de las células CD27+ memoria y un aumento de CD27- vírgenes o *naive* [53, 54, 67]. Por tanto, los resultados presentados explicarían esta pérdida de células memoria mediante el efecto directo del virus sobre el fenotipo y sobre la cantidad de células B CD27+. Sin embargo, cabe indicar que investigaciones más recientes han demostrado que el marcador de superficie CD27 utilizado para diferenciar las células vírgenes de las células B memoria debería ser cuestionado, ya que se ha descrito que las células B CD27- en pacientes seropositivos pueden sufrir procesos de CSR y SHM durante la infección crónica, mecanismos hasta ahora solamente descritos en células CD27+ memoria [41]. Además, en la infección crónica por el virus de la hepatitis C se ha demostrado que la población de células B CD27- se incrementa en sangre periférica en los pacientes con infección persistente. Esta descripción de una pérdida de las células B memoria (CD27+) se debía en realidad a la pérdida de la expresión del marcador CD27 en la superficie de las células B, y no a una pérdida de la población celular [218]; indicando por lo tanto que la pérdida de la expresión de CD27 no conlleva la pérdida de la población memoria. El modelo de cultivo de células B estimuladas por el VIH-1 *in vitro*

presentado en esta Memoria podría permitir el estudio del fenotipo y de las funciones de estas nuevas subpoblaciones descritas en pacientes seropositivos. Otros experimentos complementarios permitirían determinar si la pérdida de algunas subpoblaciones de linfocitos B se debe a la disminución de los marcadores de superficie o si se debe a una proliferación selectiva de algunas subpoblaciones junto a la disminución de otras. Finalmente, sería interesante verificar si estas subpoblaciones conservan sus funciones.

Las células B estimuladas con el VIH-1 aumentaron la expresión de CD71 y de CD69, junto con la expresión del mRNA de AID. Estos resultados indican que las células B estimuladas con el VIH-1 se modificaron fenotípicamente para ser similares a las células B del centro germinal (CG), puesto que las células B del CG se describen como células que expresan CD71 al mismo tiempo que AID [135]. Los CG se localizan dentro de los órganos linfoides secundarios donde los linfocitos B maduros proliferan, se diferencian, y donde se producen los mecanismos de CSR y SHM durante la respuesta inmune normal frente a una infección. Estos mecanismos están altamente regulados y su desregulación está implicada en muchas enfermedades inmunes [291, 295]. En el modelo utilizado, la similitud de las células B tratadas *in vitro* con las células B de CG se debía exclusivamente al VIH-1 y no estaba asociada al tratamiento con CD40L e IL-4. Además, las células expuestas al VIH-1 promovieron los mecanismos de CSR, y se detectó la expresión de IgG, IgE e IgA. En el modelo utilizado se detectó especialmente la expresión de IgE intracelularmente y en el sobrenadante de las células B estimuladas por el VIH-1. Normalmente, cada una de las Igs se expresa en respuesta a un factor de estimulación concreto. El aumento de IgE descrito en las células B tratadas con VIH-1 concuerda con los resultados observados en pacientes VIH-1 donde se ha descrito que producen IgE e IgG no específicas. Estos pacientes pueden desarrollar una hiperinmunoglobulinemia de tipo E y G, enfermedades autoinmunes o procesos de hipersensibilidad [68, 181, 289], por lo que podrían ser incapaces de responder correctamente a infecciones posteriores, disminuyendo la función de las células T y produciendo Acs autoreactivos. En resumen, la producción de IgE inespecífica y la desregulación de los mecanismos de CSR y SHM fuera del ámbito del CG podría promover el desarrollo de células B malignas (por la hiperexpresión de la proteína AID y por su papel mutagénico), auto-reactivas o anérgicas; y el VIH-1 por si solo puede inducir estos mecanismos.

Estudiando el mecanismo de la desregulación de las células B, se demostró que la estimulación con el VIH-1 aumentó la fosforilación de las dos isoformas de JNK y de la posición Y323 de SYK tras 30 minutos de estimulación, aunque no modificó la fosforilación de Y525 y Y526 de SYK. La activación de CD71 y CD69 producida por el tratamiento con el VIH-1 se inhibió mediante los inhibidores de JNK (1, 2 o 3) y de SYK. A pesar de que no se revirtió la fosforilación de SYK cuando se trató con el inhibidor específico ER27319, su actividad sí estaba siendo bloqueada. Moriya K *et al.*, mostraron que dependiendo del método de activación, este inhibidor no

impide la fosforilación de SYK, ya que actúa uniéndose a una región particular de SYK e impide su unión al BCR y la subsecuente cascada de señalización [182]. Por otra parte, la fosforilación de JNK fue dependiente de la inhibición de SYK, demostrando que la movilización de SYK/BCR tiene como consecuencia la activación de JNK. Además, la expresión del mRNA de AID después de la estimulación por el VIH-1 se revirtió total o parcialmente con los inhibidores de JNK y de SYK. Estos resultados mostraron que la activación detectada mediante CD71 y CD69, y la sobreexpresión de AID se inducen por las mismas vías de señalización. Se sugiere que el VIH-1 actúa mediante la movilización del BCR, puesto que la proteína SYK está exclusivamente relacionada con el BCR, y que la activación de JNK detectada podría ser subsecuente a la movilización del BCR (figura 56).

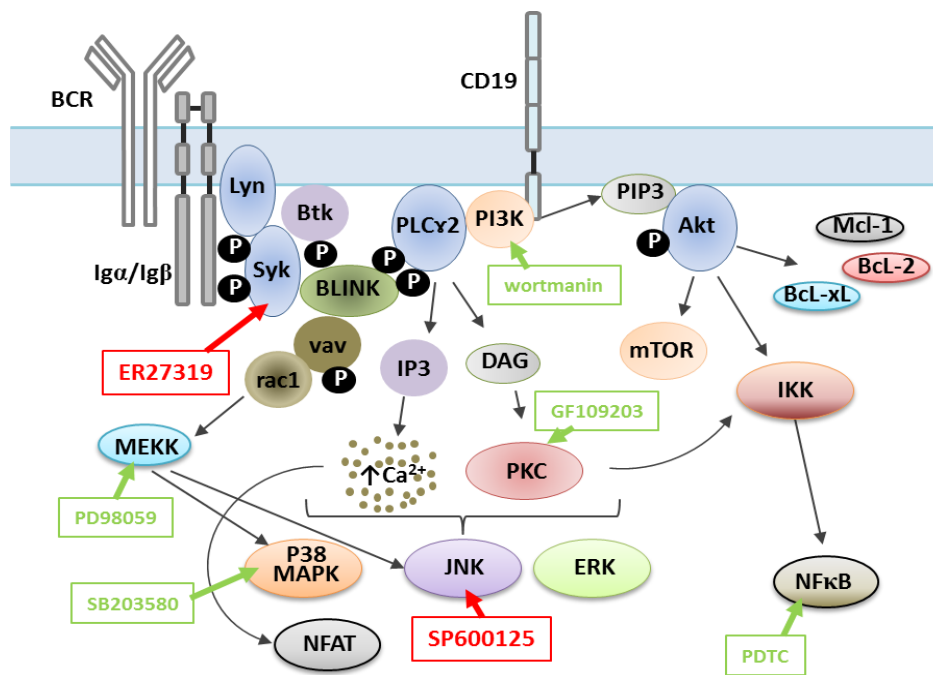


Figura 56. Esquema de la señalización en las células B después de la activación del BCR. Las flechas y los cuadros en rojo corresponden a los inhibidores y a sus proteínas diana que revierten el efecto del VIH-1. Las flechas y los cuadros en verde corresponden a los inhibidores y a sus dianas que no tienen un papel en la estimulación por el VIH-1. Adaptada de Choi *et al.* [50].

Sin embargo, normalmente durante la activación de las células B y para finalizar el proceso hasta la producción de Igs específicas, la activación por el BCR debe ir seguida por una señal secundaria, como las citoquinas IL-4, TGF- β o IFN- γ . La utilización del suero anti-VIH-1 que revirtió la activación de las células B, planteó la opción de que el virus por si solo era capaz de inducir estas señales de activación sin necesidad de otra señal secundaria. De este modo, se puede suponer que el VIH-1 era suficiente para inducir también la segunda señal necesaria, que no ha sido caracterizada en esta Memoria. Sin embargo, no se puede excluir que el virus podría llevar en su superficie otras proteínas celulares que permitían la expresión de la proteína AID o la activación de las células B (CD71 y CD69). Varios marcadores de superficie de las células B, como CD19, CD21,

CXCR4, CD40 o TLR podrían unirse al VIH-1 [120, 169, 180]. Previamente, se ha descartado el CD40L como molécula responsable, por tener un efecto diferente al VIH-1 en nuestro modelo. Igualmente, la utilización de AMD3100 (que inhibe la señalización por CXCR4) no revirtió el fenotipo de la activación celular inducida por el VIH-1. Por otro lado, como se muestra en la [figura 56](#), la vía de activación de CD19 está relacionada con la proteína PI3K, y la utilización de un inhibidor específico de la vía PI3K no revirtió el fenotipo de las células B activadas por el VIH-1. De manera preliminar se puede excluir que los receptores CXCR4 y CD19 sean responsables de la activación de las células B por el VIH-1.

Las células B activadas por el VIH-1 muestran un fenotipo parecido a las células B de CG como se ha descrito anteriormente, donde los mecanismos de SHM y CSR están activos. El proceso de CSR también se puede inducir por un estímulo independiente de las células T fuera de los CG, como por la activación dual del BCR y TLR (TLR1/2, TLR4, TLR7 o TLR9) [216, 247]. Uno de los marcadores de la señalización de la vía de los TLR es la fosforilación de p38 [247], sin embargo la utilización del inhibidor de la fosforilación de p38 no revirtió las señales observadas por la activación del VIH-1 o por la expresión del mRNA de AID.

Finalmente, no se puede excluir que CD21 o DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) tengan un papel en la estimulación de las células B por el VIH-1. Sería interesante estudiar CD21 porque se conoce poco su papel en las células B durante la infección y porque se ha encontrado unido al virus en pacientes seropositivos, aunque esta unión no se relacionó con una disfunción de las células B [180]. En estudios descriptivos y en pacientes seropositivos se ha asociado la pérdida de CD21 con el agotamiento del compartimiento de las células B [237]. Sería atractivo postular que la unión del virus con CD21, aunque no indujera la estimulación celular, podría ser lo suficientemente estable en el tiempo para que el virus promoviera la agregación del BCR que permite la cascada de señalización. Esto podría explicar la activación específica de las células CD21+ y su subsecuente agotamiento a lo largo del tiempo. Por otro lado, tampoco se puede excluir que otras proteínas de la superficie del virus tengan un papel en la estimulación de las células B. Sin embargo, los resultados presentados en esta Memoria son relevantes porque demuestran que en ausencia de células T CD4+ y de CD40/CD40L, las partículas virales activan a las células B mediante el BCR, lo que podría contribuir a la desregulación del sistema inmune general descrita en pacientes VIH-1. Este mecanismo de desregulación también podría explicar por qué hay una respuesta humoral tan elevada después de una inmunización con partículas lentivirales [93].

El modelo *in vitro* propuesto permite estudiar los mecanismos de la pérdida de especificidad de la inmunidad humoral que se ha descrito en pacientes VIH-1 de un modo independiente a las células T. En general, la activación celular de las células B con la subsecuente producción de IgM, IgD o IgG, determina el alcance y la eficacia de la respuesta humoral, lo que requiere multitud de

señales, entre ellas la movilización del BCR, la estimulación por CD40 o citoquinas. Utilizando el modelo desarrollado en esta Memoria, libre de células T CD4+ y de CD40L, se puede estudiar la activación mediante otras señales de las células B en el futuro.

La desregulación de la respuesta humoral es en parte responsable de la falta de respuesta frente a las infecciones oportunistas en el paciente VIH+ y es de gran importancia entender los mecanismos de esta desregulación para dirigir las futuras estrategias en el desarrollo de vacunas. Aunque varios trabajos trataron de determinar los motivos de esta desregulación, todavía no se han descrito los mecanismos responsables. Los resultados mostrados en esta Memoria demuestran que el VIH-1 *per se* y de forma directa produce una desregulación del fenotipo y de la función de las células B que podría explicar esta desregulación de la respuesta humoral.

5.2. ESTUDIO DE LOS DENDRÍMEROS 2G-NN16 Y 2G-03NN24 COMO AGENTES TRANSFECTANTES EN LINFOCITOS T CD4

El objetivo de este estudio fue comparar dos dendrímeros catiónicos de segunda generación que tienen en su estructura enlaces Si-O, pero con distinto núcleo. Se evaluó el dendrímero de nueva síntesis de núcleo polifenólico 2G-03NN24 [234] y el dendrímero 2G-NN16 derivado de un núcleo de silicio [202] en su capacidad como transfectantes en linfocitos T CD4 primarios.

El efecto antiviral sostenido de un RNA de interferencia (RNAi) frente a la infección crónica del VIH se puede lograr mediante el uso de terapia génica [146, 209]. Sin embargo, las células susceptibles de ser infectadas por el VIH, como los linfocitos T CD4, son muy difíciles de transfectar. Para superar las dificultades inherentes a la transfección en este tipo de células, se han utilizado técnicas como la nucleofección o Acs con proteínas fusionadas [208, 294]. Como una nueva aproximación en el tratamiento de la infección por el VIH-1 se utilizaron dendrímeros catiónicos como transfectantes. Se estudió el efecto de transfección con un siRNA-Nef para bloquear la expresión de la proteína viral NEF en los linfocitos T CD4, puesto que son las células diana por excelencia del VIH-1. Las concentraciones citotóxicas de ambos dendrímeros fueron similares, indicando que la viabilidad de los linfocitos T CD4 no dependía de las características del núcleo ni del número de grupos terminales de los dendrímeros, a diferencia de los resultados observados en los macrófagos como se comentará en el siguiente apartado. El dendrímero 2G-03NN24 formó dendriplexes en menos de 30 minutos, estos fueron estables al menos hasta las 5 horas, y liberaron completamente el siRNA en menos de 24 horas; indicando que podría ser tiempo suficiente para que el siRNA consiguiera salir de los endosomas, evitando así su degradación. Los resultados mostraron que tanto la formación de los complejos, como la protección del siRNA frente a la RNAsa por parte del dendrímero y la liberación posterior del siRNA por parte del

dendriplex 2G-03NN24/siRNA-Nef, sucedió del mismo modo que con el dendrímero 2G-NN16 [285].

Aunque ambos dendriplexes favorecieron la entrada del siRNA en los linfocitos T CD4, el dendriplex 2G-NN16/siRNA-Nef547 mostró una mayor entrada del siRNA (36%) en los linfocitos T CD4 respecto al 2G-03NN24/siRNA-Nef547 (16%). Esto podría deberse por un lado a la mayor protección y estabilidad del siRNA en el medio extracelular otorgada por el dendrímero, y por otro, a la optimización de la entrada del dendriplex en las células frente al siRNA solo. Los valores máximos de transfección conseguidos con la lipofectina o el superfect oscilan entre el 15 y el 20% [2, 187, 200], y son similares a los conseguidos con el dendrímero 2G-03NN24, y muy inferiores a los obtenidos con el dendrímero 2G-NN16 (36%). Una de las ventajas que presentan los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24 respecto a lipofectina o el superfect es que se pueden utilizar en medios con suero, por lo que podrían mantener su función en modelos *in vivo*. Aunque el dendrímero 2G-NN16 facilitó una entrada mayor de siRNA-Nef547 en los linfocitos T CD4, fue el dendriplex 2G-03NN24/siRNA-Nef el que presentó mejores resultados disminuyendo la producción de p24^{gag} por los linfocitos T CD4 infectados por el VIH hasta 4.1 veces (50% 2G-03NN24/siRNA-Nef frente al 12% siRNA-Nef). Sin embargo, la inhibición de p24^{gag} observada con el dendriplex 2G-NN16/siRNA-Nef fue 3.5 veces mayor respecto a la inhibición del siRNA solo (25% 2G-NN16/siRNA-Nef frente al 7% siRNA-Nef). La mayor entrada del siRNA por parte del dendriplex 2G-NN16/siRNA-Nef, puede deberse a la mayor flexibilidad del dendrímero 2G-NN16 frente al 2G-03NN24. El dendrímero 2G-03NN24 tiene un núcleo de benceno, que le aporta una mayor estabilidad y rigidez a la molécula, pero tiene también una estructura más abierta, lo que podría favorecer una liberación del siRNA más progresiva en el tiempo que con el dendrímero 2G-NN16, entre las 5 y las 24 horas, favoreciendo que el siRNA pudiera escapar de los endosomas antes de ser degradado en los lisosomas. Esta característica del dendrímero 2G-03NN24 es una ventaja fundamental para su uso en la liberación controlada de materiales nucleicos y de otros fármacos polianiónicos [77, 240]. Por otra parte, para complejar la misma cantidad de siRNA se utilizó menor concentración del dendrímero 2G-03NN24 (2.6 μM de 2G-NN16 y 1.8 μM de 2G-03NN24 para ratio 1:4 con 250 nM de siRNA), debido a que tienen 16 y 24 cargas positivas, respectivamente. La utilización de una cantidad menor de productos químicos induciría menor toxicidad, y tendría menos efectos adversos. Ambos dendrímeros se pueden utilizar de un modo seguro para transfectar a los linfocitos T CD4, puesto que ninguno de los dos dendrímeros indujo proliferación celular, aunque sería necesario realizar estudios complementarios para determinar otros aspectos como la expresión de moléculas de superficie, o la funcionalidad de los linfocitos T CD4.

En resumen, los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24 son potenciales vehículos no virales que podrían utilizarse en terapia génica, principalmente en el tratamiento de la infección por el

VIH-1, siendo el mejor candidato por los resultados presentados en los estudios *in vitro* el 2G-03NN24. Sin embargo, ambos dendrímeros deberían evaluarse en estudios *in vivo*.

5.3. EFECTO DE LOS DENDRÍMEROS CARBOSILANO SOBRE MACRÓFAGOS DE TIPO M1

Se estudió el efecto de distintos dendrímeros carbosilano catiónicos de nueva síntesis [234], o aniónicos [225] y catiónicos [202] con aplicaciones biomédicas definidas, en macrófagos de tipo M1.

Los estudios de viabilidad de los M1 con dendrímeros de la misma familia mostraron que las generaciones mayores tenían una toxicidad más elevada, siendo el dendrímero de tercera generación 3G-03NN48 el más citotóxico. Estos datos sugieren que el tamaño y la densidad de cargas afecta a la toxicidad celular, en concordancia con publicaciones previas [98, 127, 285]. Por otra parte, los dendrímeros derivados de núcleo polifenólico, 1G-03NN12, 2G-03NN24 y 3G-03NN48, presentaron mayor toxicidad que el dendrímero 2G-NN16 derivado de un núcleo de silicio, indicando que el núcleo juega un papel en el efecto citotóxico de los dendrímeros [234]. La mayor toxicidad se podría deber a la presencia de grupo benceno [94, 190], que a pesar de que se sustituyó dando lugar a un grupo polifenólico con menor toxicidad, presentaba un efecto más citotóxico en los M1 que el silicio.

Ninguno de los dendrímeros, aniónico, 2G-S16, o catiónicos, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24, promovieron la secreción de TNF- α e IL-12p40, citoquinas típicamente expresadas por los M1 activados con LPS [234]. Además, cuando se trataron los M1 con los dendrímeros y posteriormente se estimularon con LPS, todos los dendrímeros disminuyeron la producción de TNF- α . Sin embargo, solamente los dendrímeros catiónicos de segunda generación, 2G-NN16 y 2G-03NN24, disminuyeron la producción de IL-12p40. El hecho de que el dendrímero aniónico de segunda generación, 2G-S16, no produjera disminución de IL-12p40 indica que los M1 podrían responder de modo diferente en función de los grupos periféricos que tienen los dendrímeros. Los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 disminuyeron la producción de citoquinas proinflamatorias, por lo que podrían jugar un papel importante en enfermedades en las que se produce un incremento de citoquinas inflamatorias que al final causan lesiones tisulares debidas a la exacerbación de la función de los macrófagos de tipo M1 [63, 81, 149, 150, 171]. Los dendrímeros 2G-NN16 y 2G-03NN24 podrían utilizarse en patologías relacionadas con respuestas inflamatorias y enfermedades autoinmunes, como el rechazo de injertos [271], psoriasis [122], artritis reumatoide [160, 174] y esclerosis múltiple [147] entre otras, puesto que hay una asociación entre la producción de IL-12 e IL-23 y este tipo de patologías [61, 121, 137]. Además, el tratamiento con Acs monoclonales de IL-12p40/23 ha sido efectivo en ensayos clínicos en pacientes con

enfermedad de Crohn y psoriasis [130, 162], por lo que los dendrímeros que disminuyen IL-12p40 podrían ser posibles candidatos para estudiar su papel en estas enfermedades.

En concordancia con otros autores se ha mostrado que los macrófagos de tipo M1 secretan CCL3 y CCL4 tras la estimulación con LPS [280]. Un resultado muy importante es que los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 en ningún caso aumentaron la producción de estas quimioquinas, indicando que el tratamiento con estos dendrímeros no induciría la infiltración de células en tejido inflamado mediado por CCL3 y CCL4 en modelos *in vivo*. Además el dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la expresión del mRNA de *CCL3* y *CCL4*. Estas diferencias podrían ser debidas a los tiempos en los que se realizaron los experimentos, ya que a las 24 horas se observó una reducción de la expresión del mRNA pero no de las proteínas, indicando que a tiempos más largos, dependiendo de la vida media de las mismas, podría observarse una disminución de CCL3 y CCL4. Además, el dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la expresión de *CCL2*, quimioquina biológicamente importante al estar implicada en el reclutamiento de monocitos y linfocitos en procesos inflamatorios.

El dendrímero aniónico 2G-S16, previamente descrito como microbicida frente a la infección por el VIH, solamente modificó uno de los genes, relacionado con los M2, y redujo la expresión de TNF- α en presencia de LPS. Este dendrímero no modificó la expresión de IL-12p40 ni la capacidad funcional de los macrófagos M1 [89, 243], por lo que este dendrímero incrementó de forma relativa su valor como microbicida [52] ya que en presencia de un patógeno, por ejemplo el VIH-1, podría disminuir la expresión de TNF- α por parte de los M1 de la mucosa.

El dendrímero catiónico 1G-03NN12 disminuyó la expresión de TNF- α sin afectar a IL-12p40 y no afectó la funcionalidad de los macrófagos M1, de modo similar al dendrímero aniónico 2G-S16. Sin embargo, 1G-03NN12 disminuyó la expresión de *IL12A*, gen que codifica la IL-12p35, y de *SERPINB2*, gen típicamente expresado en los M2 que codifica PAI-2 (*plasminogen activator inhibitor-2*), proteína que impide la apoptosis inducida por el TLR4 [205]. La desregulación de *SERPINB2*, junto con diversos polimorfismos, se asocia a enfermedades inflamatorias severas [236]. Además, se ha demostrado un aumento de la expresión génica del VIH-1 en macrófagos activados de ratones *SerpinB2*^{+/+} comparado con los resultados de los ratones *SerpinB2*^{-/-} [62]. Por otro lado, se ha descrito que los pacientes infectados por el VIH-1 tienen valores altos de mRNA de *SERPINB2* en los monocitos cuando se comparan con los valores de monocitos de personas no infectadas [156], sugiriendo que como sucede en estudios con macacos, la expresión de *SerpinB2* se induce por infecciones lentivirales [156]. Estos resultados indican, que el 1G-03NN12 podría tener un efecto en el tratamiento de la infección por el VIH-1, ya que disminuye *SERPINB2*. Esto favorecería la apoptosis de las células activadas por el TLR4, hecho que ocurre en el tracto gastrointestinal de las personas infectadas por el VIH- a causa de la translocación bacteriana [35].

El dendrímero 2G-NN16 disminuyó la expresión de varios genes (*CCR2*, *CSF1*, *INHBA*, *IL12A*, *IL12B*, *COL23A1* y *SERPINB2*) junto con la represión de TNF- α y de IL-12p40, y aumentó la expresión de otros genes como *FOLR2*, *CCL2*, *STAB1* y *FOS*. Los niveles de secreción de las citoquinas y quimioquinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, CCL3 y CCL4 fueron similares a los producidos por los M1 sin tratar, y 2G-NN16 no modificó la funcionalidad de los M1. Los datos indican que este dendrímero se puede utilizar como transfectante y en terapia génica frente al VIH-1 como previamente se había descrito [285]. En resumen, el 2G-NN16 tiene un efecto ligeramente antiinflamatorio, lo que podría beneficiar si se utiliza en terapia anti-VIH ya que se ha descrito que una inflamación local permite una mejor activación celular general, lo que facilita una mejor infección por el VIH-1.

La latencia viral representa un problema significativo cuando se dirige un tratamiento frente a la infección por el VIH-1 [40, 71], y los macrófagos son uno de los reservorios celulares más conocidos de VIH-1 debido a su capacidad para capturar partículas virales y hacer sinapsis con los linfocitos T CD4 para propagar el virus [76]. Por tanto, un valor añadido del dendrímero 2G-03NN24 es que disminuyó la expresión de *CCR2*, correceptor implicado en la infección de macrófagos por aislados duales del R5/X4 VIH-1 [73, 210, 231]. Una mutación en el correceptor *CCR2* produce retraso en la progresión de la infección por el VIH-1 [123, 161], por lo que desarrollar un dendrímero que pudiera disminuir la expresión de este correceptor podría ser de gran interés a nivel terapéutico o preventivo en combinación con antirretrovirales en la infección por el VIH-1. Por otro lado, el dendrímero 2G-03NN24 aumentó la expresión de *CCR7*, receptor que se ha localizado en los macrófagos situados alrededor de los vasos linfáticos recién formados [292]. Este aumento podría tener efectos en la migración de los macrófagos, alterando los procesos de linfo-angiogénesis, aunque deben realizarse ensayos de migración para confirmar si la funcionalidad está siendo afectada por el dendrímero. Los macrófagos de tipo M1 secretan niveles constitutivos de CCL22 que se mantienen tras ser estimulados con LPS [280]; sin embargo, las CD y macrófagos aumentan la producción de esta quimioquina inducible tras la estimulación por citoquinas de tipo Th2 como IL-4 e IL13 [30], hecho similar al descrito con el dendrímero 2G-03NN24 que aumentó la expresión de CCL22. Esta quimioquina está sobreexpresada en enfermedades como la dermatitis atópica [293], donde se ha observado en las lesiones de piel una producción elevada de CCL22 [282], y juega un papel importante en el reclutamiento de las células Th2 hacia los sitios de inflamación. Sin embargo, a pesar de las modificaciones en la expresión génica causadas por el dendrímero 2G-03NN24, no modificó la capacidad funcional de los macrófagos M1.

Los resultados obtenidos con los diferentes dendrímeros en los M1 abren líneas de investigación muy prometedoras, ya que podrían utilizarse como agentes biológicamente seguros sin promover inflamación e incluso bajando ligeramente la producción de algunas citoquinas proinflamatorias en diferentes aplicaciones biomédicas.

5.4. CAMBIO DE FENOTIPO DE LOS MACRÓFAGOS M2 MEDIADO POR EL DENDRÍMERO 2G-03NN24

Los tumores están formados por distintos tipos celulares y el microambiente tumoral generado por las células que lo componen permite que el tumor pueda escapar de los sistemas de control del sistema inmune, favoreciendo respuestas antiinflamatorias e inhibiendo las proinflamatorias. La mayor parte de los TAM se asemejan a los M2, que inhiben las respuestas Th1 y Th17 y están implicados en la inducción de tolerancia, modulando los procesos de autoinmunidad, lo que favorece la progresión tumoral [279]. El objetivo principal de esta Sección ha sido utilizar los macrófagos de tipo M2 como modelo de TAM para analizar el papel que podrían tener los dendrímeros 2G-S16, 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 en las modificaciones del fenotipo y en la funcionalidad de los macrófagos de tipo M2, debido a la plasticidad de la polarización de los macrófagos. Los resultados mostraron que el dendrímero 2G-03NN24 tenía efectos en la reversión de la polarización de los M2 hacia un estado más M1, que son funcionalmente proinflamatorios y antitumorales.

Los macrófagos M2 tratados con LPS produjeron cantidades elevadas de IL-10 y poca cantidad de TNF- α e IL-12p40 coincidiendo con resultados previos de otros autores [99, 166]. El dendrímero aniónico 2G-S16 disminuyó la producción de IL-10 en los macrófagos M2 estimulados con LPS hasta niveles por debajo de los que producen los M2 en estado basal; esta disminución se mantuvo aunque los M2 se estimularan previamente con LPS. Los resultados sugieren que el dendrímero 2G-S16 podría actuar modificando la respuesta de los M2 frente al LPS a través de la modificación de la respuesta celular, ya que debido a las cargas negativas del dendrímero y del LPS se descartó la posible unión entre ambas moléculas. Por otro lado, este dendrímero aumentó la producción de IL-12p40 y no modificó la expresión de ninguno de los genes estudiados. Por este motivo se descartó como dendrímero que podría modificar el fenotipo de los M2 ([tabla 5](#)).

	Producción de IL-10 tras estimulación	Producción de TNF- α tras estimulación	Producción de IL-12p40 tras estimulación	Perfil de expresión génica	Fagocitosis	Proliferación de células K562
M2 NT	+	-	-	M2	Alta	+
M1 NT	ND	+	+	M1	Moderada	Inhiben
M2+2G-S16	Inhibida	= M2	Aumenta	= M2	ND	ND
M2+2G-NN16	Disminuye	Disminuye	= M2	-M2 -M1	ND	ND
M2+1G-03NN12	= M2	Aumenta	Aumenta	-M2	Moderada	Inhiben
M2+2G-03NN24	Disminuye	Disminuye	= M2	-M2 +M1	Baja	Inhiben

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos con los M2 tratados con los diferentes dendrímeros. ND, no determinado.

Los dendrímeros catiónicos 2G-NN16 y 2G-03NN24 inhibieron la producción de IL-10 inducida por el LPS. Este efecto podría ser consecuencia de dos mecanismos de acción de los dendrímeros: su unión al LPS por una posible interacción de cargas, disminuyendo así su efecto, o la modificación de algún mecanismo celular que bloquearía la síntesis o la liberación de IL-10. Ambos dendrímeros disminuyeron también la producción de TNF- α sin afectar a la producción de IL-12p40. El dendrímero 1G-03NN12 aumentó TNF- α e IL-12p40 por encima de los valores obtenidos con el tratamiento con LPS solo, y a pesar de que no disminuyó la producción de IL-10 de los M2 tratados con LPS, fue el único dendrímero que aumentó la secreción de las dos citoquinas proinflamatorias típicas de los M1. Estos resultados sugieren que los M2 responden de un modo distinto dependiendo del número de grupos periféricos de los dendrímeros, del mismo modo que lo hacen los M1 como se ha descrito anteriormente ([tabla 5](#)).

El dendrímero de primera generación 1G-03NN12 disminuyó la expresión de genes típicamente expresados en los M2, como *EMR1* e *IGF1*, y aumentó la expresión de *INHBA*, gen típicamente expresado por los M1. Sin embargo, el dendrímero de segunda generación, 2G-03NN24 modificó un número mayor de genes definitorios de los dos estados de polarización, disminuyendo la expresión de *EMR1*, *IGF1*, *FOLR2*, *SLC40A1* y aumentando la expresión de *INHBA*, *SERPINE1*, *FLT1*, *EGLN3* y *ALDH1A2*. Además, el dendrímero 2G-03NN24 disminuyó en mayor medida la fagocitosis que el dendrímero 1G-03NN12 (24% respecto a 31.3% de fagocitosis, respectivamente), proceso que mayoritariamente realizan los M2, y modificó de igual modo que el 1G-03NN12 a los M2 para secretar factores solubles responsables de la inhibición de la proliferación de las células tumorales K562, característica asociada con los M1. La primera y segunda generación de estos dendrímeros catiónicos, pero en mayor medida la segunda generación 2G-03NN24, parecían estar revertiendo parcialmente la polarización de los M2 hacia un estado más de tipo M1 ([tabla 5](#)).

Debido a que los mejores resultados se obtuvieron con el dendrímero 2G-03NN24, se realizaron experimentos adicionales solamente utilizando este dendrímero para confirmar en primer lugar el mecanismo por el cual podría estar actuando en los M2. El dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la fosforilación de AKT, β -CATENINA, CREB1, EGFR, ERK1/2, FAK, HCK, HSP27, LCK, MSK1/2, p27, p38 α , PDGFR, STAT3, STAT5A, STAT5B, MTOR y YES, indicando que las vías de actuación del dendrímero convergen de forma mayoritaria en la disminución de la actividad de STAT3 y que podrían iniciarse por los receptores PDGFR y EGFR.

EGFR es el receptor de EGF y de TGF- α , y está implicado en el control del crecimiento celular y diferenciación. La activación de STAT3 está mediada por la sobreexpresión de EGFR, promoviendo el crecimiento celular y la resistencia a la apoptosis de las células escamosas de cáncer de cabeza y cuello. EGFR activa a la proteína STAT3 mediante la unión entre los aminoácidos 1061 y 1123, donde se ha descrito que los residuos Y1068 y Y1086 tienen una importancia fundamental

en la unión [241]. El dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la fosforilación del residuo Y1086 de EGFR indicando que podría impedir la activación de STAT3. Una vez que las quinasas asociadas a los receptores fosforilan a STAT, estas proteínas dimerizan formando homo o heterodímeros y se translocan al núcleo donde actúan como activadores de transcripción, uniéndose a *IL-6-responsive elements* identificados en los promotores de varios genes de proteínas de la fase aguda.

Por otro lado, el dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la fosforilación de YES (proteína con expresión ubicua en todas las células de mamíferos) y HCK (que se expresa exclusivamente en macrófagos). Ambas proteínas pertenecen a la familia SRC y han demostrado ser capaces de fosforilar directamente a STAT3 [235]. Además, el dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la fosforilación de MTOR, proteína que cuando se reprime en las células T provoca la supresión de la fosforilación de STAT3 en S727 [139]. Estos resultados indican que el dendrímero 2G-03NN24 podría afectar a la activación de STAT3 mediante YES, HCK y MTOR.

Como era de esperar tras observar estos resultados, el dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la fosforilación de los residuos Y705 y S727 de STAT3. Se ha descrito que la fosforilación de S727 esta mediada por las vías dependientes de MEK, ERK y MSK1 en eritrocitos [287]. También se ha asociado la activación de STAT3 con la sobreexpresión de ERK1 en las células HEK293 (*human embryonic kidney cells 293*) [152]. El dendrímero disminuyó la fosforilación de ERK1/2 y de MSK1/2, sugiriendo que podía estar modificando a STAT mediante estas dos vías. Por otro lado, se ha localizado en el núcleo de las células cancerosas de páncreas el complejo heteromérico formado por EGFR, SRC y STAT3, y se ha descrito que se necesita la supresión de al menos dos de las tres proteínas que forman el complejo para reprimir la expresión génica [125]. El dendrímero podría tener efecto en la supresión de la expresión génica puesto que disminuyó la fosforilación de EGFR y STAT3 simultáneamente.

El dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la fosforilación de PDGFR, que es un receptor con un dominio con actividad tirosin-quinasa. En fibroblastos NIH 3T3, la mitogénesis inducida por PDGF se lleva a cabo por SRC que activa a STAT3 [33]. Aunque STAT3 se asocia con PDGFR en presencia o ausencia de PDGF, solamente se fosforila en presencia de PDGF ([284]. Por lo que 2G-03NN24 estaría impidiendo la fosforilación de STAT3 al disminuir la fosforilación de PDGFR. Los resultados indican que las diversas vías de actuación del 2G-03NN24 convergen de forma mayoritaria en la disminución de la actividad de STAT3 y se inician por los receptores PDGFR y EGFR.

La disminución de la fosforilación de STAT3, y por lo tanto de su actividad, correlaciona con los resultados obtenidos de la disminución de la liberación de IL-10 por parte del dendrímero, puesto que STAT3 se une al promotor de la IL-10, por lo que esto explicaría el mecanismo por el cual el dendrímero estaba impidiendo la secreción de IL-10. También se ha demostrado en ratones

que la represión de STAT3 aumenta la capacidad de los macrófagos para activar la respuesta citotóxica y para mejorar la presentación de Ags del tumor, lo que conduce a un aumento en la producción de IFN γ y de TNF α [49]. Además, se ha descrito en ratones una correlación entre la capacidad inmunosupresora de los TAM y una sobre-activación de la señalización de STAT3 [259]. Estos datos son muy relevantes porque muestran que el dendrímero 2G-03NN24 que actúa en la interrupción de la vía de señalización de STAT3, puede cambiar el fenotipo y la función de los macrófagos M2, dirigiéndolos hacia una vía proinflamatoria lo que implicaría un mejor pronóstico para el control del tumor. El dendrímero podría utilizarse en inmunoterapia como se ha propuesto con el ácido corosólico y el ácido oleánico, dos nuevos compuestos para la prevención y la terapia de tumores a través de sus capacidad para suprimir la polarización M2 de los macrófagos y la proliferación de las células tumorales mediante la inhibición de la activación de STAT3 y de la producción de IL-10 [90, 91].

La quinasa p38- α actúa como punto de integración de múltiples señales que se activan por citoquinas proinflamatorias y estímulos de estrés como el LPS [207, 296], lo que provoca la fosforilación de las quinasas MAPKAPK2 y MAPKAPK5 (*MAPK-activated protein kinase 2 y 5*). ERK1 y p38 α fosforilan a la quinasa MAPKAPK5 activándola [196, 197], lo que induce la fosforilación de HSP27. Por otro lado, HSP27 puede ser fosforilada también por MAPKAPK2, que se regula por la fosforilación directa de p38 α . En la representación de asociaciones mostrada en la Memoria, la proteína HSP27 no mostró tener relación directa con ninguna de las quinasas estudiadas, pero hay que destacar que no se estudiaron ni MAPKAPK5 ni MAPKAPK2, indicando que estas dos quinasas serían el vínculo de unión de HSP27 con el resto de proteínas modificadas por el dendrímero.

Se ha sugerido que la inhibición de la señalización de EGFR mediante p38 α , es una función importante de esta vía de señalización en el contexto de la supresión de tumores [263]. También se ha demostrado la supresión de citoquinas en humanos tras la administración de fármacos inhibidores de p38, estableciendo así la inhibición de p38 α como una aproximación para el tratamiento de enfermedades basadas en las citoquinas proinflamatorias, como la artritis reumatoide [286]. Actualmente al menos 17 inhibidores de p38 han pasado a ensayos clínicos [145]. Por todo ello, el dendrímero 2G-03NN24 que ha mostrado disminuir la fosforilación de EGFR y de p38 α , junto con una disminución de TNF- α y de IL-12p40 por parte de los macrófagos proinflamatorios M1, podría ser un buen candidato para su utilización en este tipo de enfermedades.

Además, el dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la fosforilación del residuo S473 de AKT. AKT se activa por factores de supervivencia [70] y media los efectos antiapopticos de IGF-1, para ello requiere la fosforilación de los residuos T308 y S473 [278]. El dendrímero 2G-03NN24 disminuyó la fosforilación de S473 pero no afectó a T308, indicando que podría impedir la correcta actividad de AKT1. Estudios con inhibidores de fosforilación han descrito que la fosforilación de

S473 en AKT1 se inhibe con concentraciones más bajas que el residuo T308, que necesitaba cantidades 20 veces de mayores de inhibidor [223]. Esto explicaría por qué solamente se detecta la disminución de la fosforilación de S473 y no de T308 con el tratamiento con 2G-03NN24. La fosforilación de T308 es necesaria y suficiente para la activación de AKT [255]; sin embargo, la máxima activación requiere de la fosforilación adicional en S473 [3], por lo que el dendrímero 2G-03NN24 no afectaría a la funcionalidad de AKT. Muchos tumores tienen una expresión y actividad elevada de AKT [6]. El bloqueo de la señalización de AKT provoca la apoptosis y el paro del crecimiento celular de las células tumorales [15]. AKT contribuye a la inducción del ciclo celular regulando el inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, p27 [103]. Sin embargo el tratamiento con el dendrímero no disminuyó la actividad de AKT al no modificar la fosforilación de S473, lo que explicaría la disminución de la fosforilación de p27, regulada negativamente por AKT.

Los resultados preliminares presentados en esta Memoria sobre los experimentos con TAM murinos mostraron que el tratamiento con el dendrímero 2G-03NN24 podría tener una tendencia a la disminución del tamaño del tumor y de la necrosis del mismo, así como a reducir la cantidad de macrófagos peritumorales y de vasos sanguíneos en el intratumorales. Por otro lado, el dendrímero 2G-03NN24 aumentó la expresión de iNOS en el tumor, proteína que colocalizó parcialmente con F4/80, indicando que los TAM que pertenecían a tumores tratados con el dendrímero expresaban más iNOS, molécula típicamente expresada por los macrófagos de tipo M1, que poseen propiedades antitumorales. El hecho de encontrar células F4/80- iNOS+ podía ser debido a dos factores: el primero, a la posible inducción por parte del dendrímero de la expresión de iNOS por parte de otros tipos celulares distintos a los TAM, como por ejemplo las propias células tumorales MC38, y la segunda, que los TAM estuvieran perdiendo el marcador F4/80 como consecuencia del tratamiento con el dendrímero. Sin embargo, los experimentos *in vitro* con las células MC38 mostraron que la señal de iNOS que se veía en los ratones sin tratar podía ser debida a la expresión basal de iNOS por parte de las MC38, pero no se detectó un aumento con el tratamiento con el dendrímero 2G-03NN24 *in vitro*, es más, el dendrímero disminuyó la expresión de iNOS en las MC38. A pesar de que no se puede extrapolar fácilmente los resultados obtenidos *in vitro* a los *in vivo* debido al elevado número de factores implicados en el desarrollo del tumor que no están presentes en los experimentos *in vitro*, se podría concluir de forma preliminar que la opción más probable es una pérdida de F4/80 inducida por el dendrímero. Además, F4/80 presentó un patrón levemente más difuso en los ratones tratados con 2G-03NN24. Estos resultados relacionados con los TAM murinos deben confirmarse con un número mayor de ratones y utilizando otros marcadores para confirmar si 2G-03NN24 está produciendo un cambio de polarización de los TAM.

En resumen, el dendrímero 2G-03NN24 mostró una tendencia muy clara para disminuir las capacidades fenotípicas y funcionales de los macrófagos de tipo M2, dirigiéndolos a una polarización de tipo M1, que son funcionalmente antitumorales, debido a la plasticidad de estas

células. Además, otros cambios inducidos por el dendrímero permitirían crear un microambiente más favorable dentro de los tumores como se ha visto en los estudios preliminares *in vivo*. Estos resultados son muy alentadores porque definen notablemente al dendrímero 2G-03NN24 como un excelente candidato a la hora de encontrar un nuevo compuesto antitumoral.

6. Conclusiones

1. Las partículas virales del VIH-1 desregulan a los linfocitos B modificando su supervivencia, su fenotipo y su función debido al contacto directo partícula viral-célula. Esta desregulación se induce por vías de señalización independientes a CD40/CD40L.
2. La desregulación por el VIH-1 de las células B sobre la activación y sobre la proteína AID esta mediado por la movilización del complejo SYK/BCR, que tiene como consecuencia la activación de JNK.
3. Los dendrímeros 2G-03NN24 y 2G-NN16 pueden utilizarse como transfectantes en linfocitos T CD4 primarios. En el tratamiento de linfocitos T CD4 infectados con el VIH-1 el dendriplex 2G-03NN24/siRNA-Nef mostró mejores resultados de inhibición que el dendriplex 2G-NN16/siRNA-Nef.
4. El dendrímero 2G-03NN24 cambia *in vitro* la polarización de los macrófagos humanos M2 con capacidad protumoral hacia un estado de polarización M1 con capacidad antitumoral, por lo que tiene una aplicación potencial para el tratamiento de tumores sólidos.
5. El tratamiento con el dendrímero 2G-03NN24 aumenta la expresión de iNOS en el interior del tumor murino afectando a los TAM.
6. Los dendrímeros carbosilano estudiados tienen buena biocompatibilidad con macrófagos humanos primarios y podrían ser utilizados como agentes biológicamente seguros en diferentes aplicaciones biomédicas.

7. Bibliografía

1. Akagawa K.S. *Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages*. Int J Hematol, 2002. 76(1):p.27-34.
2. Akhtar S., Chandrasekhar B., Attur S., Yousif M.H. and Benter I.F. *On the nanotoxicity of PAMAM dendrimers: Superfect(R) stimulates the EGFR-ERK1/2 signal transduction pathway via an oxidative stress-dependent mechanism in HEK 293 cells*. Int J Pharm, 2013. 448(1):p.239-246.
3. Alessi D.R., James S.R., Downes C.P., Holmes A.B., Gaffney P.R., Reese C.B. and Cohen P. *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*. Curr Biol, 1997. 7(4):p.261-269.
4. Alexis F., Rhee J.W., Richie J.P., Radovic-Moreno A.F., Langer R. and Farokhzad O.C. *New frontiers in nanotechnology for cancer treatment*. Urol Oncol, 2008. 26(1):p.74-85.
5. Allavena P., Sica A., Solinas G., Porta C. and Mantovani A. *The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. 66(1):p.1-9.
6. Altomare D.A. and Testa J.R. *Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer*. Oncogene, 2005. 24(50):p.7455-7464.
7. Angurell I., Rossell O. and Seco M. *Synthesis of carbosilane dendrimers containing up to four metal layers*. Chemistry, 2009. 15(12):p.2932-2940.
8. Arnold L., Henry A., Poron F., Baba-Amer Y., van Rooijen N., Plonquet A., Gherardi R.K. and Chazaud B. *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. J Exp Med, 2007. 204(5):p.1057-1069.
9. Balkwill F. *Cancer and the chemokine network*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(7):p.540-550.
10. Bamrungsap S., Zhao Z., Chen T., Wang L., Li C., Fu T. and Tan W. *Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system*. Nanomedicine (Lond), 2012. 7(8):p.1253-1271.
11. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B. and Palucka K. *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. 18:p.767-811.
12. Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. and Montagnier L. *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. 220(4599):p.868-871.
13. Barreda D.R., Hanington P.C. and Belosevic M. *Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors*. Dev Comp Immunol, 2004. 28(5):p.509-554.
14. Beck A.H., Espinosa I., Edris B., Li R., Montgomery K., Zhu S., Varma S., Marinelli R.J., van de Rijn M. and West R.B. *The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2009. 15(3):p.778-787.
15. Bellacosa A., Kumar C.C., Di Cristofano A. and Testa J.R. *Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting*. Adv Cancer Res, 2005. 94:p.29-86.
16. Belperio J.A., Keane M.P., Arenberg D.A., Addison C.L., Ehlert J.E., Burdick M.D. and Strieter R.M. *CXC chemokines in angiogenesis*. J Leukoc Biol, 2000. 68(1):p.1-8.
17. Benoit M., Desnues B. and Mege J.L. *Macrophage polarization in bacterial infections*. J Immunol, 2008. 181(6):p.3733-3739.
18. Berek C. *Somatic mutation and memory*. Curr Opin Immunol, 1993. 5(2):p.218-222.
19. Berki T., Boldizsár F., Szabó M., Talabér G. and Varcza Z., Signal Transduction, in Medical Biotechnology, Csöngéi, Czulák and Berki, Editors. 2011: University of Pécs.
20. Bermejo J.F., Ortega P., Chonco L., Eritja R., Samaniego R., Mullner M., de Jesus E., de la Mata F.J., Flores J.C., Gomez R. and Munoz-Fernandez A. *Water-soluble carbosilane dendrimers: Synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; Evaluation for medical applications*. Chemistry-a European Journal, 2007. 13(2):p.483-495.
21. Bernasconi N.L., Traggiai E. and Lanzavecchia A. *Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells*. Science, 2002. 298(5601):p.2199-2202.
22. Bielinska A.U., Chen C., Johnson J. and Baker J.R., Jr. *DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: implications for transfection*. Bioconjug Chem, 1999. 10(5):p.843-850.
23. Biswas S.K., Gangi L., Paul S., Schioppa T., Saccani A., Sironi M., Bottazzi B., Doni A., Vincenzo B., Pasqualini F., Vago L., Nebuloni M., Mantovani A. and Sica A. *A distinct and*

- unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation)*. Blood, 2006. 107(5):p.2112-2122.
24. Biswas S.K. and Mantovani A. *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. 11(10):p.889-896.
 25. Boas U., Christensen J.B. and Heegaard P.M., eds. *Dendrimers: design, synthesis and chemical properties*. Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools. 2006, RSC Publishing, 3785-3798.
 26. Boas U. and Heegaard P.M. *Dendrimers in drug research*. Chem Soc Rev, 2004. 33(1):p.43-63.
 27. Boasso A., Shearer G.M. and Chougnet C. *Immune dysregulation in human immunodeficiency virus infection: know it, fix it, prevent it?* J Intern Med, 2009. 265(1):p.78-96.
 28. Bolhassani A., Javanzad S., Saleh T., Hashemi M., Aghasadeghi M.R. and Sadat S.M. *Polymeric nanoparticles: Potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases*. Hum Vaccin Immunother, 2013. 10(2).
 29. Bonecchi R., Facchetti F., Dusi S., Luini W., Lissandrini D., Simmelink M., Locati M., Bernasconi S., Allavena P., Brandt E., Rossi F., Mantovani A. and Sozzani S. *Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes*. J Immunol, 2000. 164(7):p.3862-3869.
 30. Bonecchi R., Sozzani S., Stine J.T., Luini W., D'Amico G., Allavena P., Chantry D. and Mantovani A. *Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses*. Blood, 1998. 92(8):p.2668-2671.
 31. Borchert G.M., Holton N.W. and Larson E.D. *Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155*. BMC Cancer, 2011. 11:p.347.
 32. Bourlier V., Zakaroff-Girard A., Miranville A., De Barros S., Maumus M., Sengenès C., Galitzky J., Lafontan M., Karpe F., Frayn K.N. and Bouloumie A. *Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages*. Circulation, 2008. 117(6):p.806-815.
 33. Bowman T., Broome M.A., Sinibaldi D., Wharton W., Pledger W.J., Sedivy J.M., Irby R., Yeatman T., Courtneidge S.A. and Jove R. *Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(13):p.7319-7324.
 34. Brack C., Hiramata M., Lenhard-Schuller R. and Tonegawa S. *A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination*. Cell, 1978. 15(1):p.1-14.
 35. Brechley J.M., Price D.A., Schacker T.W., Asher T.E., Silvestri G., Rao S., Kazzaz Z., Bornstein E., Lambotte O., Altmann D., Blazar B.R., Rodriguez B., Teixeira-Johnson L., Landay A., Martin J.N., Hecht F.M., Picker L.J., Lederman M.M., Deeks S.G. and Douek D.C. *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. 12(12):p.1365-1371.
 36. Briz V., Serramia M.J., Madrid R., Hameau A., Caminade A.M., Majoral J.P. and Muñoz-Fernández M.A. *Validation of a generation 4 phosphorus-containing polycationic dendrimer for gene delivery against HIV-1*. Curr Med Chem, 2012. 19(29):p.5044-5051.
 37. Brown P.A. and Angel J.B. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an immune-based therapy in HIV infection*. J Immune Based Ther Vaccines, 2005. 3(1):p.3.
 38. Buhleier E., Wehner W. and Vögtle F. *Cascade" and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies*. Synthesis, 1978. 2:p.155-158.
 39. Busman-Sahay K., Drake L., Sitaram A., Marks M. and Drake J.R. *Cis and trans regulatory mechanisms control AP2-mediated B cell receptor endocytosis via select tyrosine-based motifs*. PLoS One, 8(1):p.e54938.
 40. Buzon M.J., Massanella M., Llibre J.M., Esteve A., Dahl V., Puertas M.C., Gatell J.M., Domingo P., Paredes R., Sharkey M., Palmer S., Stevenson M., Clotet B., Blanco J. and Martínez-Picado J. *HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects*. Nat Med, 2010. 16(4):p.460-465.
 41. Cagigi A., Du L., Dang L.V., Grutzmeier S., Atlas A., Chiodi F., Pan-Hammarstrom Q. and Nilsson A. *CD27(-) B-cells produce class switched and somatically hyper-mutated antibodies during chronic HIV-1 infection*. PLoS One, 2009. 4(5):p.e5427.
 42. Caracciolo D., Shirsat N., Wong G.G., Lange B., Clark S. and Rovera G. *Recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) requires subliminal concentrations of granulocyte/macrophage*

- (GM)-CSF for optimal stimulation of human macrophage colony formation *in vitro*. *J Exp Med*, 1987. 166(6):p.1851-1860.
43. Castriciano M.A., Romeo A., Baratto M.C., Pogni R. and Scolaro L.M. *Supramolecular mimetic peroxidase based on hemin and PAMAM dendrimers*. *Chem Commun*, 2008. 6:p.688-690.
 44. Chauhan A.S., Diwan P.V., Jain N.K. and Tomalia D.A. *Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers*. *Biomacromolecules*, 2009. 10(5):p.1195-1202.
 45. Chen C.Z., Beck-Tan N.C., Dhurjati P., van Dyk T.K., LaRossa R.A. and Cooper S.L. *Quaternary ammonium functionalized poly(propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: structure-activity studies*. *Biomacromolecules*, 2000. 1(3):p.473-480.
 46. Chen C.Z. and Cooper S.L. *Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes*. *Biomaterials*, 2002. 23(16):p.3359-3368.
 47. Chen J. and Alt F.W. *Gene rearrangement and B-cell development*. *Curr Opin Immunol*, 1993. 5(2):p.194-200.
 48. Chen Y. and Liu L. *Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. 64(7):p.640-665.
 49. Cheng F., Wang H.W., Cuenca A., Huang M., Ghansah T., Brayer J., Kerr W.G., Takeda K., Akira S., Schoenberger S.P., Yu H., Jove R. and Sotomayor E.M. *A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance*. *Immunity*, 2003. 19(3):p.425-436.
 50. Choi M.Y. and Kipps T.J. *Inhibitors of B-cell receptor signaling for patients with B-cell malignancies*. *Cancer J*, 2012. 18(5):p.404-410.
 51. Chonco L., Bermejo-Martin J.F., Ortega P., Shcharbin D., Pedziwiatr E., Klajnert B., de la Mata F.J., Eritja R., Gomez R., Bryszewska M. and Munoz-Fernandez M.A. *Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins*. *Org Biomol Chem*, 2007. 5(12):p.1886-1893.
 52. Chonco L., Pion M., Vacas E., Rasines B., Maly M., Serramia M.J., Lopez-Fernandez L., De la Mata J., Alvarez S., Gomez R. and Munoz-Fernandez M.A. *Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile*. *J Control Release*, 2012. 161(3):p.949-958.
 53. Chong Y., Ikematsu H., Kikuchi K., Yamamoto M., Murata M., Nishimura M., Nabeshima S., Kashiwagi S. and Hayashi J. *Selective CD27+ (memory) B cell reduction and characteristic B cell alteration in drug-naive and HAART-treated HIV type 1-infected patients*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004. 20(2):p.219-226.
 54. Chong Y., Ikematsu H., Yamamoto M., Murata M., Yamaji K., Nishimura M., Nabeshima S., Kashiwagi S. and Hayashi J. *Increased frequency of CD27- (naive) B cells and their phenotypic alteration in HIV type 1-infected patients*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004. 20(6):p.621-629.
 55. Ciepluch K., Katir N., El Kadib A., Felczak A., Zawadzka K., Weber M., Klajnert B., Lisowska K., Caminade A.M., Bousmina M., Bryszewska M. and Majoral J.P. *Biological properties of new viologen-phosphorus dendrimers*. *Mol Pharm*, 2012. 9(3):p.448-457.
 56. Conti L. and Gessani S. *GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances*. *Immunobiology*, 2008. 213(9-10):p.859-870.
 57. Cordoba E.V., Arnaiz E., Relloso M., Sanchez-Torres C., Garcia F., Perez-Alvarez L., Gomez R., de la Mata F.J., Pion M. and Munoz-Fernandez M.A. *Development of sulphated and naphthylsulfonated carbosilane dendrimers as topical microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission*. *AIDS*, 2013.
 58. Cordoba E.V., Pion M., Rasines B., Filippini D., Komber H., Ionov M., Bryszewska M., Appelhans D. and Munoz-Fernandez M.A. *Glycodendrimers as new tools in the search for effective anti-HIV DC-based immunotherapies*. *Nanomedicine*, 2013. 9(7):p.972-984.
 59. Coussens L.M. and Werb Z. *Inflammation and cancer*. *Nature*, 2002. 420(6917):p.860-867.
 60. D'Amico G., Frascaroli G., Bianchi G., Transidico P., Doni A., Vecchi A., Sozzani S., Allavena P. and Mantovani A. *Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys*. *Nat Immunol*, 2000. 1(5):p.387-391.
 61. Dai J., Liu B., Cua D.J. and Li Z. *Essential roles of IL-12 and dendritic cells but not IL-23 and macrophages in lupus-like diseases initiated by cell surface HSP gp96*. *Eur J Immunol*, 2007. 37(3):p.706-715.

62. Darnell G.A., Schroder W.A., Gardner J., Harrich D., Yu H., Medcalf R.L., Warrilow D., Antalis T.M., Sonza S. and Suhrbier A. *Serp1B2 is an inducible host factor involved in enhancing HIV-1 transcription and replication.* J Biol Chem, 2006. 281(42):p.31348-31358.
63. Davignon J.L., Hayder M., Baron M., Boyer J.F., Constantin A., Apparailly F., Poupot R. and Cantagrel A. *Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis.* Rheumatology (Oxford), 2013. 52(4):p.590-598.
64. De Clercq E. *Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV.* Int J Antimicrob Agents, 2009. 33(4):p.307-320.
65. De Clercq E. *The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years.* Rev Med Virol, 2009. 19(5):p.287-299.
66. De Milito A. *B lymphocyte dysfunctions in HIV infection.* Curr HIV Res, 2004. 2(1):p.11-21.
67. De Milito A., Morch C., Sonnerborg A. and Chiodi F. *Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection.* AIDS, 2001. 15(8):p.957-964.
68. De Milito A., Nilsson A., Titanji K., Thorstensson R., Reizenstein E., Narita M., Grutzmeier S., Sonnerborg A. and Chiodi F. *Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection.* Blood, 2004. 103(6):p.2180-2186.
69. de Yebenes V.G., Belver L., Pisano D.G., Gonzalez S., Villasante A., Croce C., He L. and Ramiro A.R. *miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells.* J Exp Med, 2008. 205(10):p.2199-2206.
70. Diehl J.A., Cheng M., Roussel M.F. and Sherr C.J. *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.* Genes Dev, 1998. 12(22):p.3499-3511.
71. Dinoso J.B., Kim S.Y., Wiegand A.M., Palmer S.E., Gange S.J., Cranmer L., O'Shea A., Callender M., Spivak A., Brennan T., Kearney M.F., Proschan M.A., Mican J.M., Rehm C.A., Coffin J.M., Mellors J.W., Siliciano R.F. and Maldarelli F. *Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(23):p.9403-9408.
72. Dominska M. and Dykxhoorn D.M. *Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape.* J Cell Sci, 2010. 123(Pt 8):p.1183-1189.
73. Doranz B.J., Rucker J., Yi Y., Smyth R.J., Samson M., Peiper S.C., Parmentier M., Collman R.G. and Doms R.W. *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors.* Cell, 1996. 85(7):p.1149-1158.
74. Dorsett Y., McBride K.M., Jankovic M., Gazumyan A., Thai T.H., Robbiani D.F., Di Virgilio M., Reina San-Martin B., Heidkamp G., Schwickert T.A., Eisenreich T., Rajewsky K. and Nussenzweig M.C. *MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-IgB translocation.* Immunity, 2008. 28(5):p.630-638.
75. Duffield J.S. *The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde.* Clin Sci (Lond), 2003. 104(1):p.27-38.
76. Duncan C.J., Russell R.A. and Sattentau Q.J. *High multiplicity HIV-1 cell-to-cell transmission from macrophages to CD4+ T cells limits antiretroviral efficacy.* AIDS, 2013. 27(14):p.2201-2206.
77. Elzoghby A.O., Helmy M.W., Samy W.M. and Elgindy N.A. *Novel ionically crosslinked casein nanoparticles for flutamide delivery: formulation, characterization, and in vivo pharmacokinetics.* Int J Nanomedicine, 2013. 8:p.1721-1732.
78. Epeldegui M., Vendrame E. and Martinez-Maza O. *HIV-associated immune dysfunction and viral infection: role in the pathogenesis of AIDS-related lymphoma.* Immunol Res, 2010. 48(1-3):p.72-83.
79. Escribese M.M., Sierra-Filardi E., Nieto C., Samaniego R., Sanchez-Torres C., Matsuyama T., Calderon-Gomez E., Vega M.A., Salas A., Sanchez-Mateos P. and Corbi A.L. *The prolyl hydroxylase PHD3 identifies proinflammatory macrophages and its expression is regulated by activin A.* J Immunol, 2012. 189(4):p.1946-1954.
80. Esser C. and Radbruch A. *Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis.* Annu Rev Immunol, 1990. 8:p.717-735.
81. Fadini G.P., Cappellari R., Mazzucato M., Agostini C., Vigili de Kreutzenberg S. and Avogaro A. *Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals.* Acta Diabetol, 2013.
82. Fairweather D. and Cihakova D. *Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity.* J Autoimmun, 2009. 33(3-4):p.222-230.
83. Fang F.C. *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies.* Nat Rev Microbiol, 2004. 2(10):p.820-832.

84. Fang F.C. and Nathan C.F. *Man is not a mouse: reply*. J Leukoc Biol, 2007. 81(3):p.580.
85. Fleetwood A.J., Dinh H., Cook A.D., Hertzog P.J. and Hamilton J.A. *GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling*. J Leukoc Biol, 2009. 86(2):p.411-421.
86. Fleetwood A.J., Lawrence T., Hamilton J.A. and Cook A.D. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation*. J Immunol, 2007. 178(8):p.5245-5252.
87. French D.L., Laskov R. and Scharff M.D. *The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity*. Science, 1989. 244(4909):p.1152-1157.
88. French M., Keane N., McKinnon E., Phung S. and Price P. *Susceptibility to opportunistic infections in HIV-infected patients with increased CD4 T-cell counts on antiretroviral therapy may be predicted by markers of dysfunctional effector memory CD4 T cells and B cells*. HIV Med, 2007. 8(3):p.148-155.
89. Frigon N.L., Jr., Shao L., Young A.L., Maderazo L. and Yu J. *Regulation of globin gene expression in human K562 cells by recombinant activin A*. Blood, 1992. 79(3):p.765-772.
90. Fujiwara Y., Komohara Y., Ikeda T. and Takeya M. *Corosolic acid inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of signal transducer and activator of transcription-3 and nuclear factor-kappa B in tumor cells and tumor-associated macrophages*. Cancer Sci, 2011. 102(1):p.206-211.
91. Fujiwara Y., Komohara Y., Kudo R., Tsurushima K., Ohnishi K., Ikeda T. and Takeya M. *Oleanolic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3*. Oncol Rep, 2011. 26(6):p.1533-1537.
92. Gallucci S. and Matzinger P. *Danger signals: SOS to the immune system*. Curr Opin Immunol, 2001. 13(1):p.114-119.
93. Gardt O., Grewe B., Tippler B.G., Uberla K. and Temchura V.V. *HIV-derived lentiviral particles promote T-cell independent activation and differentiation of naive cognate conventional B2-cells in vitro*. Vaccine, 2013. 31(44):p.5088-5098.
94. Gasiewicz T.A., Singh K.P. and Casado F.L. *The aryl hydrocarbon receptor has an important role in the regulation of hematopoiesis: implications for benzene-induced hematopoietic toxicity*. Chem Biol Interact, 2010. 184(1-2):p.246-251.
95. Gazzaniga S., Bravo A.I., Guglielmotti A., van Rooijen N., Maschi F., Vecchi A., Mantovani A., Mordoh J. and Wainstok R. *Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft*. J Invest Dermatol, 2007. 127(8):p.2031-2041.
96. Geahlen R.L. *Syk and pTyr^d: Signaling through the B cell antigen receptor*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1793(7):p.1115-1127.
97. Gonzalez-Nicolas J., Resino S., Jimenez J.L., Alvarez S., Fresno M. and Munoz-Fernandez M.A. *Tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in vertically HIV-1-infected children: implications for pathogenesis*. Eur Cytokine Netw, 2001. 12(3):p.437-444.
98. Gonzalo T., Clemente M.I., Chonco L., Weber N.D., Diaz L., Serramia M.J., Gras R., Ortega P., de la Mata F.J., Gomez R., Lopez-Fernandez L.A., Munoz-Fernandez M.A. and Jimenez J.L. *Gene therapy in HIV-infected cells to decrease viral impact by using an alternative delivery method*. ChemMedChem, 2010. 5(6):p.921-929.
99. Gordon S. *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(1):p.23-35.
100. Gordon S. and Martinez F.O. *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. 32(5):p.593-604.
101. Gordon S. and Taylor P.R. *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(12):p.953-964.
102. Gottlieb M.S., Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.A. and Saxon A. *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. N Engl J Med, 1981. 305(24):p.1425-1431.
103. Graff J.R., Konicek B.W., McNulty A.M., Wang Z., Houck K., Allen S., Paul J.D., Hbailu A., Goode R.G., Sandusky G.E., Vessella R.L. and Neubauer B.L. *Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression*. J Biol Chem, 2000. 275(32):p.24500-24505.

104. Gras R., Almonacid L., Ortega P., Serramia M.J., Gomez R., de la Mata F.J., Lopez-Fernandez L.A. and Munoz-Fernandez M.A. *Changes in gene expression pattern of human primary macrophages induced by carbosilane dendrimer 2G-NN16*. Pharm Res, 2009. 26(3):p.577-586.
105. Gras R., Garcia M.I., Gomez R., de la Mata F.J., Munoz-Fernandez M.A. and Lopez-Fernandez L.A. *Carbosilane dendrimer 2G-NN16 represses Tc17 differentiation in primary T CD8+ lymphocytes*. Mol Pharm, 2012. 9(1):p.102-110.
106. Gras R., Relloso M., Garcia M.I., de la Mata F.J., Gomez R., Lopez-Fernandez L.A. and Munoz-Fernandez M.A. *The inhibition of Th17 immune response in vitro and in vivo by the carbosilane dendrimer 2G-NN16*. Biomaterials, 2012. 33(15):p.4002-4009.
107. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kothe K., Muller-Molinet I., Kannookadan S., Utikal J. and Goerdts S. *Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals*. Immunobiology, 2006. 211(6-8):p.473-486.
108. Graves D.T., Jiang Y.L., Williamson M.J. and Valente A.J. *Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells*. Science, 1989. 245(4925):p.1490-1493.
109. Graziosi C., Gantt K.R., Vaccarezza M., Demarest J.F., Daucher M., Saag M.S., Shaw G.M., Quinn T.C., Cohen O.J., Welbon C.C., Pantaleo G. and Fauci A.S. *Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(9):p.4386-4391.
110. Grulich A.E., van Leeuwen M.T., Falster M.O. and Vajdic C.M. *Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis*. Lancet, 2007. 370(9581):p.59-67.
111. Guo B. and Rothstein T.L. *IL-4 upregulates Igalpha and Igbeta protein, resulting in augmented IgM maturation and B cell receptor-triggered B cell activation*. J Immunol, 191(2):p.670-677.
112. Guo S. and Huang L. *Nanoparticles Escaping RES and Endosome: Challenges for siRNA Delivery for Cancer Therapy*. Journal of Nanomaterials, 2011.p.12.
113. Hadjichristidis N., Guyot A. and Fetters L.J. *Star-Branched Polymers.1. The Synthesis of Star Polyisoprenes Using Octa- and Dodecachlorosilanes as Linking Agents*. Macromolecules, 1978. 11:p.668-672.
114. Hamilton J.A. *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(7):p.533-544.
115. Hao N.B., Lu M.H., Fan Y.H., Cao Y.L., Zhang Z.R. and Yang S.M. *Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors*. Clin Dev Immunol, 2012. 2012:p.948098.
116. Harriman W., Volk H., Defranoux N. and Wabl M. *Immunoglobulin class switch recombination*. Annu Rev Immunol, 1993. 11:p.361-384.
117. Hart M., Steel A., Clark S.A., Moyle G., Nelson M., Henderson D.C., Wilson R., Gotch F., Gazzard B. and Kelleher P. *Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease*. J Immunol, 2007. 178(12):p.8212-8220.
118. Haselow K., Bode J.G., Wammers M., Ehling C., Keitel V., Kleinebrecht L., Schupp A.K., Haussinger D. and Graf D. *Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages*. J Leukoc Biol, 2013.
119. Hasham M.G., Donghia N.M., Coffey E., Maynard J., Snow K.J., Ames J., Wilpan R.Y., He Y., King B.L. and Mills K.D. *Widespread genomic breaks generated by activation-induced cytidine deaminase are prevented by homologous recombination*. Nat Immunol, 2010. 11(9):p.820-826.
120. He B., Qiao X., Klasse P.J., Chiu A., Chadburn A., Knowles D.M., Moore J.P. and Cerutti A. *HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors*. J Immunol, 2006. 176(7):p.3931-3941.
121. Hendrzak J.A. and Brunda M.J. *Interleukin-12. Biologic activity, therapeutic utility, and role in disease*. Lab Invest, 1995. 72(6):p.619-637.
122. Hong K., Chu A., Ludviksson B.R., Berg E.L. and Ehrhardt R.O. *IL-12, independently of IFN-gamma, plays a crucial role in the pathogenesis of a murine psoriasis-like skin disorder*. J Immunol, 1999. 162(12):p.7480-7491.
123. Ioannidis J.P., Rosenberg P.S., Goedert J.J., Ashton L.J., Benfield T.L., Buchbinder S.P., Coutinho R.A., Eugen-Olsen J., Gallart T., Katzenstein T.L., Kostrikis L.G., Kuipers H., Louie L.G., Mallal S.A., Margolick J.B., Martinez O.P., Meyer L., Michael N.L., Operskalski E., Pantaleo G., Rizzardì G.P., Schuitemaker H., Sheppard H.W., Stewart G.J., Theodorou

- I.D., Ullum H., Vicenzi E., Vlahov D., Wilkinson D., Workman C., Zagury J.F. and O'Brien T.R. *Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data.* Ann Intern Med, 2001. 135(9):p.782-795.
124. Jacobson M.A., Khayam-Bashi H., Martin J.N., Black D. and Ng V. *Effect of long-term highly active antiretroviral therapy in restoring HIV-induced abnormal B-lymphocyte function.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2002. 31(5):p.472-477.
125. Jaganathan S., Yue P., Paladino D.C., Bogdanovic J., Huo Q. and Turkson J. *A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells.* PLoS One, 2011. 6(5):p.e19605.
126. Jain N.K. and Asthana A. *Dendritic systems in drug delivery applications.* Expert Opin Drug Deliv, 2007. 4(5):p.495-512.
127. Jevprasesphant R., Penny J., Jalal R., Attwood D., McKeown N.B. and D'Emanuele A. *The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers.* Int J Pharm, 2003. 252(1-2):p.263-266.
128. Jiang Y.H., Emau P., Cairns J.S., Flanary L., Morton W.R., McCarthy T.D. and Tsai C.C. *SPL7013 gel as a topical microbicide for prevention of vaginal transmission of SHIV89.6P in macaques.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2005. 21(3):p.207-213.
129. Jimenez J.L., Clemente M.I., Weber N.D., Sanchez J., Ortega P., de la Mata F.J., Gomez R., Garcia D., Lopez-Fernandez L.A. and Munoz-Fernandez M.A. *Carbosilane dendrimers to transfect human astrocytes with small interfering RNA targeting human immunodeficiency virus.* BioDrugs, 2010. 24(5):p.331-343.
130. Kauffman C.L., Aria N., Toichi E., McCormick T.S., Cooper K.D., Gottlieb A.B., Everitt D.E., Frederick B., Zhu Y., Graham M.A., Pendley C.E. and Mascelli M.A. *A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis.* J Invest Dermatol, 2004. 123(6):p.1037-1044.
131. Ke W., Zhao Y., Huang R., Jiang C. and Pei Y. *Enhanced oral bioavailability of doxorubicin in a dendrimer drug delivery system.* J Pharm Sci, 2008. 97(6):p.2208-2216.
132. Kim B.Y., Rutka J.T. and Chan W.C. *Nanomedicine.* N Engl J Med, 2010. 363(25):p.2434-2443.
133. Kluiver J., van den Berg A., de Jong D., Blokzijl T., Harms G., Bouwman E., Jacobs S., Poppema S. and Kroesen B.J. *Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma.* Oncogene, 2007. 26(26):p.3769-3776.
134. Koide N., Nishio A., Sato T., Sugiyama A. and Miyagawa S. *Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus.* Am J Gastroenterol, 2004. 99(9):p.1667-1674.
135. Kolar G.R., Mehta D., Pelayo R. and Capra J.D. *A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID.* Blood, 2007. 109(6):p.2545-2552.
136. Kuehl W.M. and Bergsagel P.L. *Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions.* Nat Rev Cancer, 2002. 2(3):p.175-187.
137. Kumaraguru U. and Rouse B.T. *The IL-12 response to herpes simplex virus is mainly a paracrine response of reactive inflammatory cells.* J Leukoc Biol, 2002. 72(3):p.564-570.
138. Kuppers R. *B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus.* Nat Rev Immunol, 2003. 3(10):p.801-812.
139. Kusaba H., Ghosh P., Derin R., Buchholz M., Sasaki C., Madara K. and Longo D.L. *Interleukin-12-induced interferon-gamma production by human peripheral blood T cells is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR).* J Biol Chem, 2005. 280(2):p.1037-1043.
140. Lam K.P., Kuhn R. and Rajewsky K. *In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death.* Cell, 1997. 90(6):p.1073-1083.
141. Lane H.C., Masur H., Edgar L.C., Whalen G., Rook A.H. and Fauci A.S. *Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome.* N Engl J Med, 1983. 309(8):p.453-458.
142. Laoui D., Movahedi K., Van Overmeire E., Van den Bossche J., Schoupe E., Mommer C., Nikolaou A., Morias Y., De Baetselier P. and Van Ginderachter J.A. *Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions.* Int J Dev Biol, 2011. 55(7-9):p.861-867.

143. Lara H.H., Ixtepan-Turrent L., Garza Trevino E.N. and Singh D.K. *Use of silver nanoparticles increased inhibition of cell-associated HIV-1 infection by neutralizing antibodies developed against HIV-1 envelope proteins.* J Nanobiotechnology, 2011. 9:p.38.
144. LeBien T.W. *Fates of human B-cell precursors.* Blood, 2000. 96(1):p.9-23.
145. Lee M.R. and Dominguez C. *MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein.* Curr Med Chem, 2005. 12(25):p.2979-2994.
146. Lee N.S. and Rossi J.J. *Control of HIV-1 replication by RNA interference.* Virus Res, 2004. 102(1):p.53-58.
147. Leonard J.P., Waldburger K.E. and Goldman S.J. *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12.* J Exp Med, 1995. 181(1):p.381-386.
148. Li G., Pone E.J., Tran D.C., Patel P.J., Dao L., Xu Z. and Casali P. *Iron inhibits activation-induced cytidine deaminase enzymatic activity and modulates immunoglobulin class switch DNA recombination.* J Biol Chem, 2012. 287(25):p.21520-21529.
149. Li J., Hsu H.C. and Mountz J.D. *Managing macrophages in rheumatoid arthritis by reform or removal.* Curr Rheumatol Rep, 2012. 14(5):p.445-454.
150. Li J., Hsu H.C., Yang P., Wu Q., Li H., Edgington L.E., Bogoy M., Kimberly R.P. and Mountz J.D. *Treatment of arthritis by macrophage depletion and immunomodulation: testing an apoptosis-mediated therapy in a humanized death receptor mouse model.* Arthritis Rheum, 2012. 64(4):p.1098-1109.
151. Li Q. and Verma I.M. *NF-kappaB regulation in the immune system.* Nat Rev Immunol, 2002. 2(10):p.725-734.
152. Lo R.K., Cheung H. and Wong Y.H. *Constitutively active Galpha16 stimulates STAT3 via a c-Src/JAK- and ERK-dependent mechanism.* J Biol Chem, 2003. 278(52):p.52154-52165.
153. Lu Y., Cai Z., Galson D.L., Xiao G., Liu Y., George D.E., Melhem M.F., Yao Z. and Zhang J. *Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion.* Prostate, 2006. 66(12):p.1311-1318.
154. Lumeng C.N., Bodzin J.L. and Saltiel A.R. *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization.* J Clin Invest, 2007. 117(1):p.175-184.
155. Maddaly R., Pai G., Balaji S., Sivaramakrishnan P., Srinivasan L., Sunder S.S. and Paul S.F. *Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation--insights from both in vivo and in vitro approaches.* FEBS Lett, 2010. 584(24):p.4883-4894.
156. Major L.D., Partridge T.S., Gardner J., Kent S.J., de Rose R., Suhrbier A. and Schroder W.A. *Induction of SerpinB2 and Th1/Th2 modulation by SerpinB2 during lentiviral infections in vivo.* PLoS One, 2013. 8(2):p.e57343.
157. Majoral J.P. and Caminade A.M. *Dendrimers containing heteroatoms (si, p, B, ge, or bi).* Chem Rev, 1999. 99(3):p.845-880.
158. Malaspina A., Moir S., Kottlil S., Hallahan C.W., Ehler L.A., Liu S., Planta M.A., Chun T.W. and Fauci A.S. *Deleterious effect of HIV-1 plasma viremia on B cell costimulatory function.* J Immunol, 2003. 170(12):p.5965-5972.
159. Malaspina A., Moir S., Orsega S.M., Vasquez J., Miller N.J., Donoghue E.T., Kottlil S., Gezmu M., Follmann D., Vodeiko G.M., Levandowski R.A., Mican J.M. and Fauci A.S. *Compromised B cell responses to influenza vaccination in HIV-infected individuals.* J Infect Dis, 2005. 191(9):p.1442-1450.
160. Malfait A.M., Butler D.M., Presky D.H., Maini R.N., Brennan F.M. and Feldmann M. *Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis.* Clin Exp Immunol, 1998. 111(2):p.377-383.
161. Mangano A., Kopka J., Batalla M., Bologna R. and Sen L. *Protective effect of CCR2-64I and not of CCR5-delta32 and SDF1-3'A in pediatric HIV-1 infection.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2000. 23(1):p.52-57.
162. Mannon P.J., Fuss I.J., Mayer L., Elson C.O., Sandborn W.J., Present D., Dolin B., Goodman N., Groden C., Hornung R.L., Quezado M., Yang Z., Neurath M.F., Salfeld J., Veldman G.M., Schwertschlag U. and Strober W. *Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease.* N Engl J Med, 2004. 351(20):p.2069-2079.
163. Mantovani A., Locati M., Vecchi A., Sozzani S. and Allavena P. *Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines.* Trends Immunol, 2001. 22(6):p.328-336.

164. Mantovani A., Schioppa T., Porta C., Allavena P. and Sica A. *Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. 25(3):p.315-322.
165. Mantovani A., Sica A. and Locati M. *Macrophage polarization comes of age*. *Immunity*, 2005. 23(4):p.344-346.
166. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A. and Locati M. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol*, 2004. 25(12):p.677-686.
167. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P. and Sica A. *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. *Trends Immunol*, 2002. 23(11):p.549-555.
168. Marsden M.D. and Zack J.A. *Eradication of HIV: current challenges and new directions*. *J Antimicrob Chemother*, 2009. 63(1):p.7-10.
169. Martin G., Roy J., Barat C., Ouellet M., Gilbert C. and Tremblay M.J. *Human immunodeficiency virus type 1-associated CD40 ligand transactivates B lymphocytes and promotes infection of CD4+ T cells*. *J Virol*, 2007. 81(11):p.5872-5881.
170. Martinez F.O., Helming L. and Gordon S. *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27:p.451-483.
171. Maruotti N., Cantatore F.P., Crivellato E., Vacca A. and Ribatti D. *Macrophages in rheumatoid arthritis*. *Histol Histopathol*, 2007. 22(5):p.581-586.
172. Marusawa H. and Chiba T. *Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis*. *Curr Opin Immunol*, 2010. 22(4):p.442-447.
173. Marusawa H., Takai A. and Chiba T. *Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development*. *Adv Immunol*, 2011. 111:p.109-141.
174. Matthys P., Vermeire K., Mitera T., Heremans H., Huang S. and Billiau A. *Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice*. *Eur J Immunol*, 1998. 28(7):p.2143-2151.
175. McDermott R.S., Deneux L., Mosseri V., Vedrenne J., Clough K., Fourquet A., Rodriguez J., Cosset J.M., Sastre X., Beuzebec P., Pouillart P. and Scholl S.M. *Circulating macrophage colony stimulating factor as a marker of tumour progression*. *Eur Cytokine Netw*, 2002. 13(1):p.121-127.
176. Medzhitov R. *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. *Nature*, 2007. 449(7164):p.819-826.
177. Medzhitov R. and Janeway C.A., Jr. *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses*. *Semin Immunol*, 1998. 10(5):p.351-353.
178. Modolell M., Corraliza I.M., Link F., Soler G. and Eichmann K. *Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines*. *Eur J Immunol*, 1995. 25(4):p.1101-1104.
179. Moir S. and Fauci A.S. *B cells in HIV infection and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(4):p.235-245.
180. Moir S., Malaspina A., Li Y., Chun T.W., Lowe T., Adelsberger J., Baseler M., Ehler L.A., Liu S., Davey R.T., Jr., Mican J.A. and Fauci A.S. *B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells*. *J Exp Med*, 2000. 192(5):p.637-646.
181. Moir S., Malaspina A., Ogwaro K.M., Donoghue E.T., Hallahan C.W., Ehler L.A., Liu S., Adelsberger J., Lapointe R., Hwu P., Baseler M., Orenstein J.M., Chun T.W., Mican J.A. and Fauci A.S. *HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(18):p.10362-10367.
182. Moriya K., Rivera J., Odom S., Sakuma Y., Muramoto K., Yoshiuchi T., Miyamoto M. and Yamada K. *ER-27319, an acridone-related compound, inhibits release of antigen-induced allergic mediators from mast cells by selective inhibition of fcepsilon receptor I-mediated activation of Syk*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(23):p.12539-12544.
183. Moros M., Mitchell S.G., Grazu V. and de la Fuente J.M. *The fate of nanocarriers as nanomedicines in vivo: important considerations and biological barriers to overcome*. *Curr Med Chem*, 2013. 20(22):p.2759-2778.
184. Mosser D.M. and Edwards J.P. *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(12):p.958-969.
185. Mukhtar R.A., Moore A.P., Nseyo O., Baehner F.L., Au A., Moore D.H., Twomey P., Campbell M.J. and Esserman L.J. *Elevated PCNA+ tumor-associated macrophages in breast cancer*

- are associated with early recurrence and non-Caucasian ethnicity. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 130(2):p.635-644.
186. Mukhtar R.A., Nseyo O., Campbell M.J. and Esserman L.J. *Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2011. 11(1):p.91-100.
187. Murakawa T., Kajiyama S., Ikeuchi T., Kawakami S. and Fukui K. *Improvement of transformation efficiency by bioactive-beads-mediated gene transfer using DNA-lipofectin complex as entrapped genetic material*. *J Biosci Bioeng*, 2008. 105(1):p.77-80.
188. Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y. and Honjo T. *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme*. *Cell*, 2000. 102(5):p.553-563.
189. Murdoch C., Giannoudis A. and Lewis C.E. *Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues*. *Blood*, 2004. 104(8):p.2224-2234.
190. Murugesan K., Baumann S., Wissenbach D.K., Kliemt S., Kalkhof S., Otto W., Mogel I., Kohajda T., von Bergen M. and Tomm J.M. *Subtoxic and toxic concentrations of benzene and toluene induce Nrf2-mediated antioxidative stress response and affect the central carbon metabolism in lung epithelial cells A549*. *Proteomics*, 2013.
191. Nagahori N., Lee R.T., Nishimura S., Page D., Roy R. and Lee Y.C. *Inhibition of adhesion of type 1 fimbriated Escherichia coli to highly mannosylated ligands*. *Chembiochem*, 2002. 3(9):p.836-844.
192. Nardin A. and Abastado J.P. *Macrophages and cancer*. *Front Biosci*, 2008. 13:p.3494-3505.
193. Nathan C.F., Murray H.W. and Cohn Z.A. *The macrophage as an effector cell*. *N Engl J Med*, 1980. 303(11):p.622-626.
194. Neelov I.M., Janaszewska A., Klajnert B., Bryszewska M., Makova N.Z., Hicks D., Pearson H.A., Vlasov G.P., Ilyash M.Y., Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Zhuravin I.A., Turner A.J. and Nalivaeva N.N. *Molecular properties of lysine dendrimers and their interactions with Abeta-peptides and neuronal cells*. *Curr Med Chem*, 2013. 20(1):p.134-143.
195. Nesbit M., Schaidler H., Miller T.H. and Herlyn M. *Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells*. *J Immunol*, 2001. 166(11):p.6483-6490.
196. New L. and Han J. *The p38 MAP kinase pathway and its biological function*. *Trends Cardiovasc Med*, 1998. 8(5):p.220-228.
197. Ni H., Wang X.S., Diener K. and Yao Z. *MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 243(2):p.492-496.
198. Nossal G.J. *The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response*. *Cell*, 1992. 68(1):p.1-2.
199. Ohta M., Kitadai Y., Tanaka S., Yoshihara M., Yasui W., Mukaida N., Haruma K. and Chayama K. *Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas*. *Int J Oncol*, 2003. 22(4):p.773-778.
200. Omidi Y., Hollins A.J., Benboubetra M., Drayton R., Benter I.F. and Akhtar S. *Toxicogenomics of non-viral vectors for gene therapy: a microarray study of lipofectin- and oligofectamine-induced gene expression changes in human epithelial cells*. *J Drug Target*, 2003. 11(6):p.311-323.
201. Ong S.M., Tan Y.C., Beretta O., Jiang D., Yeap W.H., Tai J.J., Wong W.C., Yang H., Schwarz H., Lim K.H., Koh P.K., Ling K.L. and Wong S.C. *Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response*. *Eur J Immunol*, 2012. 42(1):p.89-100.
202. Ortega P., Bermejo J.F., Chonco L., de Jesus E., de la Mata F.J., Fernandez G., Flores J.C., Gomez R., Serramia M.J. and Munoz-Fernandez M.A. *Novel water-soluble carbosilane dendrimers: Synthesis and biocompatibility*. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2006. (7):p.1388-1396.
203. Ortega P., Copa-Patino J.L., Munoz-Fernandez M.A., Soliveri J., Gomez R. and de la Mata F.J. *Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies*. *Org Biomol Chem*, 2008. 6(18):p.3264-3269.
204. Palmer S., Josefsson L. and Coffin J.M. *HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection*. *J Intern Med*, 270(6):p.550-560.

205. Park J.M., Greten F.R., Wong A., Westrick R.J., Arthur J.S., Otsu K., Hoffmann A., Montminy M. and Karin M. *Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis—CREB and NF- κ B as key regulators*. Immunity, 2005. 23(3):p.319-329.
206. Pear W.S., Nolan G.P., Scott M.L. and Baltimore D. *Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(18):p.8392-8396.
207. Pearce A.K. and Humphrey T.C. *Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways*. Trends Cell Biol, 2001. 11(10):p.426-433.
208. Peer D., Zhu P., Carman C.V., Lieberman J. and Shimaoka M. *Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNAs to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(10):p.4095-4100.
209. Peng J., Wu Z., Qi X., Chen Y. and Li X. *Dendrimers as Potential Therapeutic Tools in HIV Inhibition*. Molecules, 2013. 18(7):p.7912-7929.
210. Penton-Rol G., Cota M., Polentarutti N., Luini W., Bernasconi S., Borsatti A., Sica A., LaRosa G.J., Sozzani S., Poli G. and Mantovani A. *Up-regulation of CCR2 chemokine receptor expression and increased susceptibility to the multitropic HIV strain 89.6 in monocytes exposed to glucocorticoid hormones*. J Immunol, 1999. 163(6):p.3524-3529.
211. Penton-Rol G., Polentarutti N., Luini W., Borsatti A., Mancinelli R., Sica A., Sozzani S. and Mantovani A. *Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN- γ* . J Immunol, 1998. 160(8):p.3869-3873.
212. Pereira C.F., Boven L.A., Middel J., Verhoef J. and Nottet H.S. *Induction of cyclooxygenase-2 expression during HIV-1-infected monocyte-derived macrophage and human brain microvascular endothelial cell interactions*. J Leukoc Biol, 2000. 68(3):p.423-428.
213. Pham P., Bransteitter R., Petruska J. and Goodman M.F. *Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation*. Nature, 2003. 424(6944):p.103-107.
214. Pinto D., Montani E., Bolli M., Garavaglia G., Sallusto F., Lanzavecchia A. and Jarrossay D. *A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells*. Blood, 121(20):p.4110-4114.
215. Pion M., Serramia M.J., Diaz L., Bryszewska M., Gallart T., Garcia F., Gomez R., de la Mata F.J. and Munoz-Fernandez M.A. *Phenotype and functional analysis of human monocytes-derived dendritic cells loaded with a carbosilane dendrimer*. Biomaterials, 2010. 31(33):p.8749-8758.
216. Pone E.J., Zhang J., Mai T., White C.A., Li G., Sakakura J.K., Patel P.J., Al-Qahtani A., Zan H., Xu Z. and Casali P. *BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway*. Nat Commun, 2012. 3:p.767.
217. Puig-Kroger A., Sierra-Filardi E., Dominguez-Soto A., Samaniego R., Corcuera M.T., Gomez-Aguado F., Ratnam M., Sanchez-Mateos P. and Corbi A.L. *Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages*. Cancer Res, 2009. 69(24):p.9395-9403.
218. Racanelli V., Frassanito M.A., Leone P., Galiano M., De Re V., Silvestris F. and Dammacco F. *Antibody production and in vitro behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules*. J Virol, 2006. 80(8):p.3923-3934.
219. Raes G., Van den Bergh R., De Baetselier P., Ghassabeh G.H., Scotton C., Locati M., Mantovani A. and Sozzani S. *Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells*. J Immunol, 2005. 174(11):p.6561; author reply 6561-6562.
220. Ramachandran A., Marshall E.S., Love D.R., Baguley B.C. and Shelling A.N. *Activin is a potent growth suppressor of epithelial ovarian cancer cells*. Cancer Lett, 2009. 285(2):p.157-165.
221. Ramiro A., Reina San-Martin B., McBride K., Jankovic M., Barreto V., Nussenzweig A. and Nussenzweig M.C. *The role of activation-induced deaminase in antibody diversification and chromosome translocations*. Adv Immunol, 2007. 94:p.75-107.
222. Randolph G.J., Jakubzick C. and Qu C. *Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells*. Curr Opin Immunol, 2008. 20(1):p.52-60.
223. Rane M.J., Coxon P.Y., Powell D.W., Webster R., Klein J.B., Pierce W., Ping P. and McLeish K.R. *p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils*. J Biol Chem, 2001. 276(5):p.3517-3523.
224. Rao K.S., Ghorpade A. and Labhasetwar V. *Targeting anti-HIV drugs to the CNS*. Expert Opin Drug Deliv, 2009. 6(8):p.771-784.

225. Rasines B., Hernandez-Ros J.M., de las Cuevas N., Copa-Patino J.L., Soliveri J., Munoz-Fernandez M.A., Gomez R. and de la Mata F.J. *Water-stable ammonium-terminated carboxilane dendrimers as efficient antibacterial agents*. Dalton Trans, 2009. (40):p.8704-8713.
226. Razanajaona D., Joguet S., Ay A.S., Treilleux I., Goddard-Leon S., Bartholin L. and Rimokh R. *Silencing of FLRG, an antagonist of activin, inhibits human breast tumor cell growth*. Cancer Res, 2007. 67(15):p.7223-7229.
227. Redgrave B.E., Stone S.F., French M.A., Krueger R., James I.R. and Price P. *The effect of combination antiretroviral therapy on CD5 B- cells, B-cell activation and hypergammaglobulinaemia in HIV-1-infected patients*. HIV Med, 2005. 6(5):p.307-312.
228. Richman D.D., Margolis D.M., Delaney M., Greene W.C., Hazuda D. and Pomerantz R.J. *The challenge of finding a cure for HIV infection*. Science, 2009. 323(5919):p.1304-1307.
229. Robbiani D.F., Bunting S., Feldhahn N., Bothmer A., Camps J., Deroubaix S., McBride K.M., Klein I.A., Stone G., Eisenreich T.R., Ried T., Nussenzweig A. and Nussenzweig M.C. *AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations*. Mol Cell, 2009. 36(4):p.631-641.
230. Rosenberg B.R. and Papavasiliou F.N. *Beyond SHM and CSR: AID and related cytidine deaminases in the host response to viral infection*. Adv Immunol, 2007. 94:p.215-244.
231. Rucker J., Samson M., Doranz B.J., Libert F., Berson J.F., Yi Y., Smyth R.J., Collman R.G., Broder C.C., Vassart G., Doms R.W. and Parmentier M. *Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity*. Cell, 1996. 87(3):p.437-446.
232. Rupp R., Rosenthal S.L. and Stanberry L.R. *VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer-microbicide for the prevention of HIV and HSV infection*. Int J Nanomedicine, 2007. 2(4):p.561-566.
233. Sakai Y., Honda M., Fujinaga H., Tatsumi I., Mizukoshi E., Nakamoto Y. and Kaneko S. *Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients*. Cancer Res, 2008. 68(24):p.10267-10279.
234. Sánchez-Nieves J., Perisé-Barrios A.J., Ortega P., Corbí A.L., Domínguez-Soto A., Muñoz-Fernandez M.A., Gómez R. and de la Mata F.J. *Study of cationic carboxilane dendrimers as potential activating stimuli in macrophages*. RSC Adv., 2013. 3:p.23445-23453.
235. Schreiner S.J., Schiavone A.P. and Smithgall T.E. *Activation of STAT3 by the Src family kinase Hck requires a functional SH3 domain*. J Biol Chem, 2002. 277(47):p.45680-45687.
236. Schroder W.A., Major L. and Suhrbier A. *The role of SerpinB2 in immunity*. Crit Rev Immunol, 2011. 31(1):p.15-30.
237. Sciaranghella G., Tong N., Mahan A.E., Suscovich T.J. and Alter G. *Decoupling activation and exhaustion of B cells in spontaneous controllers of HIV infection*. AIDS, 2013. 27(2):p.175-180.
238. Scotton C., Milliken D., Wilson J., Raju S. and Balkwill F. *Analysis of CC chemokine and chemokine receptor expression in solid ovarian tumours*. Br J Cancer, 2001. 85(6):p.891-897.
239. Seidl T., Whittall T., Babaahmady K. and Lehner T. *B-cell agonists up-regulate AID and APOBEC3G deaminases, which induce IgA and IgG class antibodies and anti-viral function*. Immunology, 2012. 135(3):p.207-215.
240. Shamay Y., Shpirt L., Ashkenasy G. and David A. *Complexation of Cell-Penetrating Peptide-Polymer Conjugates with Polyanions Controls Cells Uptake of HPMA Copolymers and Anti-tumor Activity*. Pharm Res, 2013.
241. Shao H., Cheng H.Y., Cook R.G. and Tweardy D.J. *Identification and characterization of signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor*. Cancer Res, 2003. 63(14):p.3923-3930.
242. Shirai A., Cosentino M., Leitman-Klinman S.F. and Klinman D.M. *Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation*. J Clin Invest, 1992. 89(2):p.561-566.
243. Sica A., Larghi P., Mancino A., Rubino L., Porta C., Totaro M.G., Rimoldi M., Biswas S.K., Allavena P. and Mantovani A. *Macrophage polarization in tumour progression*. Semin Cancer Biol, 2008. 18(5):p.349-355.
244. Sica A., Saccani A., Borsatti A., Power C.A., Wells T.N., Luini W., Polentarutti N., Sozzani S. and Mantovani A. *Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes*. J Exp Med, 1997. 185(5):p.969-974.

245. Sica A., Schioppa T., Mantovani A. and Allavena P. *Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy*. Eur J Cancer, 2006. 42(6):p.717-727.
246. Sierra-Filardi E., Puig-Kroger A., Blanco F.J., Nieto C., Bragado R., Palomero M.I., Bernabeu C., Vega M.A. and Corbi A.L. *Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers*. Blood, 2011. 117(19):p.5092-5101.
247. Siewe B., Keshavarzian A., French A., Demarais P. and Landay A. *A Role for TLR Signaling During B Cell Activation in Antiretroviral-Treated HIV Individuals*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2013. 29(10):p.1353-1360.
248. Sindrilaru A., Peters T., Wieschalka S., Baican C., Baican A., Peter H., Hainzl A., Schatz S., Qi Y., Schlecht A., Weiss J.M., Wlaschek M., Sunderkotter C. and Scharffetter-Kochanek K. *An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice*. J Clin Invest, 2011. 121(3):p.985-997.
249. Siveen K.S. and Kuttan G. *Role of macrophages in tumour progression*. Immunol Lett, 2009. 123(2):p.97-102.
250. Solassol J., Crozet C., Perrier V., Leclaire J., Beranger F., Caminade A.M., Meunier B., Dormont D., Majoral J.P. and Lehmann S. *Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie*. J Gen Virol, 2004. 85(Pt 6):p.1791-1799.
251. Solinas G., Germano G., Mantovani A. and Allavena P. *Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation*. J Leukoc Biol, 2009. 86(5):p.1065-1073.
252. Solinas G., Schiarea S., Liguori M., Fabbri M., Pesce S., Zammataro L., Pasqualini F., Nebuloni M., Chiabrando C., Mantovani A. and Allavena P. *Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility*. J Immunol, 2010. 185(1):p.642-652.
253. Sozzani S., Ghezzi S., Iannolo G., Luini W., Borsatti A., Polentarutti N., Sica A., Locati M., Mackay C., Wells T.N., Biswas P., Vicenzi E., Poli G. and Mantovani A. *Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes*. J Exp Med, 1998. 187(3):p.439-444.
254. Stevenson P.G. and Doherty P.C. *Non-antigen-specific B-cell activation following murine gammaherpesvirus infection is CD4 independent in vitro but CD4 dependent in vivo*. J Virol, 1999. 73(2):p.1075-1079.
255. Stokoe D., Stephens L.R., Copeland T., Gaffney P.R., Reese C.B., Painter G.F., Holmes A.B., McCormick F. and Hawkins P.T. *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B*. Science, 1997. 277(5325):p.567-570.
256. Stout R.D. and Suttles J. *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. J Leukoc Biol, 2004. 76(3):p.509-513.
257. Strieter R.M., Burdick M.D., Mestas J., Gomperts B., Keane M.P. and Belperio J.A. *Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis*. Eur J Cancer, 2006. 42(6):p.768-778.
258. Strong D.M., Ahmed A.A., Scher I., Knudsen R.C. and Sell K.W. *Specificity of in vitro murine B cell activation by protein and polysaccharide polymers*. J Immunol, 1974. 113(5):p.1429-1437.
259. Sun Z., Yao Z., Liu S., Tang H. and Yan X. *An oligonucleotide decoy for Stat3 activates the immune response of macrophages to breast cancer*. Immunobiology, 2006. 211(3):p.199-209.
260. Supattapone S., Nguyen H.O., Cohen F.E., Prusiner S.B. and Scott M.R. *Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(25):p.14529-14534.
261. Supattapone S., Wille H., Uyechi L., Safar J., Tremblay P., Szoka F.C., Cohen F.E., Prusiner S.B. and Scott M.R. *Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells*. J Virol, 2001. 75(7):p.3453-3461.
262. Svensson J., Jenmalm M.C., Matussek A., Geffers R., Berg G. and Ernerudh J. *Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10*. J Immunol, 2011. 187(7):p.3671-3682.
263. Swat A., Dolado I., Igea A., Gomez-Lopez G., Pisano D.G., Cuadrado A. and Nebreda A.R. *Expression and functional validation of new p38alpha transcriptional targets in tumorigenesis*. Biochem J, 2011. 434(3):p.549-558.

264. Telwatte S., Moore K., Johnson A., Tyssen D., Sterjovski J., Aldunate M., Gorry P.R., Ramsland P.A., Lewis G.R., Paull J.R., Sonza S. and Tachedjian G. *Virucidal activity of the dendrimer microbicide SPL7013 against HIV-1*. Antiviral Res, 2011. 90(3):p.195-199.
265. Tessier J., Cuvillier A., Glaudet F. and Khamlichi A.A. *Internalization and molecular interactions of human CD21 receptor*. Mol Immunol, 2007. 44(9):p.2415-2425.
266. Thai T.H., Calado D.P., Casola S., Ansel K.M., Xiao C., Xue Y., Murphy A., Frenthewey D., Valenzuela D., Kutok J.L., Schmidt-Supprian M., Rajewsky N., Yancopoulos G., Rao A. and Rajewsky K. *Regulation of the germinal center response by microRNA-155*. Science, 2007. 316(5824):p.604-608.
267. Titanji K., De Milito A., Cagigi A., Thorstensson R., Grutzmeier S., Atlas A., Hejdeman B., Kroon F.P., Lopalco L., Nilsson A. and Chiodi F. *Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection*. Blood, 2006. 108(5):p.1580-1587.
268. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J. and Smith P. *A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules*. Polymer Journal, 1985. 17:p.117-132.
269. Tomalia D.A., Naylor A.M. and Goddard III W.A. *Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter*. Angew. Chem.Int. Edit. Engl, 1990. 29:p.138-175.
270. Torre D., Pugliese A. and Speranza F. *Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe?* Lancet Infect Dis, 2002. 2(5):p.273-280.
271. Trembleau S., Germann T., Gately M.K. and Adorini L. *The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases*. Immunol Today, 1995. 16(8):p.383-386.
272. Tsubata T. *Role of inhibitory BCR co-receptors in immunity*. Infect Disord Drug Targets, 12(3):p.181-190.
273. Turner B.G. and Summers M.F. *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. 285(1):p.1-32.
274. Vacas Cordoba E., Arnaiz E., Relloso M., Sanchez-Torres C., Garcia F., Perez-Alvarez L., Gomez R., de la Mata F.J., Pion M. and Munoz-Fernandez M.A. *Development of sulphated and naphthylsulphonated carbosilane dendrimers as topical microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission*. AIDS, 2013. 27(8):p.1219-1229.
275. van der Made A.W. and van Leeuwen P.W.N.M. *Silane dendrimers*. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1992. (19):p.1400-1401.
276. van Furth R. *Origin and turnover of monocytes and macrophages*. Curr Top Pathol, 1989. 79:p.125-150.
277. van Zelm M.C., Smet J., Adams B., Mascart F., Schandene L., Janssen F., Ferster A., Kuo C.C., Levy S., van Dongen J.J. and van der Burg M. *CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency*. J Clin Invest, 120(4):p.1265-1274.
278. Vanhaesebroeck B. and Alessi D.R. *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. Biochem J, 2000. 346 Pt 3:p.561-576.
279. Verreck F.A., de Boer T., Langenberg D.M., Hoeve M.A., Kramer M., Vaisberg E., Kastelein R., Kolk A., de Waal-Malefyt R. and Ottenhoff T.H. *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(13):p.4560-4565.
280. Verreck F.A., de Boer T., Langenberg D.M., van der Zanden L. and Ottenhoff T.H. *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation*. J Leukoc Biol, 2006. 79(2):p.285-293.
281. Vujcic L.K. and Quinnan G.V., Jr. *Preparation and characterization of human HIV type 1 neutralizing reference sera*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. 11(7):p.783-787.
282. Vulcano M., Albanesi C., Stoppacciaro A., Bagnati R., D'Amico G., Struyf S., Transidico P., Bonocchi R., Del Prete A., Allavena P., Ruco L.P., Chiabrando C., Girolomoni G., Mantovani A. and Sozzani S. *Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo*. Eur J Immunol, 2001. 31(3):p.812-822.
283. Walker F., Nicola N.A., Metcalf D. and Burgess A.W. *Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors*. Cell, 1985. 43(1):p.269-276.

284. Wang Y.Z., Wharton W., Garcia R., Kraker A., Jove R. and Pledger W.J. *Activation of Stat3 preassembled with platelet-derived growth factor beta receptors requires Src kinase activity*. *Oncogene*, 2000. 19(17):p.2075-2085.
285. Weber N., Ortega P., Clemente M.I., Shcharbin D., Bryszewska M., de la Mata F.J., Gomez R. and Munoz-Fernandez M.A. *Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes*. *J Control Release*, 2008. 132(1):p.55-64.
286. Westra J. and Limburg P.C. *p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in rheumatoid arthritis*. *Mini Rev Med Chem*, 2006. 6(8):p.867-874.
287. Wierenga A.T., Vogelzang I., Eggen B.J. and Vellenga E. *Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-, ERK-, and MSK1-dependent pathway*. *Exp Hematol*, 2003. 31(5):p.398-405.
288. Wiktor-Jedrzejczak W., Bartocci A., Ferrante A.W., Jr., Ahmed-Ansari A., Sell K.W., Pollard J.W. and Stanley E.R. *Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(12):p.4828-4832.
289. Wright D.N., Nelson R.P., Jr., Ledford D.K., Fernandez-Caldas E., Trudeau W.L. and Lockey R.F. *Serum IgE and human immunodeficiency virus (HIV) infection*. *J Allergy Clin Immunol*, 1990. 85(2):p.445-452.
290. Xia Y. and Schneyer A.L. *The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function*. *J Endocrinol*, 2009. 202(1):p.1-12.
291. Xu Z., Pone E.J., Al-Qahtani A., Park S.R., Zan H. and Casali P. *Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination*. *Crit Rev Immunol*, 2007. 27(4):p.367-397.
292. Yamashita M., Iwama N., Date F., Shibata N., Miki H., Yamauchi K., Sawai T., Sato S., Takahashi T. and Ono M. *Macrophages participate in lymphangiogenesis in idiopathic diffuse alveolar damage through CCL19-CCR7 signal*. *Hum Pathol*, 2009. 40(11):p.1553-1563.
293. Yamashita U. and Kuroda E. *Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production*. *Crit Rev Immunol*, 2002. 22(2):p.105-114.
294. Yin J., Ma Z., Selliah N., Shivers D.K., Cron R.Q. and Finkel T.H. *Effective gene suppression using small interfering RNA in hard-to-transfect human T cells*. *J Immunol Methods*, 2006. 312(1-2):p.1-11.
295. Zan H. and Casali P. *Regulation of Aicda expression and AID activity*. *Autoimmunity*, 2013. 46(2):p.83-101.
296. Zarubin T. and Han J. *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. *Cell Res*, 2005. 15(1):p.11-18.
297. Zhang Q.W., Liu L., Gong C.Y., Shi H.S., Zeng Y.H., Wang X.Z., Zhao Y.W. and Wei Y.Q. *Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature*. *PLoS One*, 2012. 7(12):p.e50946.
298. Zhou J., Neff C.P., Liu X., Zhang J., Li H., Smith D.D., Swiderski P., Aboellail T., Huang Y., Du Q., Liang Z., Peng L., Akkina R. and Rossi J.J. *Systemic administration of combinatorial dsRNAs via nanoparticles efficiently suppresses HIV-1 infection in humanized mice*. *Mol Ther*, 2011. 19(12):p.2228-2238.

8. Anexo

Una parte de los resultados descritos en esta Memoria han sido recogidos en las siguientes publicaciones, de las que también se adjuntan los documentos en este anexo.

Perisé-Barrios AJ, Muñoz-Fernandez MA and Pion M. “*Direct phenotypical and functional dysregulation of primary human B cells by human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in vitro*”. PLoS One. 2012;7(7):e39472.

Sánchez-Nieves J*, Perisé-Barrios AJ*, Ortega P, Corbí AL, Domínguez-Soto A, Muñoz-Fernandez MA, Gómez R and de la Mata FJ “*Study of Cationic Carbosilane Dendrimers as Potential Activating Stimuli in Macrophages.*” RSC Adv., 2013. DOI: 10.1039/C3RA43338B (* co-autores).

Actualmente se encuentran en proceso de escritura o a la espera de ser aceptados, los siguientes artículos:

Perisé-Barrios AJ*, Jimenez JL*, Domínguez-Soto A, de la Mata FJ, Corbí AL, Gomez R, Muñoz-Fernandez MA. “*Improvement of carbosilane dendrimers as gene delivery agents for the treatment of HIV-1 infection*”. (* co-autores). (Enviado a Journal Control Release).

Perisé-Barrios AJ, Correa-Rocha R, Muñoz-Fernandez MA and Pion M “*HIV-1 induces B-cell activation and AID expression through SYK and JNK pathway in vitro*”. (En proceso de escritura).

Perisé-Barrios AJ, Domínguez-Soto A, de la Mata FJ, Corbí AL, Gomez R, Muñoz-Fernandez MA. “*Polyanionic carbosilane dendrimer as topical micribicide: pivotal role of macrophages*”. (En proceso de escritura).

Perisé-Barrios AJ, Sánchez-Nieves J, Gómez R, Corbí AL, de la Mata FJ, Domínguez-Soto A, Muñoz-Fernández MA. “*Switch from tumor-promoting macrophages to macrophages with antitumor function induced by carbosilane dendrimer*”. (En proceso de escritura).

Direct Phenotypical and Functional Dysregulation of Primary Human B Cells by Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 *In Vitro*

Ana Judith Perisé-Barrios¹, María Ángeles Muñoz-Fernandez^{1,2}, Marjorie Pion^{1*}

1 Laboratorio Inmuno-Biología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, **2** Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (RETIC), Red de Investigación Sanitaria (RIS) HIV-Vaccine group, Madrid, Spain

Abstract

Background: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces a general dysregulation of immune system. Dysregulation of B cell compartment is generally thought to be induced by HIV-related immune activation and lymphopenia. However, a direct influence of HIV-1 particles on B cells was recently proposed as the third pathway of B cells dysregulation.

Methods/Principal Findings: We evaluated the direct and specific consequences of HIV-1 contact on activation, survival, proliferation and phenotype of primary B cells *in vitro*. Moreover, we examined expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA that is responsible for class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM). Here, we report that changes observed in cellular proliferation, phenotypes and activation of B cells could be caused by direct contact between HIV-1 particles and primary B cells *in vitro*. Finally, direct HIV-1-derived B cells activation led to the increase of AID mRNA expression and its subsequent CSR function was detected *in vitro*.

Conclusion/Significance: We showed that HIV-1 could directly induce primary B cells dysregulation triggering phenotypical and functional abilities of B cells *in vitro* that could explain in some extent early B-cell abnormalities in HIV disease.

Citation: Perisé-Barrios AJ, Muñoz-Fernandez MÁ, Pion M (2012) Direct Phenotypical and Functional Dysregulation of Primary Human B Cells by Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 *In Vitro*. PLoS ONE 7(7): e39472. doi:10.1371/journal.pone.0039472

Editor: Derya Unutmaz, New York University, United States of America

Received: January 30, 2012; **Accepted:** May 21, 2012; **Published:** July 2, 2012

Copyright: © 2012 Perisé-Barrios et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fondos de Investigación Sanitaria (FIS P509/02523), Subprograma Ramon y Cajal (RYC-2009-05486), Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria ISCIII (RETIC RD06/0006/0035), Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España (FIPSE 240800/09). AJPB was supported by INTRASALUD (PI09/02029). The authors thank Dr. Rafael Correa Rocha (Fondo de Investigación Sanitaria (CP07/00117)) who provided statistical analysis support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: marjorie.pion@salud.madrid.org

Introduction

B cells are a critical component of the adaptive immune system, by producing highly specific antibodies and by establishing a CD27+ memory B cells. They are providing a specific and a long-term protection from an extensive range of pathogens [1,2]. During HIV infection and in humoral immunity context, initial observations revealed that patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) could exhibit hyperimmunoglobulinemia, increasing expression of cell-activation markers, depletion of memory B cells inducing ineffective recall responses, polyclonal B-cell hyperactivity, and altered differentiation of naïve B cells that could result in impaired immunoglobulin class switch recombination (CSR), and thus production of nonspecific immunoglobulin (IgG, IgE and IgA antibodies [3,4,5,6,7,8]. All of these processes finally provoke defective responses to opportunistic pathogens and vaccines [7,9]. The final step of this general B cells dysregulation could be the exhaustion of B cells compartment [10]. In general, HIV-1-related humoral defects are thought to originate from general immune activation and from the progressive CD4+ T cells lymphopenia since optimal and specific B cell activation needs B and T cells contact

[11,12,13]. Until now, restoration of CD4+ T cells by antiretroviral therapy has not fully re-established antigen-specific IgG, IgE and IgA responses and memory B cells [14,15,16,17], which suggests an additional B cells dysregulation pathway. Consistent with that possibility, few articles have shown that some viral proteins could be directly implicated in B cells dysfunction through gp120:DC-SIGN interactions, HIV-1 Nef delivered to B cells via infected macrophages, through mannose C-type lectin receptors or through CD21 [18,19,20,21,22,23]. Moreover, complement receptor CD21 could not only bind HIV-1 *in vitro* and *in vivo* but could as well facilitate CD4+ T cells infection since B cells-associated HIV-1 is far more infectious for T cells than is free virus [22,24,25]. In consequence, and without evidence of direct infection, B cells could directly be dysregulated by HIV-1, if cells transport HIV-1 particles attached at their surface. How HIV-1 permits to dysregulate indirectly or directly B-cell *in vivo*, it is not still well defined albeit incorporation of CD40L into virion membrane during HIV budding could be one the B-cell activation process [26,27,28]. In fact, it is not completely clear if only CD40L-associated with HIV-1 or other human or viral compounds could be involved in general B cells dysregulation and thus helping the HIV-1 spreading in patients.

In this study, we first confirmed the rapid phenotype dysregulation and activation of peripheral primary B cells after direct HIV-1 contact. We then examined the survival rate of HIV-associated B cells when cultured *in vitro*. Interestingly, human primary B cells survival rate and cellular proliferation were increased when B cells were put in contact with HIV-1. Moreover, expression level of AID mRNA in human primary B cells was highly increased and its subsequent IgM/IgE; IgM/IgA and IgM/IgG class switch was detected *in vitro*. These results may highlight a possible relation between HIV-1 infection and B cells hyperactivation, loss of memory B cells or hyperglobulinemia.

Results

B Cells Survival *in vitro*

After B cells isolation from PBMC of healthy volunteers, B cells were cultured *in vitro* in culture medium with or without stimulant factors. Percentages of living cells were followed by 7-AAD labeling by flow cytometry [29]. As expected the half-life of non-treated B cells culture was rather short. Surprisingly, after 6 days of treatment B cells survival was better when cells were treated with HIV-1, with CD40L/IL-4 or with LPS/IL-4 where an average of 40–60% of living B cells in comparison with boiled HIV-1 condition (corresponding to denatured HIV-1-derived antigens) or with non-treated cells (Figure 1A) as NT condition at day 1 corresponded to 100% of B-cell survival. We produced HIV-1 into cells MT2 that did not contain CD40L, confirmed by flow cytometry (Figure S1). Therefore, the HIV-1 produced was free of CD40L at their surface. Thus, a better B cells survival related to HIV-1 was not due to the presence of CD40L at the surface of virions.

To know if this survival rate was due to a resistance to apoptosis or to proliferation, we had submitted B cells to a CFSE pre-treatment before cultivating them. Proliferation was followed by the loss of CFSE signal by flow cytometry (Figure S2). Proliferation was detected at day 6 when B cells were treated with HIV_{NL4-3} but not when treated with LPS/IL-4 (Figure 1B). It was interesting to note that CD40L/IL-4 induced a slight proliferation even non significant of B-cell in comparison to NT condition (6.06±1.90% and 3.25±1.00% respectively) that could be considered as residual loss of CFSE. Summarizing, although LPS/IL-4 and CD40L/IL-4 treatments caused a better B cells survival in comparison with non-treated cells, B cells did not show a proliferation profile suggesting that survival signal pathways initiated by HIV_{NL4-3} or LPS/IL-4 could be independent.

B Cells Activation

We researched whether the increased survival ability was associated with the cellular activation. We compared the expression of B cells surface activation markers CD69 and CD71 by flow cytometry. B cells treated with HIV_{NL4-3} exhibited higher expression of CD69 and CD71 very early after activation at 24 h post-culture (Figure 2A) (83.82±2.90% and 49.16±6.38% of positive cells for 125 ng of p24^{gag}, Table S1, Figure 2B) that was significantly different in comparison with non-treated B cells (42.44±3.50% of positive cells for CD69 and 9.57±0.84% positive cells for CD71, Figure 2B; Table S1). After 4 days of treatment, expression level of CD69 and CD71 were still significantly higher when B cells were treated with HIV_{NL4-3} when compared with non-treated or in mock treated cells (Figure 2B; Table 1).

To confirm that B cells activation was due to direct HIV particles contact with B cells, we treated virus stock with different concentration of anti-HIV neutralizing serum for 1 h before B cells treatment. HIV_{NL4-3} treatment with anti-HIV serum

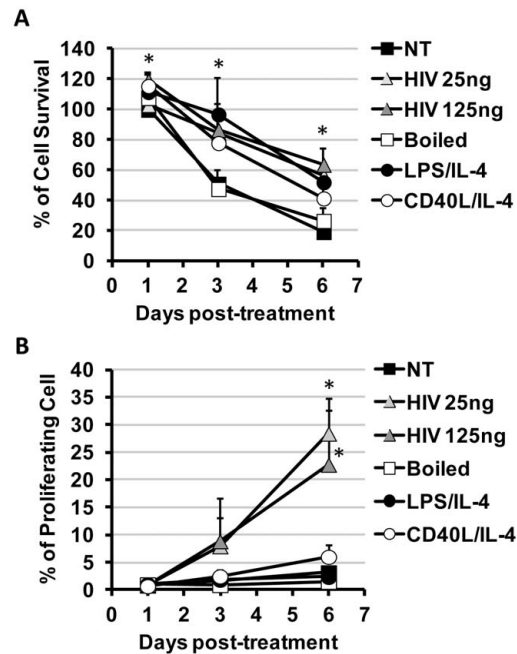


Figure 1. B cells survival and proliferation. B cells survival (A) and proliferation (B) were followed *in vitro*. (A) B cells were non-treated (NT) or treated with HIV_{NL4-3} at 25 ng or 125 ng of p24^{gag}, with 125 ng of p24^{gag} boiled HIV_{NL4-3}, with CD40L/IL-4 or with LPS/IL-4. After 1, 4 and 6 days of culture, cells were collected and labeled with 7AAD, % of living cells were quantified in 7AAD negative population and % of cell survival was calculated as = (treated living cells / NT living cell at day 1 *100). (+SD; * = p<0.05 for both HIV-treatment conditions, LPS/IL-4 and CD40L/IL-4 conditions in comparison to NT condition). (B) After 1, 3 or 6 days post-treatment, percentage of proliferation was detected in CFSE-labeled B cells as the percent of B cells that lost their CFSE staining (See Figure S2). (+SD; * = p<0.05 for both HIV-treatment conditions in comparison to NT condition). Mean of 7 experiments (125ng of p24^{gag}, 125ng of p24^{gag} boiled HIV_{NL4-3} or LPS/IL-4 condition), of 5 experiments (CD40L/IL-4 condition) or 12 experiments (NT or 25 ng of p24^{gag} conditions) shown. doi:10.1371/journal.pone.0039472.g001

permitted to partially reverse B cells activation induced by non-treated HIV_{NL4-3} particles (Figure 2C). With the higher anti-HIV concentration serum, we reached around 30% of significant reversion for CD69 marker expression and more than 58% of reversion for CD71 marker expression (Figure 2C). Summing up, our data indicate that HIV_{NL4-3} have the ability to induce cellular activation detected by the increase of markers CD69 and CD71 expression at the surface of primary B cells *in vitro*. Moreover, this activation is restricted to HIV_{NL4-3} treatment for CD71 activation marker and restricted to HIV_{NL4-3}, LPS/IL-4 and CD40L/IL-4 for CD69 marker suggesting that LPS/IL-4, CD40L/IL-4 or HIV-derived cellular activation could act through independent pathways.

B Cells Phenotype Dysregulation *in vitro*

We determined whether the HIV_{NL4-3} or other stimuli could influence phenotype apart from activation markers at the surface of the B cells. We compared the expression of B cells surface

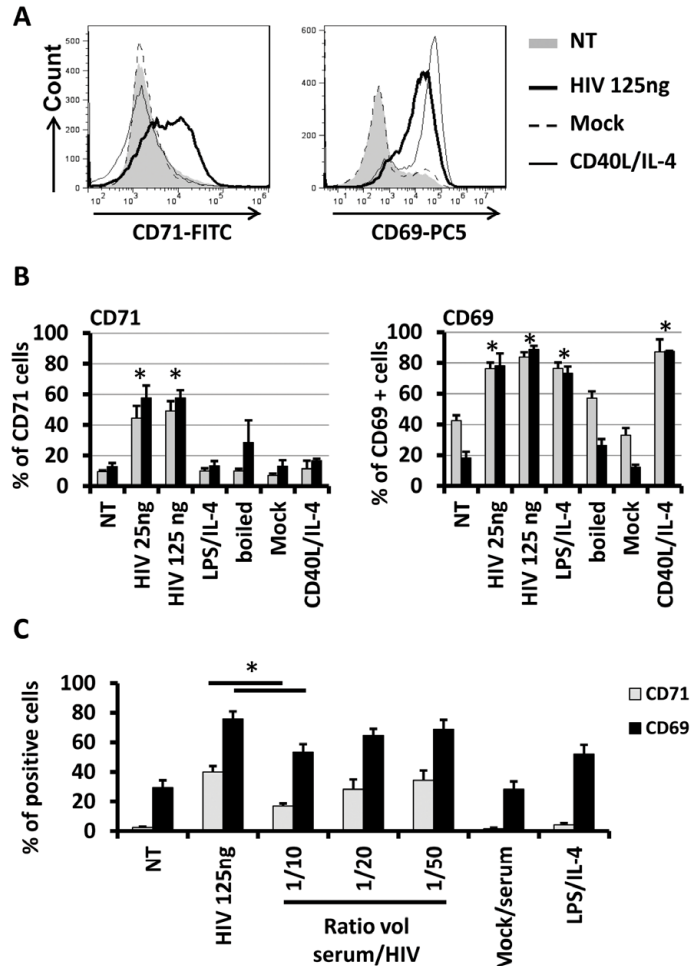


Figure 2. Expression of activation markers on B cells. (A) Histogram plots of CD71 (left panel) and CD69 (right panel) expression markers at the surface of B-cell. (B) B cells were NT or treated with 25 ng and 125 ng of p24^{gag} of HIV_{NL4.3}, with 125 ng of p24^{gag} of boiled-HIV_{NL4.3}, with 125 ng of p24^{gag} of LPS/IL-4, mock-treated or treated with CD40L/IL-4. At day 1 (grey bars) or day 4 (black bars) post-treatment, CD71 and CD69 surface markers were followed by flow cytometry. Mean of 7 individuals donors excepted for mock and CD40L/IL-4 conditions (3 individuals donors) (\pm SD; * = $p < 0.05$ in comparison to NT for day 1 or 4 post-treatment). Mock corresponded to the supernatant of MT2 non-infected cells. (C) B cells were NT or treated with 125 ng of p24^{gag} of HIV_{NL4.3}, with 125 ng of p24^{gag} of HIV_{NL4.3} treated with anti-HIV serum (Vol/Vol), mock-treated/anti-HIV serum or treated with LPS/IL-4. At day 1 post-treatment percentage of CD71 and CD69 were followed by flow cytometry. Mean of 3 individuals donors is represented (\pm SD; * = $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0039472.g002

markers CD21hi, CD10, CD27 and CD20 (as described in Figure S3) or of differentiation markers CD24hi or CD38hi after treatments. B cells treated with 125 ng of p24^{gag} HIV_{NL4.3} showed significant changes in immature subpopulation at 24 h of treatment (Table S1). Significant changes were detected essentially after 4 days of culture. Immature and naïve mature B-cell subpopulations were increased after 4 days of HIV_{NL4.3} treatment, while activated mature, resting memory and exhausted tissue like memory subpopulations showed a significant decrease in comparison with non-treated B cells (Table 1).

Because phenotype reversion from more differentiated B cells such as exhausted tissue like memory B cells through less differentiated B cells such as immature and naïve mature cells were surprising, we checked the percentage of each markers expression at the surface of B cells. At 4 days post-treatment, expression of CD21hi was significantly higher when cells were treated with 125 ng of p24^{gag} of HIV_{NL4.3} in comparison with non-treated cells or mock condition ($73.58 \pm 5.99\%$, $46.43 \pm 4.31\%$ and $61.38 \pm 7.00\%$, respectively). Moreover, CD27+ populations were decreased after 4 days of treatment ($9.85 \pm 3.24\%$ for the

Table 1. B-cell subpopulations after 4d of HIV_{NL4-3} treatment.

Percentage of B-cell populations after 4 days of contact with HIV _{NL4-3}						
B-cell populations	NT	125 ng-HIV	Mock SN	boiled-HIV	LPS/IL-4	CD40L/IL-4
<i>Multiple labelling</i>						
Immature	2.68 ^d (+0.67)	16.06 ^{ab} (+3.58)	2.23 ^a (+0.40)	3.84 ^a (+1.35)	2.66 ^a (+1.03)	2.27 ^a (+0.79)
Naive mature	16.53 ^d (+2.95)	42.08 ^{ab} (+5.85)	31.29 ^a (+5.91)	20.87 ^a (+4.29)	10.11 ^a (+3.75)	13.83 ^a (+2.05)
Activated mature	13.28 ^d (+0.60)	1.59 ^{ab} (+0.65)	9.05 ^a (+1.73)	7.93 ^a (+1.14)	18.01 ^a (+2.36)	17.35 ^a (+1.24)
Resting memory	19.89 ^d (+2.48)	4.32 ^{ab} (+1.06)	22.14 ^a (+4.76)	25.28 ^a (+5.31)	19.28 ^a (+4.51)	19.32 ^a (+3.24)
Exhausted tissue like memory	28.98 ^d (+3.12)	13.46 ^{ab} (+3.04)	24.06 ^a (+3.59)	19.99 ^a (+3.97)	23.96 ^a (+3.01)	30.18 ^a (+1.82)
Plasmablast	0.65 ^d (+0.21)	0.33 ^a (+0.14)	1.35 ^a (+0.95)	0.36 ^a (+0.14)	0.80 ^a (+0.22)	1.11 ^a (+0.33)
<i>Single labelling</i>						
CD27+	39.91 ^f (+3.81)	9.85 ^{af} (+3.24)	35.64 ^a (+5.46)	39.17 ^b (+6.83)	32.83 ^d (+6.42)	44.57 ^a (+6.95)
CD21hi	46.43 ^e (+4.31)	73.58 ^{ab} (+5.99)	61.38 ^a (+7.00)	61.21 ^a (+8.46)	37.28 ^b (+6.57)	40.58 ^a (+4.11)
CD10+	16.22 ^e (+2.28)	22.90 ^e (+4.17)	8.58 ^a (+2.13)	15.82 ^a (+3.35)	19.21 ^b (+4.27)	14.60 ^a (+1.93)
CD71+	7.44 ^f (+1.67)	56.12 ^{af} (+3.89)	6.63 ^a (+1.69)	12.48 ^a (+4.58)	8.44 ^c (+2.09)	10.54 ^a (+1.66)
CD69+	27.93 ^f (+4.31)	93.65 ^{af} (+2.00)	18.44 ^a (+1.91)	26.27 ^a (+5.85)	80.71 ^{ac} (+6.98)	90.35 ^{ab} (+4.85)
CD24hi	22.41 ^a (+1.16)	8.96 ^{ab} (+1.31)	21.05 ^a (+3.06)	ND	ND	18.44 ^a (+3.25)
CD38hi	5.56 ^a (+0.56)	19.19 ^a (+9.18)	25.19 ^{ab} (+3.88)	ND	ND	9.38 ^a (+2.53)

Expression of cell surface markers and B-cell subpopulations size on B cells at 4 days post-treatment. Average percentage of cell surface markers and B-cell subpopulations size on NT B cells or treated with 125 ng of p24^{gag} of HIV_{NL4-3}, Mock, boiled-HIV_{NL4-3}, LPS/IL-4 and CD40L/IL-4 after 4 days of treatment. Results obtained from at least 4(^a), 5 (^b), 7 (^c), 8 (^d), 10 (^e), and 12 (^f) individual donors (\pm SEM). NT for non-treated B cells, ND for Non-Determined (*; p<0.05 in comparison to NT). doi:10.1371/journal.pone.0039472.t001

condition 125 ng of p24^{gag} of HIV_{NL4-3}, 39.91 \pm 3.81% for NT cells and 35.64 \pm 5.46% for the mock condition; Table 1). Finally, after 4 days of treatment, expression of the differentiation marker CD24hi was significantly lower when B cells were treated with 125 ng of p24^{gag} of HIV_{NL4-3} in comparison to non-treated or to the mock conditions (8.96 \pm 1.31%, 22.41 \pm 1.16% and 21.05 \pm 3.06% of positive cells, respectively; Table 1).

Summing up, we observed that the size of each B-cell subpopulations was modified when cells were subjected to HIV_{NL4-3} after 24 h or more deeply after 4 days of treatment. These B-cell subpopulation categories were directed from a major presence of less differentiated B cells subpopulations and minor end-differentiated B-cell populations. These unexpected results seemed to be essentially due to the increased presence of CD21hi and CD10 and loss of CD27 markers when B cells were treated with HIV_{NL4-3}.

AID Expression Dysregulation in *in vitro* B Cells Culture

Given that activation of B cells is a normal process during pathogens infection and that activation precedes CSR and SHM processes induced by AID over-expression, we determined AID mRNA expression in B cells cultured *in vitro* by real-time PCR. mRNA from primary B cells cultured *in vitro* were extracted at 24 h after B cells treatment and only mRNAs showing a poor degradation profile were subjected to real-time PCR and AID mRNA expression levels were quantified. As shown in Figure 3A, HIV_{NL4-3} induced AID mRNA up-regulation after 24 h of treatment, B cells expressed an average of 10 times fold more AID mRNA than non-treated B cells (Figure 3A). Lack of mRNA AID induction in B cells when cells were treated with boiled-HIV_{NL4-3} showed that a full integrity of the virus particles was necessary to induce AID mRNA expression. Summing up, B cells showed an increased expression of AID mRNA that was comparable to LPS/IL-4 treatment very quickly after treatment with HIV_{NL4-3} particles.

AID and CSR in *in vitro* B Cells Culture

We researched whether the increased AID mRNA expression level was associated with CSR and with the production of Igs in culture supernatant. Thus, we quantified IgG, IgA and IgE in the supernatant of the B cells culture after 5 days or treatment. IgG was detected on 10/10 of experiments and a slight non-significant increase was detected on supernatant of B cells culture when B cells were treated with 25 ng of p24^{gag} of HIV_{NL4-3} (Figure 3B). IgA was detected only in 2/10 experiments with a low level of IgA production (Figure 3C). On both positive experiments, only one showed increased level of IgA when cells were treated with HIV_{NL4-3} in comparison to non-treated condition. However, IgA level was increased in the same 2 experiments when cells were treated with LPS/IL-4. Finally, IgE was detected only in 4/10 experiments although with very low level of detection, less than 3 ng/ml (Figure 3D). Interestingly, on 4 experiments 2 showed undetectable level of IgE for non-treated condition, but exhibited positive level when treated with HIV_{NL4-3} (Figure 3D). Due to the low level of IgA and IgE detected in cell culture's supernatant and because 5 days of incubation could be considered too short to induce detectable level of Igs in the supernatant of culture, we decided to label intracellularly treated B cells with CD19, IgM, IgD, IgA, IgE and IgG. Because great majority of changes for IgD and IgM expression levels were observed at the MFI level, we decided to quantify the integrated MFI that permitted us to analyze changes on percentage of positive cells for the studied marker and its MFI (iMFI = % of positive cells *MFI). Total IgM or IgD levels in CD19+ B cells treated with HIV_{NL4-3} were not significantly different in comparison with non-treated or mock conditions (Figure 4A). Only LPS/IL-4 and CD40L/IL-4 treatment induced significant changes for IgM expression level but not for the IgD expression level (Figure 4A). Figure S4 showed histogram plots of 2 representative donors for intracellular IgG, IgA and IgE markers. LPS/IL-4 treatment of B cells induced a significant change in CD19+/IgA, IgG and IgE expression levels

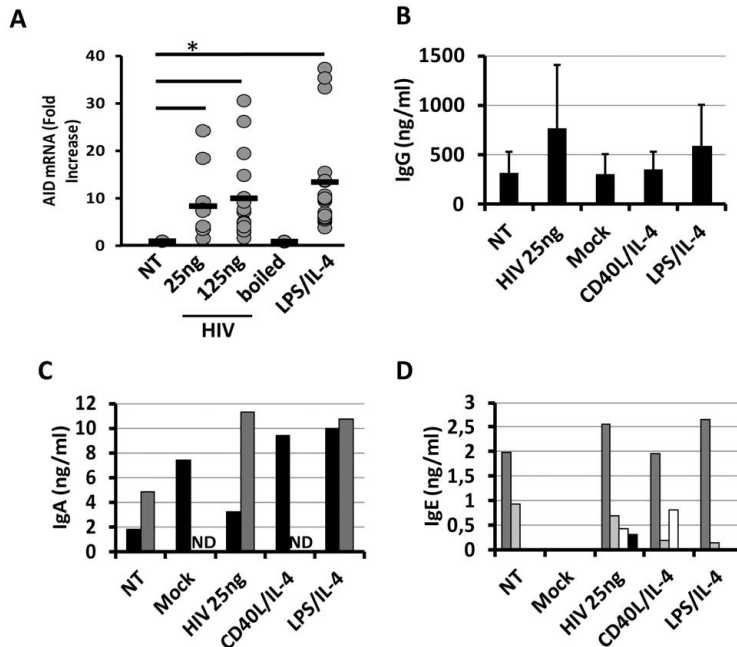


Figure 3. AID mRNA expression in B cells and Igs production. (A) AID mRNA expression was quantified at 24 h post treatment in B cells. NT or treated B cells were cultured *in vitro* and mRNA was extracted and AID mRNA expression was quantified by real-time PCR. Fold increase was calculated as ratio of AID mRNA expression in comparison to NT condition. Each grey dot represents one experiment. Black bar represent average fold increase. (* = $p < 0.05$). IgG (B), IgA (C) and IgE (D) production were quantified in cell culture supernatant by ELISA kit. (B) Mean of 10 experiments was represented (+5SD). (C, D) Only experiments with detectable level of IgA or IgE was shown where each bar represent the result obtained for one individual donor. (ND: not determined). doi:10.1371/journal.pone.0039472.g003

in comparison to mock treated cells (Figure 4B). As previously described, CD40L/IL-4 treatment was inducing significant changes in CD19+/IgG and IgA expression level in comparison to non-treated or mock conditions (Figure 4B, Figure S4A-B) [30,31]. Finally, B cells treatment with HIV_{NL4-3} induced only the significant increase of the IgE+ in CD19+ B cells ($9.74 \pm 1.89\%$ in comparison to non-treated condition that showed $2.91 \pm 0.18\%$ of CD19+/IgE+, Figure S4C and Figure 4B). Summing up, HIV_{NL4-3} treatment seemed to be able to induce significant IgE expression whereas CD40L/IL-4 or LPS/IL-4 treatment induced significant increased production of IgG or IgA.

Discussion

The objective of this study was to determine if HIV-1 particle by itself could affect key properties of human primary B cells. Summing up, we have found that these functional features of human primary B cells *in vitro* were adversely affected by the direct interaction with HIV_{NL4-3} particles.

Since several publications have shown that functional human surface markers CD40L could be found at the surface of the HIV-1, incorporated into HIV-1's envelope membrane upon viral budding from infected cells [27], we determined presence of CD40L on virus producing cells and conclude that our HIV_{NL4-3} particles could not bear CD40L at their surface. Moreover, using as control HIV_{NL4-3} particles treated with a neutralizing serum anti-HIV-1 that blocked HIV-1 epitopes, we can assume that

HIV-1 particles could directly activate B cells *in vitro* and be responsible for the increase of AID mRNA expression. As a consequence, our results of B cells dysregulation could not be explained by the presence of CD40L that is in contradiction with some articles that shown that B-cell activation is essentially due to the presence of CD40L at the surface of HIV-1 particles [26,28]. Regarding our results we proposed that B cells could be activated, could express AID mRNA and could induce CSR in some extend independently of the CD40L/CD40 activation pathway. In B-cell/HIV-1 literature, some viral proteins were found to be bound to DC-SIGN, to CD21 or to mannose C-type lectin receptors thus our results showing importance of a native form of HIV-1 particles and its proteins could be explained by the necessity of viral particles to bound one or various cellular markers. However, we cannot rule out the possibility that other cellular factors present at the surface of HIV-1 particles could play a role in B-cell activation. Further experiments would be necessary to determine, which viral or cellular proteins are necessary for this strong B-cell activation described in this work.

We assume that results of activation, proliferation and differentiation found in this work could be associated to the non-antigenic stimulation of B cell regardless lymphocyte interaction as already determined *in vitro* [32,33,34]. In our study and in addition of rapid B cells activation and cellular proliferation, HIV-1 particles induced a dysregulation of B-cell phenotype such as lost of memory (CD27+) B cells. The loss of CD27 in B cells could

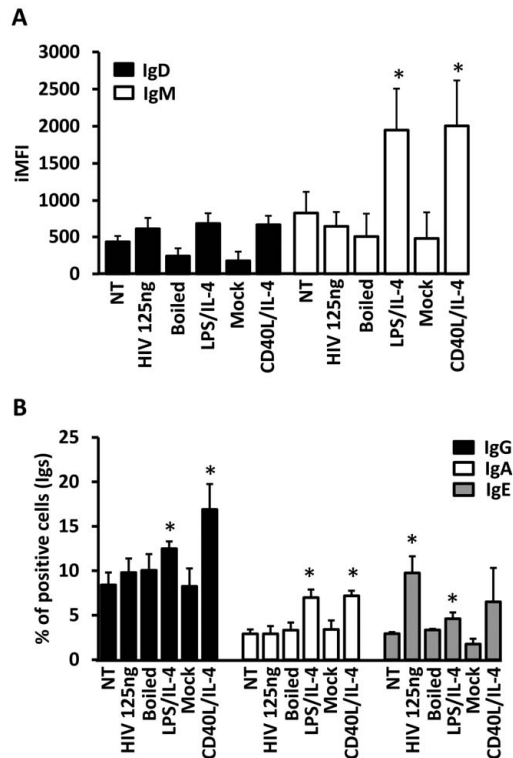


Figure 4. Class switch detected by intracellular labeling in vitro B cells. (A) NT or treated B cells were cultured during 5 days. Intracellular CD19, IgM, IgD (A), IgG, IgA or IgE (B) markers were followed by flow cytometry. (A) IgD and IgM expression levels were followed in CD19+ population by percentage of positive cells for these markers *MFI of the same both markers (=iMFI; integrated MFI). Mean of 5 individual donors (+SEM; * = $p < 0.05$). (B) IgG, IgA and IgE expression levels were followed in CD19+ population by percentage of positive cells for each marker. Mean of 5 individual donors for IgG and IgA and 3 individual donors for IgE (+SEM; * = $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0039472.g004

explain previous results showing a loss of CD27+ memory B cells and a major presence of CD27- (naïve) B cells in HIV-1-infected patients [14,35,36,37]. Moreover, recent article showed that CD27 surface marker used to differentiate naïve from memory B cells should be challenged since CD27- B cells from seropositive patients could produced class switched and somatically hypermutated antibodies during chronic infection [38]. Such type of results was determined in other chronic infection such as hepatitis C virus (HCV) where CD27- B cells population was found increased in peripheral blood of persistently infected patient and where loss of memory B cells subset was due to a downregulation of CD27 expression and not to cell death [37]. Consequently, further experiments should be done in the aim to detect if the loss of some B cells subpopulations is due to the decrease of surface markers or due to selective B-cell subpopulations proliferation versus B-cell death.

Finally, in addition to rapid phenotypic alterations of B-cell subsets, increased expression of mRNA AID in B cells was indeed

followed by subsequent CSR process through expression of IgG, IgE and IgA depending on the stimulation factor. It is important to note that IgE expression upon HIV-1 stimulation was observed when cells were labeled intracellularly and detected in B cells culture supernatants. Importance of these results could be related to the fact that unspecific IgE and IgG production were found in HIV-1 patient developing hyper-immunoglobulinemia E and G, autoimmune diseases and hypersensitivity observed in some HIV-1 patients [6,8,39]. Such patients are then unable to respond correctly to subsequent infections by facilitating the T cell depletion and by the production of autoreactive antibodies. Thus, our model could be essential to study mechanisms of the loss of specific humoral immunity in HIV+ patients independently of CD4+ T cells. Generally, B cells activation related to IgM, IgD or IgG production dictate the extent and efficacy of the antibody response, requiring a multitude of signals, including B-cell receptor activation, CD40 stimulation, and cytokines signals to initiate activation, differentiation, and proliferation. In our study, free of T cells and free of CD40L context, HIV-1 treatment of B-cell could induce cellular activation, proliferation and loss of principal markers of B cells differentiation. We postulate that events described in this work could participate at some extent to the general immune system dysfunction associated with HIV-1 infection. Moreover, the induction of non-antigenic CSR could suggest a limited ability for the host to induce a strong and specific B-cell response to both HIV-1 and other opportunistic pathogens. These findings should be taken in consideration during development of therapeutic HIV vaccines because of the large level of B-cell dysregulation.

Materials and Methods

B Cell Isolation from PBMC

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on a Ficoll-Hypaque density gradient (Rafer, Zaragoza, Spain) from buffy coat obtained from transfusion centers of Albacete and Madrid following national guidelines following the current procedures of Spanish HIV BioBank [40]. B cells were purified using the CD19 MicroBeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), and contamination by other cell types was less than 3% (data not shown). Isolated B cells were cultured with RPMI 1640 medium (Biochrome, Berlin, Germany) supplemented with 5% heat-inactivated FCS, and antibiotics mix (125 µg/mL ampicillin, 125 µg/mL cloxacillin and 40 µg/mL gentamicin; Sigma, St-Louis, MO, USA).

Virus Stock Production

Virus stock HIV_{NL4-3} was produced by infection of MT2 cells (AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: MT-2 from Dr. Douglas Richman [41]) with NL4-3 virus stock coming from previous transient transfection of pNL4-3 in 293T cells (ATCC, [42]). We produced parental X4 tropic HIV_{NL4-3} that encodes all known HIV-1 proteins [43] and physical titers were evaluated by quantification of HIV-1 p24^{gag} by ELISA kit (Innogenetics, Gent, Belgium). Boiled virus was produced by heating HIV_{NL4-3} at 96°C for 10 min to obtain our negative control of activation as denaturated HIV-derived antigens.

Culture and B Cells Treatment

B cells were treated with different amount of p24^{gag} of infectious HIV_{NL4-3} (25 ng or 125 ng of p24^{gag} / 10⁶ B cells). Cells were as well treated with 20 µg/mL of Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) and 20 ng/mL of interleukine 4 (IL-4) (Immunotools,

Friesoythe, Germany) or with 200 ng/ml of CD40L (eBioscience, San Diego, CA, US) and 10 ng/ml of IL-4 as positive controls of activation. Mock condition was defined by the use of non-infected MT2 cells supernatant. Blocking experiments were performed incubating 1/10, 1/20 and 1/50 (vol:vol) of HIV_{NL4-3} for 1 hour at 37°C before B cell treatment with anti-HIV neutralizing serum (AIDS Research and Reference Reagent Program: HIV-1 Neutralizing Serum (specify 1 or 2) from Dr. Luba Vujcic [44]). This serum was tested to neutralize several HIV-1 strains (see aidsreagent.org/reagentdetail.cfm?t=polyclonal_antibodies&id=87). B cells survival was followed by flow cytometry using 0.5 µg/ml of 7-aminocoumarin D (7AAD, Sigma-Aldrich) and B cells proliferation was followed by flow cytometry using 1 µM of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) from CellTrace CFSE cell proliferation kit (Invitrogen, Barcelona, Spain).

Flow Cytometry for B Cells Purity and Phenotype

B cells were analyzed by flow cytometry analysis. Cells were stained for verification of B cells isolation purity along with activation and differentiation markers, with fluorescein (FITC)-labeled monoclonal Abs (MAbs): anti-CD21, anti-CD71, anti-IgD (Beckman Coulter) and anti-IgE (Thermo Scientific, Rockford, IL, US). Phycoerythrin (PE)-labeled MAbs: anti-CD3, anti-CD10, anti-CD27, anti-CD38, anti-CD40L (Beckman Coulter) and anti-IgG (Miltenyi). R phycoerythrin-Texas-Red (named ECD)-labeled MAbs: anti-CD19 and streptavidin-ECD (Beckman Coulter). Biotin-conjugated anti-IgM (Beckman Coulter) this antibody was revealed by streptavidin-PC7 (Beckman Coulter). Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PC5)-labeled MAbs: anti-CD16, anti-CD27, anti-CD24 and anti-CD69 (Beckman Coulter) and anti-IgA (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK). Phycoerythrin-Cyanin 7 (PC7)-labeled MAbs: anti-CD14 and anti-CD20 (Beckman Coulter). Intracellular anti-immunoglobulin labeling was performed with CitoFix/CytoPerm kit (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, US) following manufacturer instructions. Cells were then fixed by adding 2% formaldehyde (Sigma-Aldrich) and analyzed by flow cytometry using a Gallios cytometer and data was analyzed using FlowJo 7.6.1 software (Ashland, OR, USA).

RNA Isolation, AID mRNA Quantification by Real-time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)

RNA was extracted from 2×10^6 cells with the Qiaagen RNeasy Plus mini kit (Qiaagen, Germantown, USA). RNA integrity was analyzed with Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using RNA Nano chips (Agilent Technologies). 100 ng of RNA was reverse transcribed to make cDNA (20 µl total volume) with the GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA). cDNA was used in the Q-PCR reaction with Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The Q-PCR reaction conditions were: 95°C 30 s, 60°C 1 min, 72°C 1 min for 40 cycles. The primers used to amplify mRNA of AID were: Forward Fw-5'-CGCGCCGGGTGCAAATAGCCATC-3', and Reverse Rv-5'-ACAGGGGCAAAGGAT GCGCC-3', and the primers to amplify mRNA of housekeeping were: Fw(YWHAZ)-5'-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA-3', Rv(YWHAZ)-5'-CCGCCAGGACAAACCAGT AT-3', Fw(β2M)-5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3' and Rv(β2M)-5'-TCTCTGCTCCCGACCTCTAAGT-3'. AID mRNA levels detected by Q-PCR were normalized with YWHAZ and β2M, fold change was calculated following the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equation.

Measurement of Igs in Cells Culture Supernatant

Total IgG, IgE and IgA in culture supernatants were measured using a human IgG, IgE and IgA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitation kit (Innovative Research, peary Court Novi, MI, USA), according to the manufacturer's specifications. Plates were read immediately at 450 nm with Synergy 4 reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany).

Statistical Analysis

The comparison between the surface marker levels and B cell subpopulations between non-treated B cells and treated B cells was realized using the non-parametric Mann-Whitney test, because the number of donors was low. All analyses were performed using SPSS 17.0 Inc. (IBM, Chicago, Illinois, USA).

Supporting Information

Figure S1 CD40L expression on MT2 cell line. CD40L expression was quantified by flow cytometry in activated PBMC and MT2 cells. One of 2 representative experiments is shown. Numbers were the percentage of cells positive in each quadrant. (TIFF)

Figure S2 B cell survival and proliferation gating. CFSE-labeled B cells were treated for 6 days with 25 ng of p24⁸⁹⁸ HIV, CD40L/IL-4 or NT. Cells were then labeled with 7AAD and fixed before flow cytometry analysis. Gate and number into the upper panels represent percentage of living cells (L). Cells gated in L were analyzed for CFSE presence (lower panel). Proliferating cells were cells that lost CFSE labeling. (Histogram dark grey: NT condition; light grey: HIV-treatment condition and very light grey: CD40L/IL-4 treated B cells). (TIFF)

Figure S3 B cells subpopulations. Subpopulations of B cells were determined by combination of CD21, CD10, CD27 and CD20 surface markers. CD21 low (gate A) and CD21 high (gate B) populations were first determined. CD21high and CD21low were gated for CD10, CD27 and CD20. Thus, immature B cells (CD21hiCD10+CD27-, gate C), naïve mature (CD21hiCD10-CD27-, gate D), resting memory (CD21hiCD10-CD27+, gate E), activated mature (CD21loCD10-CD27+, gate F), long live plasma cells (CD21loCD10-CD27+CD20-, gate G) and exhausted tissue like memory (CD21loCD10-CD27-CD20+, gate H) subpopulations were detected and quantified by flow cytometry. (TIFF)

Figure S4 Intracellular Igs labeling in B cells. Two individual donors on 5 were represented for intracellular labeling of IgG (A), IgA (B) or IgE (C) after 5 days of treatment. Cells were first gated on CD19+ population. (TIFF)

Table S1 Expression of cell surface markers and B-cell subpopulations size on B cells at 24 h post-treatment. Average percentage of cell surface markers and B-cell subpopulations size on NT B cells or treated with 25 ng or 125 ng of p24⁸⁹⁸ of HIV_{NL4-3}, boiled-HIV_{NL4-3}, and LPS/IL-4 after 24 h of treatment. Results obtained from at least 6^(a), 7^(b) and 10^(c) individual donors (±SEM). NT for non-treated B cells (†; p<0.05 in comparison to NT). (TIFF)

Acknowledgments

We thank Dr. Rafael Correa Rocha (Fondo de Investigacion Sanitaria (CP07/00117)) who provided statistical analysis support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AJPB MP. Performed the experiments: AJPB MP. Analyzed the data: AJPB MAMF MP.

Contributed reagents/materials/analysis tools: AJPB MAMF MP. Wrote the paper: AJPB MAMF MP.

References

- Agematsu K (2000) Memory B cells and CD27. *Histol Histopathol* 15: 573–576.
- Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A (2002) Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298: 2199–2202.
- Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, et al. (1983) Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 309: 453–458.
- Moir S, Fauci AS (2009) B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 235–245.
- Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensen R, Grutzmeier S, et al. (2006) Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* 108: 1580–1587.
- De Milito A, Nilsson A, Titanji K, Thorstensen R, Reizenstein E, et al. (2004) Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* 103: 2180–2186.
- Hart M, Steel A, Clark SA, Moyle G, Nelson M, et al. (2007) Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease. *J Immunol* 178: 8212–8220.
- Wright DN, Nelson RP, Jr., Ledford DK, Fernandez-Galdas E, Trudeau WL, et al. (1990) Serum IgE and human immunodeficiency virus (HIV) infection. *J Allergy Clin Immunol* 85: 445–452.
- Malaspina A, Moir S, Orsega SM, Vasquez J, Miller NJ, et al. (2005) Compromised B cell responses to influenza vaccination in HIV-infected individuals. *J Infect Dis* 191: 1442–1450.
- Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, et al. (2008) Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 205: 1797–1805.
- Martinez-Maza O, Breen EG (2002) B-cell activation and lymphoma in patients with HIV. *Curr Opin Oncol* 14: 528–532.
- Epeldegui M, Vendrame E, Martinez-Maza O (2010) HIV-associated immune dysfunction and viral infection: role in the pathogenesis of AIDS-related lymphoma. *Immunol Res*.
- De Milito A (2004) B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res* 2: 11–21.
- Chong Y, Ikematsu H, Kikuchi K, Yamamoto M, Murata M, et al. (2004) Selective CD27+ (memory) B cell reduction and characteristic B cell alteration in drug-naive and HAART-treated HIV type 1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 219–226.
- Jacobson MA, Khayam-Bashi H, Martin JN, Black D, Ng V (2002) Effect of long-term highly active antiretroviral therapy in restoring HIV-induced abnormal B-lymphocyte function. *J Acquir Immune Defic Syndr* 31: 472–477.
- French M, Keane N, EJ McKinnon EJ, Phung S, Price P (2007) Susceptibility to opportunistic infections in HIV-infected patients with increased CD4 T-cell counts on antiretroviral therapy may be predicted by markers of dysfunctional effector memory CD4 T cells and B cells. *HIV Medicine* 8: 148–155.
- Redgrave BE, Stone SF, French MA, Krueger R, James IR, et al. (2005) The effect of combination antiretroviral therapy on CD5 B- cells, B-cell activation and hypergammaglobulinemia in HIV-1-infected patients. *HIV Med* 6: 307–312.
- Swingler S, Zhou J, Swingler C, Dauphin A, Greenough T, et al. (2008) Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS. *Cell Host Microbe* 4: 63–76.
- Schnittman SM, Lane HC, Higgins SE, Folks T, Fauci AS (1986) Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus. *Science* 233: 1084–1086.
- Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P, Schlaepfer E, Hofer U, et al. (2009) Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* 113: 377–388.
- He B, Qiao X, Klasse EJ, Chiu A, Chadburn A, et al. (2006) HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol* 176: 3931–3941.
- Moir S, Malaspina A, Li Y, Chun TW, Lowe T, et al. (2000) B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med* 192: 637–646.
- Shen X, Tomaras GD (2011) Alterations of the B-cell response by HIV-1 replication. *Curr HIV/AIDS Rep* 8: 23–30.
- Jakubik JJ, Saifuddin M, Takefman DM, Spear GT (2000) Immune complexes containing human immunodeficiency virus type 1 primary isolates bind to lymphoid tissue B lymphocytes and are infectious for T lymphocytes. *J Virol* 74: 552–555.
- Malaspina A, Moir S, Nickle DC, Donoghue ET, Ogwaro KM, et al. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 bound to B cells: relationship to virus replicating in CD4+ T cells and circulating in plasma. *J Virol* 76: 8855–8863.
- Epeldegui M, Thapa DR, De la Cruz J, Kitchen S, Zack JA, et al. (2010) CD40 ligand (CD154) incorporated into HIV virions induces activation-induced cytidine deaminase (AID) expression in human B lymphocytes. *PLoS One* 5: e11448.
- Martin G, Roy J, Barat C, Ouellet M, Gilbert C, et al. (2007) Human immunodeficiency virus type 1-associated CD40 ligand transactivates B lymphocytes and promotes infection of CD4+ T cells. *J Virol* 81: 5872–5881.
- Imbeault M, Ouellet M, Giguere K, Bertin J, Belanger D, et al. (2011) Acquisition of host-derived CD40L by HIV-1 *in vivo* and its functional consequences in the B-cell compartment. *J Virol* 85: 2189–2200.
- Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV (1994) Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 15: 12–20.
- Cerutti A, Zan H, Schaffer A, Bergsagel L, Harindranath N, et al. (1998) CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. *J Immunol* 160: 2145–2157.
- Seidl T, Whittall T, Bahaahmady K, Lehner T (2011) B cell agonists upregulate AID and APOBEC3G deaminases, which induce IgA and IgG class antibodies and anti-viral function. *Immunology*.
- Strong DM, Ahmed AA, Scher I, Knudsen RC, Sell KW (1974) Specificity of *in vitro* murine B cell activation by protein and polysaccharide polymers. *J Immunol* 113: 1429–1437.
- Stevenson PG, Doherty PC (1999) Non-antigen-specific B-cell activation following murine gammaherpesvirus infection is CD4 independent *in vitro* but CD4 dependent *in vivo*. *J Virol* 73: 1075–1079.
- Maddaly R, Pai G, Balaji S, Sivaramakrishnan P, Srinivasan L, et al. (2010) Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation: insights from both *in vivo* and *in vitro* approaches. *FEBS Lett* 584: 4883–4894.
- De Milito A, Morch C, Sonnerborg A, Chiodi F (2001) Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS* 15: 957–964.
- Chong Y, Ikematsu H, Yamamoto M, Murata M, Yamaji K, et al. (2004) Increased frequency of CD27- (naive) B cells and their phenotypic alteration in HIV type 1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 621–629.
- Racanello V, Frassanito MA, Leone P, Galiano M, De Re V, et al. (2006) Antibody production and *in vitro* behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J Virol* 80: 3923–3934.
- Cagigi A, Du L, Dang LV, Grutzmeier S, Atlas A, et al. (2009) CD27(-) B-cells produce class switched and somatically hyper-mutated antibodies during chronic HIV-1 infection. *PLoS One* 4: e5427.
- Moir S, Malaspina A, Ogwaro KM, Donoghue ET, Hallahan CW, et al. (2001) HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10362–10367.
- Garcia-Merino I, de Las Cuevas N, Jimenez JL, Gallego J, Gomez C, et al. (2009) The Spanish HIV BioBank: a model of cooperative HIV research. *Retrovirology* 6: 27.
- Haerle T, Carrera CJ, Wasson DB, Sowers LC, Richman DD, et al. (1988) Metabolism and anti-human immunodeficiency virus-1 activity of 2-halo-2', 3'-dideoxyadenosine derivatives. *J Biol Chem* 263: 5870–5875.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8392–8396.
- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, et al. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59: 284–291.
- Vujcic LK, Quinlan GV, Jr. (1995) Preparation and characterization of human HIV type 1 neutralizing reference sera. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 783–787.

Study of cationic carbosilane dendrimers as potential activating stimuli in macrophages

Cite this: *RSC Adv.*, 2013, 3, 23445

Javier Sánchez-Nieves,^{†ab} A. Judith Peris-Barrios,^{†bc} Paula Ortega,^{ab} Ángel L. Corbí,^d Ángeles Domínguez-Soto,^d M. Ángeles Muñoz-Fernández,^{*bc} Rafael Gómez^{*ab} and F. Javier de la Mata^{*ab}

Cationic carbosilane dendrimers with two ammonium groups per branch $[G_nO_3(SiONN)_m]^{2m+}$ ($n = 1, m = 6$; $n = 2, m = 12$; $n = 3, m = 24$), derived from the 1,3,5-trihydroxybenzene (1,3,5-C₆H₃(OH)₃) core, have been synthesized from reactions of dendrimers functionalized with Si-Cl bonds and the alcohol amine 2-[[2-(dimethylamino)ethyl]methylamino]ethanol (HO(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₂) and further addition of MeI. The cationic dendrimers obtained were soluble in water, although they decomposed slowly in this medium. The toxicity and inflammatory activity of these dendrimers were evaluated in M1 macrophages and the results compared with the known carbosilane dendrimer 2G-NN16, derived from a Si atom core. The data showed good toxicity profiles for dendrimers $[G_nO_3(SiONN)_m]^{2m+}$ of first and second generation and 2G-NN16 and also that these dendrimers are not sensed as activating stimuli for macrophages and, as consequence, they do not cause an inflammatory response.

Received 1st July 2013
Accepted 27th September 2013

DOI: 10.1039/c3ra43338b

www.rsc.org/advances

1. Introduction

Dendrimers are macromolecules with well-defined size and structure, flexibility, monodispersity and multivalent molecular surface^{1–6} that have attracted attention of a diversity of fields,^{3,6–12} as it has been observed that the multivalency raises the activity of the functions attached to the dendrimer with respect to individual molecules (dendritic effect). For biomedicine, this dendritic effect would lead to a stronger interaction of the dendrimer with its surrounding and this property has found a variety of applications.^{13–20} It is generally accepted that the use of dendrimers as therapeutic agents requires, besides low cytotoxicity, adequate solubility in aqueous media.²¹

However, previous studies also warned about the importance of evaluating the inflammatory effect of molecules with a future biological application,²² as this factor will favour infection processes. For that reason, it has been suggested the evaluation of cytokines release to establish the pattern of cytokines, as it can be modified by these kinds of molecules,²³ and will serve as

predictor of safety during the first steps of the evaluation process of any molecule.^{24,25}

Macrophages are widely distributed cells that play a critical role in defence, tissue repair and homeostasis.²⁶ They act as a first line of defence to detect and eliminate foreign particles (microorganisms, toxic macromolecules, damaged or dead cells) by phagocytoses or secretion of enzymes, production of cytokines or reactive oxygen and nitrogen species. There is one main group of macrophages called M1 (classically activated macrophages). During the initial stages of an inflammatory response, polarization takes place and these cells exhibit potent microbicidal properties, and for this reason they are considered to be pro-inflammatory cells.²⁷ It is well known that macrophages secrete cytokines when they are confronted with a pathogen, and in the particular case of M1 macrophages, they have a typical pathogen-stimulated cytokine profile.²⁸

Our group is interested in the applications of carbosilane dendrimers in biomedicine. The framework of these dendrimers is built with low polar bonds such as C-C and C-Si bonds, and as consequence they present high hydrophobicity.^{29,30} However, functionalization of the periphery with very polar moieties has turned them hydrophilic and thus suitable for biomedical applications.^{31–35} We have shown that cationic carbosilane dendrimers are water soluble and could be used as internalizing agents for gene delivery,^{31,36–40} bactericides^{32,33,41} and also showed interactions with drugs,⁴² whereas water soluble anionic carbosilane dendrimers present promising antiviral properties.^{43,44} Others, have decorated the surface of carbosilane dendrimers with carbohydrates and studied their applications in biomedicine.^{35,45–48}

^aDpto. de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, E-28871 Alcalá de Henares (Madrid), Spain. E-mail: javier.delamata@uah.es; rafael.gomez@uah.es; Fax: +34 91 885 4683

^bNetworking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

^cLaboratorio Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón and Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain. E-mail: mmunoz.hgum@salud.madrid.org

^dCentro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

[†] These authors contributed equally to this work.

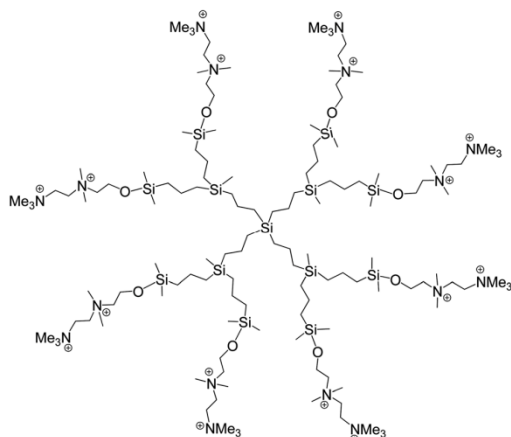


Fig. 1 Drawing of 2nd generation cationic dendrimer derived from Si atom core 2G-ONN16 previously synthesized in our group.³¹

We have previously reported the synthesis of cationic carbosilane dendrimers of generations 1–3 functionalized with diammonium groups at the periphery bonded to the dendrimer through Si–O bonds.³¹ The idea to introduce this system was, on one hand, to give water solubility and, on the other hand, to ease the release of nucleic acid due to the instability of the Si–O bond in aqueous media. However, of the three generations, the first generation turned to be too unstable to carry out any kind of experiments *in vitro*, and the third generation showed solubility problems. Fortunately, we could study second generation dendrimer (named as 2G-ONN16, Fig. 1). These studies showed that the presence of two cationic ammonium groups per branch together with the hydrolysable Si–O bond conferred interesting properties to this dendrimer.^{31,36–38,49–56}

Thus, in this work we have used M1 macrophages as sensor cells to determine whether dendrimers can be detected by the organism as a foreign particle. Here the advantage is that, due to the characteristic of these cells, they respond to most exogenous molecules, causing the release of pro-inflammatory cytokines and finally triggering an inflammatory response. The results have been compared with those obtained using a bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS). LPS is a complex glycolipid composed of a hydrophilic polysaccharide middle and a hydrophobic domain known as lipid A. LPS is a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria and one of the most potent microbial initiators of inflammation.⁵⁷

To carry out this research we have synthesized a new family of carbosilane dendrimers with Si–O bonds at the periphery derived from 1,3,5-trihydroxybenzene (1,3,5-(HO)₃C₆H₃), that introduces rigidity in the core and forces the branches to extend outwards.^{43,58} The aim to obtain a new group of dendrimers is to compare and improve the results yet obtained with the dendrimer derived from a Si atom core with respect to stability and solubility in aqueous media.

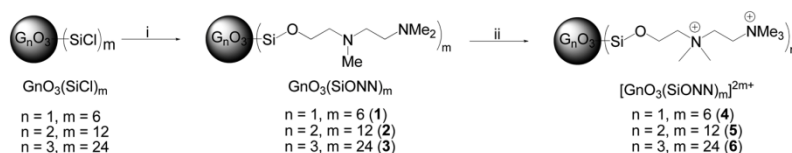
2. Results and discussion

2.1 Synthesis of dendrimers

Reaction of dendrimers decorated with terminal Si–Cl bonds $G_nO_3(SiCl)_m$ ($n = 1, m = 6; n = 2, m = 12; n = 3, m = 24$)⁵⁸ with 2-[[2-(dimethylamino)ethyl]methylamino]ethanol led to the amine dendrimers $G_nO_3(SiONN)_m$ ($n = 1, m = 6$ (**1**); $n = 2, m = 12$ (**2**); $n = 3, m = 24$ (**3**)) (Scheme 1) in high yield (around 85%). The nomenclature employed indicates generation (G_n), core derived from 1,3,5-trihydroxybenzene (O_3) and a periphery functionalized with $mSiO(CH_2)_2N(Me)(CH_2)_2NMe_2$ groups (SiONN). They were obtained as colorless oils soluble in organic solvents, not aliphatic, but unstable toward protic solvents and moisture.

The NMR spectroscopy confirmed the formation of dendrimers **1–3**. The ¹H NMR spectra showed a shifting of the Me groups of terminal SiMe₂ moieties from *ca.* δ 0.35 in the starting compounds $G_nO_3(SiCl)_m$ to *ca.* 0.05 in compounds **1–3**. The integration of the aromatic protons with respect to the new OCH₂ and NMe groups supports the complete derivatization of the starting materials. The carbon atoms of these Me groups were observed at about δ –2.0 in compounds **1–3**, whereas in the precursors were observed about δ 1.9. In the ²⁹Si NMR, the resonance corresponding to the outermost Si–O groups was observed about δ 18, clearly shifted to lower frequency than the signal belonging to the initial SiCl groups (*ca.* 31). Finally, ¹⁵N NMR showed two resonances for the two different N atoms at *ca.* –351.5, for the inner one, and at *ca.* –356.5 for the outer one. Analyses by GPC or MS failed because of the instability of the Si–O bonds.

Neutral dendrimers **1–3** were transformed into cationic ones by addition of excess MeI in THF, obtaining the compounds $[G_nO_3(SiONN)_m]^{2m+}$ ($n = 1, m = 6$ (**4**); $n = 2, m = 12$ (**5**); $n = 3, m = 24$ (**6**)) (Scheme 1) as white solids in high yield about (85%). Compounds **4–6** (Fig. 2) were now soluble in high polar solvents and also in water, although in this medium they decomposed slowly. The quaternization of the N atoms was clearly shown by NMR spectroscopy (DMSO-*d*₆) by the shifting to higher



Scheme 1 Synthesis of neutral and cationic dendrimers. (i) $mHO(CH_2)_2N(Me)(CH_2)_2NMe_2$, excess NEt_3 , Et_2O , r. t., 16 h. (ii) Excess MeI, THF, r. t. 48 h.

frequency of the resonances involved in this change with respect to the neutral compounds. The methyl groups bound to the nitrogen atoms were observed in the ^1H NMR spectra at δ ca.

3.20 and in the ^{13}C NMR spectra at δ ca. 52.0. Similarly, the chemical shifts of the N atoms were detected at δ ca. -326.5 , for the inner one, and at δ ca. -331.5 for the outer one.

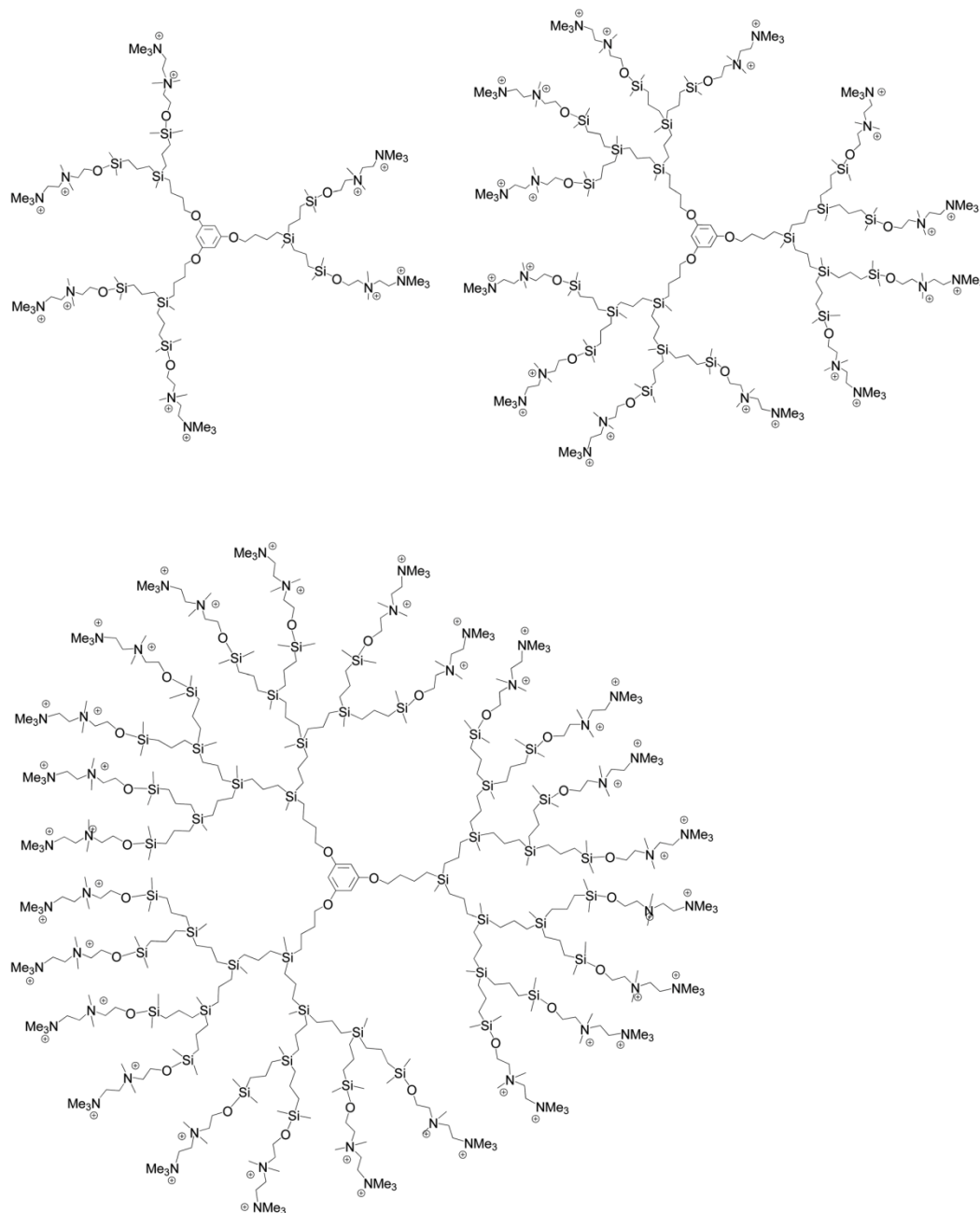


Fig. 2 Drawing of cationic dendrimers synthesized in this work 4–6.

Table 1 Hydrodynamic radii of dendrimers 1–3 and $G_2Si(SiONN)_8$ in $CHCl_3$ at 25 °C

Compound	$G_1O_3(SiONN)_6$	$G_2O_3(SiONN)_{12}$	$G_3O_3(SiONN)_{24}$	$G_2Si(SiONN)_8$
r_H (10^{-9} m)	1.57	1.42	2.95	0.64

2.2 Size of dendrimers by DOSY

To compare the size of the different dendrimers reported in this work among them and with the related dendrimer derived from a Si atom core, we have carried out DOSY NMR experiments (Table 1) to obtain the hydrodynamic radii (r_H) of neutral dendrimers 1–3 and $G_2Si(SiONN)_8$, precursor of cationic 2G-NN16. The cationic dendrimers present aggregation in solution and any comparison would fail. For these experiments we used as internal reference the residual $CHCl_3$ of the deuterated solvent using the approach of Wilkins *et al.*:⁵⁹

$$r_{H(\text{dendrimer})} = \frac{D_{(\text{solvent})}}{D_{(\text{dendrimer})}} \times r_{H(\text{solvent})}$$

where D is the diffusion coefficient obtained from the NMR experiment and $r_{H(\text{solvent})}$ is 2.65 Å.⁶⁰

The results obtained showed that first and second generation dendrimers of polyphenoxo core, with six and twelve functional groups, present similar sizes but are smaller than corresponding third generation dendrimer, with twenty four functional groups. This situation has been found in other dendrimers.^{61,62} However they are clearly bigger than second generation dendrimer derived from Si atom core, with eight functional groups. This difference reflects the higher size and rigidity of the polyphenoxo core, which force the branches of dendrimers to spread away from the core. These results thus offer the possibility to work with different dendrimers that contain the same type of peripheral functionalities but differ in the number of them and also in their size.

3. Biomedical assays

3.1 Cytotoxicity of carbosilane dendrimers

As seen in previous reports, dendrimers can be cytotoxic for the cells in high concentrations. In order to establish the maximum

concentration of a dendrimer that can be used without having any toxic effects, the first step was to evaluate the potential toxicity of cationic dendrimers $[G_nO_3(SiONN)_m]^{2m+}$ ($n = 1, m = 6$ (4); $n = 2, m = 12$ (5); $n = 3, m = 24$ (6)) and 2G-NN16 in M1 macrophage cell cultures (Fig. 3). MTT assays revealed that, after 24 hours, more than 80% of macrophages remained viable when exposed to a 5 μM concentration of cationic dendrimers 4 and 5 (Fig. 3A), and up to 15 μM concentration of the 2G-NN16, whereas dendrimer 6 was clearly more toxic. The cell viability was also studied by flow cytometry analysis, which showed similar values for dendrimers 4 and 5 (Fig. 3B) and slightly lower for 2G-NN16 (10 μM). Accordingly, 5 μM concentrations for dendrimers 4 and 5, and 10 μM for 2G-NN16 were used for all subsequent studies. Due to the high toxicity of the $[G_3O_3(SiONN)_{24}]^{48+}$ dendrimer (6) on treated macrophages, this dendrimer was discarded for subsequent macrophage assays. These data indicate higher level of toxicity for dendrimers derived from the polyphenoxo core 4 and 5, with twelve and twenty four positive charges, with respect to 2G-NN16, with sixteen positive charges. This difference suggests an influence of the core, and hence external charge density, in the toxicity of dendrimers with the same type of functional groups, probably due to the higher exposure of the aromatic core because of its rigidity.⁴³

3.2 Study of macrophages activation

Pro-inflammatory cytokines and chemokines are central to the process of development and maintenance of inflammation. Cytokines are soluble peptides that are involved in many signal transduction pathways regulating cell growth, differentiation and death, as well as recruitment of neutrophils, macrophages, and other cells to specific sites. It has been suggested that several cytokines are involved in particle-induced inflammation.⁶³

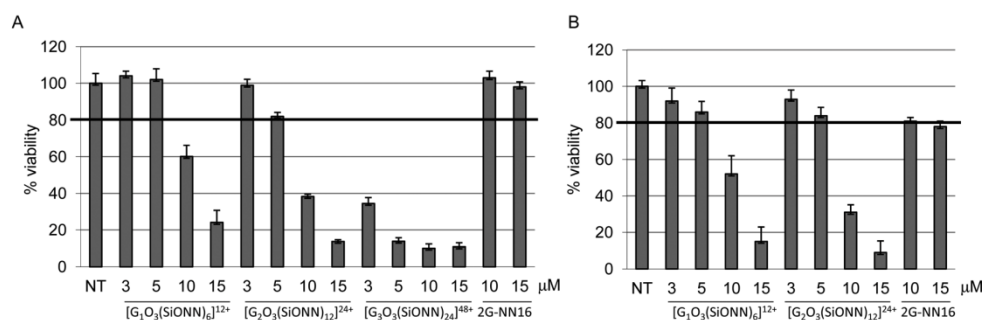


Fig. 3 (A) Dendrimers effect over macrophages viability analyzed by MTT assay. (B) Dendrimers effect over macrophages viability analyzed by flow cytometry assay. Macrophages were treated with dendrimers for 24 hours at different concentrations. This data represents the mean \pm SD from three independent donors.

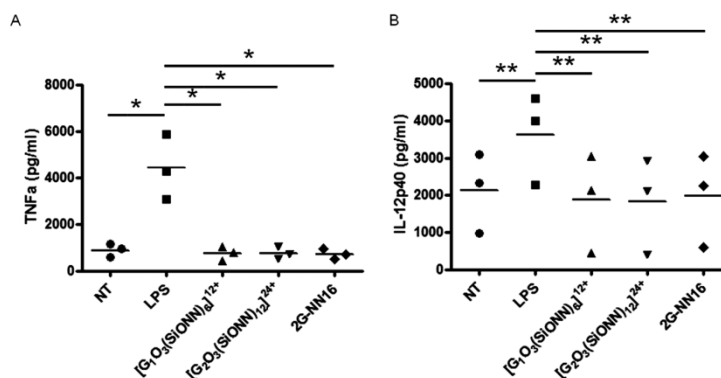


Fig. 4 Cytokines release. Determination of TNF- α (A) and IL-12p40 (B) release by ELISA in culture supernatant of M1 macrophages. Shown are not treated cells (NT), cells stimulated by LPS (LPS), and treated with first $[G_1O_3(SiONN)_6]^{12+}$ (4), second generation $[G_2O_3(SiONN)_{12}]^{24+}$ (5) and 2G-NN16 dendrimers for 24 h. The individual and mean values of 3 independent experiments are shown (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

The bacterial endotoxin LPS activates macrophages to produce pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor- α (TNF- α) and IL-12.⁵⁷ Production of these inflammatory cytokines and mediators by macrophages contributes to the efficient control of growth and dissemination of invading pathogens triggering an inflammatory response.⁶⁴

To establish whether dendrimers trigger M1 macrophage activation, we confronted the macrophages cell cultures with dendrimers and their dendrimer-induced cytokine profile was determined by ELISA assays. With regards to cytokine release, and in line with previous reports,²⁸ LPS stimulation of M1 macrophages, led to the production of TNF- α (Fig. 4A) and IL-12 (Fig. 4B).

It was noted that macrophages do not release pro-inflammatory cytokines when they were confronted with dendrimers, thus indicating that, unlike LPS, these dendrimers do not activate the macrophages (Fig. 4). First and second generation dendrimers 4 and 5 and 2G-NN16 did not induce the production of TNF- α (Fig. 4A) and IL-12p40 (Fig. 4B) by M1 macrophages. In this case, no effect of the core in macrophage response was noted for these dendrimers.

4. Conclusions

We have successfully synthesized a new family of carboxilane dendrimers derived from a 1,3,5-(HO)₃C₆H₅ core with two ammonium groups per branch at the periphery and with Si-O bonds close to the surface. The three generations obtained were perfectly water soluble in contrast with related dendrimers containing a Si atom core, which third generation derivative was not soluble. The polyphenoxo core generates clearly bigger dendrimers than the Si atom core, as has been showed by DOSY NMR experiments of neutral dendrimers. These new cationic dendrimers $[G_nO_3(SiONN)_m]^{2m+}$ ($n = 1, m = 6$ (4); $n = 2, m = 12$ (5); $n = 3, m = 24$ (6)) has allowed us to compare the effect of generation and number of functional groups in biomedical

assays and also with our previous cationic dendrimer 2G-NN16, with the same type of periphery but derived from a Si atom core.

We have studied the behaviour of M1 macrophages in the presence of the cationic dendrimers 4–6 and 2G-NN16, as this type of cells is the first line of defense to determine foreign particles to the organism. We have observed that the toxicity of a dendrimer is generation-dependent, in accordance with previous results.³¹ Dendrimer 2G-NN16 was the less cytotoxic of these compounds, whereas the third generation dendrimer $[G_3O_3(SiONN)_{24}]^{48+}$ presented the highest cytotoxicity level. The data indicates that the lower generation dendrimers can be used without having any cytotoxic effect, in contrast with the third generation dendrimer 6.

This work was based on the use of the cytokines release as a predictor of safety during the first steps of the evaluation process for a molecule with a future biological application. Our data demonstrates that 4 and 5 and 2G-NN16 are not promoting the release of TNF- α and IL-12p40 pro-inflammatory cytokines by the macrophages, indicating that they are not recognized as foreign substances and consequently, do not trigger an inflammatory response mediated by macrophages.

Our data also suggest that these dendrimers could be used in subsequent studies to avoid the unwanted effects that have been had until now with similar compounds, since these new dendrimers could be used free of inflammatory complications in future studies. In summary, these results drive us to a very promising line of research, because dendrimers could be used as a safety tool for biomedical applications.

5. Experimental section

5.1 General considerations

All reactions were carried out under inert atmosphere and solvents were purified from appropriate drying agents (THF). NMR spectra were recorded on a Varian Unity VXR-300 (300.13 (¹H), 75.47 (¹³C) MHz) or on a Bruker AV400 (400.13 (¹H), 100.60 (¹³C), 40.56 (¹⁵N), and 79.49 (²⁹Si) MHz). Chemical shifts (δ) are

given in ppm. ^1H and ^{13}C resonances were measured relative to solvent peaks considering TMS = 0 ppm, meanwhile ^{15}N and ^{29}Si resonances were measured relative to external liquid NH_3 (but converted to the IUPAC CH_3NO_2 standard) and TMS, respectively. When necessary, assignment of resonances was done from HSQC, HMBC, COSY, TOCSY and NOESY NMR experiments. Elemental analyses were performed on a Perkin-Elmer 240C. Compounds Karstedt's Pt catalyst, $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{Me})(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$, NEt_3 , and MeI (Aldrich) were obtained from commercial sources. Compounds $\text{G}_n\text{O}_3(\text{SiCl})_m$ ($n = 1, m = 6; n = 2, m = 12; n = 3, m = 24$)⁵⁸ and 2G-NN16⁵¹ were synthesized as published.

5.2 Synthesis of compounds

Synthesis of $\text{G}_1\text{O}_3(\text{SiONN})_6$ (1). $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{Me})(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$ (0.373 g, 2.55 mmol) was added to a solution of $\text{G}_1\text{O}_3(\text{SiCl})_6$ (0.500 g, 0.41 mmol) and NEt_3 (0.70 mL g, 5.10 mmol) in Et_2O (150 mL) at room temperature and the mixture was stirred for 16 h. Then, volatiles were removed under vacuum, Et_2O (100 mL) was added, the solution was filtered and the solvent removed under vacuum, obtaining compound 1 as a colourless oil (0.67 g, 88%). NMR data (CDCl_3): ^1H NMR: -0.08 (s, 9H, SiMe), 0.06 (s, 36H, SiMe_2), 0.59 (m, 30H, CH_2Si), 1.33 (m, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.74 (m, 6H, OCH_2CH_2), 2.21 (s, 36H, NMe_2), 2.26 , (s, 18H, NMe), 2.35 (m, 12H, CH_2NMe_2), 2.52 (m, 24H, CH_2NMe), 3.65 (t, $J = 7.7$ Hz, 12H, SiOCH_2), 3.82 (t, $J = 7.6$ Hz, 6H, ArOCH_2), 6.03 (s, 3H, C_6H_3); ^{13}C NMR: -5.1 (SiMe), -2.0 (SiMe_2), 13.8 (SiCH_2), 17.8 , 18.8 , 21.0 (SiCH_2 and SiCH_2CH_2), 22.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 43.3 (NMe), 45.9 (NMe_2), 56.2 , 57.4 and 60.0 (CH_2N), 60.8 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 67.6 (ArOCH_2), 93.7 (CH , C_6H_3), 160.9 (Cipso, C_6H_3); ^{15}N NMR: -356.3 (NMe_2), -351.6 (NMe); ^{29}Si NMR: 1.8 (SiMe), 17.5 (SiMe_2). Anal. calc. for $\text{C}_{93}\text{H}_{210}\text{N}_{12}\text{O}_9\text{Si}_9$ (1893.51): C, 58.99; H, 11.18; N, 8.88; obt.: C, 57.67; H, 10.21; N, 8.33%.

Synthesis of $\text{G}_2\text{O}_3(\text{SiONN})_{12}$ (2). Following the procedure described above for 1, compound 2 was obtained as a colourless oil (0.64 g, 85%) from $\text{G}_2\text{O}_3(\text{SiCl})_{12}$ (0.500 g, 0.19 mmol), $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{Me})(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$ (0.350 g, 2.39 mmol) and NEt_3 (0.67 mL, 4.78 mmol). NMR data (CDCl_3): ^1H NMR: -0.08 (s, 18H, SiMe), -0.03 (s, 9H, SiMe), 0.07 (s, 72H, SiMe_2), 0.53 (m, 48H, CH_2Si), 0.64 (m, 24H, CH_2Si), 1.33 (m, 42H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.74 (m, 6H, OCH_2CH_2), 2.21 (s, 72H, NMe_2), 2.27 (s, 36H, NMe), 2.34 (m, 24H, CH_2NMe_2), 2.52 (m, 48H, CH_2NMe), 3.66 (t, $J = 7.7$ Hz, 24H, SiOCH_2), 3.87 (bs, 6H, ArOCH_2), 6.03 (s, 3H, C_6H_3); ^{13}C NMR: -4.9 , -5.1 (SiMe), -2.2 (SiMe_2), 13.8 (SiCH_2), 17.3 , 17.4 , 18.2 , 18.5 , 20.6 (SiCH_2 and SiCH_2CH_2), 22.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.9 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 43.0 (NMe), 45.8 (NMe_2), 55.9 , 57.2 and 59.8 (CH_2N), 60.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 67.4 (ArOCH_2), 93.5 (CH , C_6H_3), 160.8 (Cipso, C_6H_3); ^{15}N NMR: -356.2 (NMe_2), -351.7 (NMe); ^{29}Si NMR: 1.9 (SiMe), 17.4 (SiMe_2). Anal. calc. for $\text{C}_{189}\text{H}_{438}\text{N}_{24}\text{O}_{15}\text{Si}_{21}$ (3877.45): C, 58.54; H, 11.39; N, 8.67; obt.: C, 58.02; H, 11.11; N, 8.32%.

Synthesis of $\text{G}_3\text{O}_3(\text{SiONN})_{24}$ (3). Following the procedure described above for 1, compound 3 was obtained as a colourless oil (0.313 g, 83%) from $\text{G}_3\text{O}_3(\text{SiCl})_{24}$ (0.250 g, 0.05 mmol), $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{Me})(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$ (0.172 g, 1.17 mmol) and NEt_3

(0.32 mL, 2.35 mmol). NMR data (CDCl_3): ^1H NMR: -0.11 (s, 45H, SiMe), -0.04 (s, 18H, SiMe), 0.05 (s, 144H, SiMe_2), 0.58 (m, 144H, CH_2Si), 1.33 (m, 90H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.74 (m, 6H, OCH_2CH_2), 2.20 (s, 144H, NMe_2), 2.26 , (s, 72H, NMe), 2.36 (m, 48H, CH_2NMe_2), 2.51 (m, 96H, CH_2NMe), 3.65 (t, $J = 7.7$ Hz, 48H, SiOCH_2), 3.84 (bs, 6H, ArOCH_2), 6.03 (s, 3H, C_6H_3); ^{13}C NMR: -2.9 (SiMe), -1.9 (SiMe_2), 14.1 (SiCH_2), 17.8 , 18.6 , 18.8 , 20.6 , 21.0 (SiCH_2 and SiCH_2CH_2), 22.8 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.5 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 43.3 (NMe), 45.9 (NMe_2), 56.2 , 57.5 and 60.0 (CH_2N), 60.9 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 67.8 (ArOCH_2), 93.6 (CH , C_6H_3), 160.9 (Cipso, C_6H_3); ^{15}N NMR: -356.4 (NMe_2), -351.6 (NMe); ^{29}Si NMR: 1.6 (SiMe), 18.2 (SiMe_2). Anal. calc. for $\text{C}_{381}\text{H}_{894}\text{N}_{48}\text{O}_{27}\text{Si}_{45}$ (7845.33): C, 58.33; H, 11.49; N, 8.57; obt.: C, 57.45; H, 10.29; N, 8.06%.

Synthesis of $[\text{G}_1\text{O}_3(\text{SiONN})_6(\text{I})_{12}]$ (4). MeI (0.25 mL, 3.80 mmol) was added to a solution of 1 (0.300 g, 0.16 mmol) in THF (150 mL) and the mixture was stirred for 36 h, observing formation of a white precipitate. Afterward the volatiles were removed under vacuum and the white solid was washed with CH_2Cl_2 , obtaining 4 (0.49 g, 86%). NMR data ($\text{DMSO}-d_6$): ^1H NMR: -0.05 (s, 9H, SiMe), 0.13 (s, 36H, SiMe_2), 0.55 (m, 118H, CH_2Si), 0.69 (m, 12H, CH_2Si), 1.34 (m, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.68 (m, 6H, OCH_2CH_2), 3.16 (s, 18H, NMe), 3.19 (s, 36H, NMe_2), 3.56 (m, 12H, CH_2NMe_2), 3.80 – 4.20 (m, 54H, CH_2NMe_2 , SiOCH_2 and ArOCH_2), 6.01 (s, 3H, C_6H_3); ^{13}C NMR: -5.5 (SiMe), -2.6 (SiMe_2), 12.8 (SiCH_2), 16.8 , 17.3 , 19.6 (SiCH_2 and SiCH_2CH_2), 23.1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 50.1 (NMe), 52.6 (NMe_2), 55.7 , 55.9 and 56.4 (CH_2N), 64.9 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 67.6 (ArOCH_2), 94.1 (CH , C_6H_3), 160.0 (Cipso, C_6H_3); ^{15}N NMR: -331.7 (NMe_2), -326.4 (NMe); ^{29}Si NMR: 1.1 (SiMe), 20.6 (SiMe_2). Anal. calc. for $\text{C}_{105}\text{H}_{246}\text{I}_{12}\text{N}_{12}\text{O}_9\text{Si}_9$ (3596.77): C, 35.06; H, 6.89; N, 4.67; obt.: C, 35.36; H, 7.16; N, 5.04%.

Synthesis of $[\text{G}_2\text{O}_3(\text{SiONN})_{12}(\text{I})_{24}]$ (5). Following the procedure described above for 4, compound 5 was obtained as white solid (0.45 g, 86%) from 2 (0.280 g, 0.07 mmol) and MeI (0.22 mL, 3.47 mmol). NMR data ($\text{DMSO}-d_6$): ^1H NMR: -0.09 (s, 18H, SiMe), -0.03 (s, 9H, SiMe), 0.12 (s, 72H, SiMe_2), 0.53 (m, 48H, CH_2Si), 0.68 (m, 24H, CH_2Si), 1.32 (m, 42H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.66 (m, 6H, OCH_2CH_2), 3.22 (s, 180H, NMe_2 and NMe), 3.60 (m, 24H, CH_2NMe_2), 3.90 – 4.10 (m, 72H, CH_2NMe and SiOCH_2), 3.86 (bs, 6H, ArOCH_2), 5.99 (s, 3H, C_6H_3); ^{13}C NMR: -5.4 (SiMe), -2.6 (SiMe_2), 13.8 (SiCH_2), 16.8 , 17.5 , 17.7 , 19.6 (SiCH_2 and SiCH_2CH_2), 22.0 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 32.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 50.9 (NMe), 52.5 (NMe_2), 55.7 , 57.9 and 56.3 (CH_2N), 60.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 64.9 (ArOCH_2), 93.5 (CH , C_6H_3), 160.0 (Cipso, C_6H_3); ^{15}N NMR: -331.4 (NMe_2), -326.5 (NMe); ^{29}Si NMR: 1.3 (SiMe), 20.4 (SiMe_2). Anal. calc. for $\text{C}_{213}\text{H}_{510}\text{I}_{24}\text{N}_{24}\text{O}_{15}\text{Si}_{21}$ (7283.98): C, 35.12; H, 7.06; N, 4.62; obt.: C, 35.69; H, 7.13; N, 4.23%.

Synthesis of $[\text{G}_3\text{O}_3(\text{SiONN})_{24}(\text{I})_{48}]$ (6). Following the procedure described above for 4, compound 6 was obtained as white solid (0.39 g, 84%) from 3 (0.250 g, 0.032 mmol) and MeI (0.19 mL, 3.06 mmol). NMR data ($\text{DMSO}-d_6$): ^1H NMR: -0.10 (s, 45H, SiMe), -0.02 (s, 18H, SiMe), 0.11 (s, 144H, SiMe_2), 0.52 (m, 96H, CH_2Si), 0.67 (m, 48H, CH_2Si), 1.33 (m, 90H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.74 (m, 6H, OCH_2CH_2), 3.24 (s, 216H, NMe_2 and NMe), 3.59 (m, 48H, CH_2NMe_2), 4.00 (m, 150H, CH_2NMe , SiOCH_2 and ArOCH_2),

6.03 (s, 3H, C₆H₃); ¹³C NMR: −5.5 (SiMe), −2.9 (SiMe₂), 16.8, 17.0, 17.5, 17.6, 17.8, 19.6 (SiCH₂ and SiCH₂CH₂), 33.5 (OCH₂CH₂CH₂), 50.9 (NMe), 52.5 (NMe₂), 55.5, 55.8 and 56.3 (CH₂N), 60.6 (OCH₂CH₂N), 60.9 (OCH₂CH₂N), 67.8 (ArOCH₂), 93.6 (CH, C₆H₃), 160.9 (Cipso, C₆H₃); ¹⁵N NMR: −331.5 (NMe₂), −326.5 (NMe); ²⁹Si NMR: 1.2 (SiMe), 20.3 (SiMe₂). Anal. calc. for C₄₂₉H₁₀₃₈I₄₈N₄₈O₂₇Si₁₄₅ (14658.40): C, 35.16; H, 7.12; N, 4.59; obt.: C, 35.66; H, 7.68; N, 4.13%.

Dosy experiments. These experiments were recorded on Bruker AV400 at 298 K in CDCl₃. The hydrodynamic radii were calculated using solutions of about 10 mg of dendrimers in 0.6 mL of CDCl₃. The method employed avoids the knowledge of solution viscosity and also interpretation of diffusion coefficients, which are affected by possible inaccuracies in gradient pulse.

5.3 Macrophage differentiation and cell culture

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats of healthy donors on a Ficoll-Hypaque density gradient (Rafer) according to standard procedures. Monocytes were purified from PBMC by magnetic cell sorting using CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec). Monocytes were cultured at 0.5×10^6 cells per mL for 7 days in RPMI medium supplemented with Foetal Bovine Serum at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and containing Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (rh GM-CSF) (ImmunoTools) to generate M1 monocyte-derived macrophages. Cytokines were added every 2 days.

5.4 Cytotoxicity assays

To determine the toxicity of the dendrimers on the macrophages, dendrimers were added at day 7 at different doses from 3 μM to 15 μM, and the toxicity was evaluated after 24 hours of treatment. The cell viability was determined by two methods. Firstly, by MTT (methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide) assay following manufacturer instruction (Sigma-Aldrich) for measuring the activity of cellular enzymes that gives us information about cytotoxicity. Secondly, by 7AAD (7-amino-actinomycin D by Sigma-Aldrich) staining and were analyzed by flow cytometry. Each experiment was performed in triplicate, and 3 different donors were evaluated.

5.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

M1 macrophages were cultured for 7 days (as previously described), treated for 24 hours with dendrimers, and the supernatants were tested for the presence of cytokines. The supernatants were evaluated after 24 hours of treatment. The presence of cytokines were tested using commercially available ELISA for TNF-α (ImmunoTools), and IL-12p40 set (BD Pharmingen), following the protocols supplied by the manufacturers.

Acknowledgements

This work has been supported by grants from CTQ2011-23245 (MINECO), Consortium NANODENDMED ref S2011/BMD-2351

(CM) and UAH2011/EXP-037 to R. G. and F. J. M. This work was supported by grants from Fondos de Investigación Sanitaria ISCIII (INTRASALUD PI09/02029, P509102669), Fundación Eugenio Rodríguez Pascual Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria ISCIII (RETIC RD06/0006/0035 and RD12/0017/0037), Red Nacional de Biobancos (RD09/0076/00103), INDISNET S-2011-BMD2332, and FIPSE to M. A. M.-F. This work was also supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (grant SAF2011-23801) and Programa de actividades de I + D de la Comunidad de Madrid (RAPHYME) to A. L. C. This study was also supported by CIBER-BBN financed by the Instituto de Salud Carlos III, with assistance from the European Regional Development Fund. We thank the Centers of Transfusion of Madrid and Albacete for the buffy coats and Spanish HIV HGM BioBank supported by ISC III (Grant no. RD09/0076/00103) and FIPSE. Also, we thank Dra. Maribel Clemente Mayoral for her technical assistance and advice as cell culture technician (CA10/01274).

References

- R. G. Denkwalter, J. F. Kolc and W. J. Lukasavage, US Pat. 4289872, 1981.
- F. Vögtle and C. A. Schalley, *Top. Curr. Chem.*, 2003, 228.
- G. R. Newkome, C. N. Moorefield and F. Vögtle, *Dendrimers and Dendrons: Concepts, Syntheses, Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2001.
- G. R. Newkome and C. D. Shreiner, *Polymer*, 2008, 49, 1–173.
- J. M. J. Fréchet and D. A. Tomalia, *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002.
- D. Astruc, E. Boisselier and C. Ornelas, *Chem. Rev.*, 2010, 110, 1857–1959.
- T. Dutta, N. K. Jain, N. A. J. McMillan and H. S. Parekh, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2010, 6, 25–34.
- C. M. Paleos, D. Tsiourvas, Z. Sideratou and L. Tziveleka, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2008, 8, 1204–1224.
- W. D. Jang and K. Kataoka, *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, 2005, 15, 19–30.
- H. Kobayashi and M. W. Brechbiel, *Mol. Imaging*, 2003, 2, 1–10.
- L. J. Twyman, A. S. H. King and I. K. Martin, *Chem. Soc. Rev.*, 2002, 31, 69–82.
- I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada, C. M. Casado, C. Pascual, B. Alonso and F. Lobete, *Advances in Dendritic Macromolecules*, ed. G. R. Newkome, Jai Press Inc., Greenwich, 1999, vol. 3, pp. 151–191.
- O. Rolland, C. O. Turrin, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *New J. Chem.*, 2009, 33, 1809–1824.
- S. Svenson, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, 71, 445–462.
- S. H. Medina and M. E. H. El-Sayed, *Chem. Rev.*, 2009, 109, 3141–3157.
- M. A. Mintzer and E. E. Simanek, *Chem. Rev.*, 2009, 109, 259–302.
- D. G. Shcharbin, B. Klajnert and M. Bryszewska, *Biochemistry*, 2009, 74, 1070–1079.
- N. Joshi and M. Grinstaff, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2008, 8, 1225–1236.

- 19 M. Longmire, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2008, **8**, 1180–1186.
- 20 P. M. H. Heegaard, U. Boas and N. S. Sorensen, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 405–418.
- 21 R. Duncan and L. Izzo, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2005, **57**, 2215–2237.
- 22 G. F. Doncel, N. Chandra and R. N. Fichorova, *J. Acquired Immune Defic. Syndr.*, 2004, **37**(suppl 3), S174–S180.
- 23 R. N. Fichorova, L. D. Tucker and D. J. Anderson, *J. Infect. Dis.*, 2001, **184**, 418–428.
- 24 G. F. Doncel and M. R. Clark, *Antiviral Res.*, 2010, **88**(suppl 1), S10–S18.
- 25 R. N. Fichorova, *J. Acquired Immune Defic. Syndr.*, 2004, **37**(suppl 3), S184–S193.
- 26 A. Mantovani, A. Sica and M. Locati, *Eur. J. Immunol.*, 2007, **37**, 14–16.
- 27 A. J. Fleetwood, T. Lawrence, J. A. Hamilton and A. D. Cook, *J. Immunol.*, 2007, **178**, 5245–5252.
- 28 F. A. Verreck, T. de Boer, D. M. Langenberg, L. van der Zanden and T. H. Ottenhoff, *J. Leukocyte Biol.*, 2006, **79**, 285–293.
- 29 A. W. van der Made and P. W. N. M. van Leeuwen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 1400–1401.
- 30 D. Seyferth, D. Y. Son, A. L. Rheingold and R. L. Ostrander, *Organometallics*, 1994, **13**, 2682–2690.
- 31 J. F. Bermejo, P. Ortega, L. Chonco, R. Eritja, R. Samaniego, M. Mullner, E. de Jesús, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez and A. Muñoz-Fernández, *Chem.-Eur. J.*, 2007, **13**, 483–495.
- 32 B. Rasines, J. M. Hernández-Ros, N. de las Cuevas, J. L. Copa-Patiño, J. Soliveri, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez and F. J. de la Mata, *Dalton Trans.*, 2009, 8704–8713.
- 33 P. Ortega, E. Fuentes-Paniagua, J. Sánchez-Nieves, J. M. Hernández-Ros, J. L. Copa-Patiño, J. Soliveri, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez and F. J. de la Mata, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 5238–5248.
- 34 K. Matsuoka, M. Terabatake, Y. Esumi, D. Terunuma and H. Kuzuhara, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 7839–7842.
- 35 K. Nishikawa, K. Matsuoka, M. Watanabe, K. Igai, K. Hino, K. Hatano, A. Yamada, N. Abe, D. Terunuma, H. Kuzuhara and Y. Natori, *J. Infect. Dis.*, 2005, **191**, 2097–2105.
- 36 P. Ortega, J. F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesús, F. J. de la Mata, G. Fernández, J. C. Flores, R. Gómez, M. J. Serramía and M. A. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 1388–1396.
- 37 L. Chonco, J. F. Bermejo-Martín, P. Ortega, D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, B. Klajnert, F. J. de la Mata, R. Eritja, R. Gómez, M. Bryszewska and M. A. Muñoz-Fernández, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 1886–1893.
- 38 N. Weber, P. Ortega, M. I. Clemente, D. Shcharbin, M. Bryszewska, F. J. de la Mata, R. Gómez and M. A. Muñoz-Fernández, *J. Controlled Release*, 2008, **132**, 55–64.
- 39 T. Gonzalo, M. I. Clemente, L. Chonco, N. D. Weber, L. Díaz, M. J. Serramía, R. Gras, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, L. A. López-Fernández, M. A. Muñoz-Fernández and J. L. Jiménez, *ChemMedChem*, 2010, **5**, 921–929.
- 40 N. de las Cuevas, S. García-Gallego, B. Rasines, F. J. de la Mata, L. G. Guijarro, M. Á. Muñoz-Fernández and R. Gómez, *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**, 5052–5061.
- 41 P. Ortega, J. L. Copa-Patiño, M. A. Muñoz-Fernández, J. Soliveri, R. Gómez and F. J. de la Mata, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 3264–3269.
- 42 B. Rasines, J. Sánchez-Nieves, I. T. Molina, M. Guzmán, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez and F. J. de la Mata, *New J. Chem.*, 2012, **36**, 360–370.
- 43 B. Rasines, J. Sánchez-Nieves, M. Maiolo, M. Maly, L. Chonco, J. L. Jiménez, M. Á. Muñoz-Fernández, F. J. de la Mata and R. Gómez, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 12733–12748.
- 44 L. Chonco, M. Pion, E. Vacas, B. Rasines, M. Maly, M. J. Serramía, L. López-Fernández, F. J. de la Mata, S. Álvarez, R. Gómez and M. A. Muñoz-Fernández, *J. Controlled Release*, 2012, **161**, 949–958.
- 45 H. Oka, T. Onaga, T. Koyama, C.-T. Guo, Y. Suzuki, Y. Esumi, K. Hatano, D. Terunuma and K. Matsuoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 4405–4408.
- 46 T. Mori, K. Hatano, K. Matsuoka, Y. Esumi, E. J. Toone and D. Terunuma, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 2751–2760.
- 47 A. Yamada, K. Hatano, K. Matsuoka, T. Koyama, Y. Esumi, H. Koshino, K. Hino, K. Nishikawa, Y. Natori and D. Terunuma, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 5074–5083.
- 48 J.-I. Sakamoto, T. Koyama, D. Miyamoto, S. Yingsakmongkon, K. I. P. J. Hidari, W. Jampangern, T. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Esumi, T. Nakamura, K. Hatano, D. Terunuma and K. Matsuoka, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 5451–5464.
- 49 D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, L. Chonco, J. F. Bermejo-Martín, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Eritja, R. Gómez, B. Klajnert, M. Bryszewska and M. A. Muñoz-Fernández, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 2059–2062.
- 50 R. Gras, L. Almonacid, P. Ortega, M. J. Serramía, R. Gómez, F. J. de la Mata, L. López-Fernández and M. A. Muñoz-Fernández, *Pharm. Res.*, 2009, **26**, 577–586.
- 51 T. Gonzalo, M. I. Clemente, L. Chonco, N. D. Weber, L. Díaz, M. J. Serramía, R. Gras, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, L. A. López-Fernández, M. A. Muñoz-Fernández and J. L. Jiménez, *ChemMedChem*, 2010, **5**, 921–929.
- 52 J. L. Jiménez, M. I. Clemente, N. D. Weber, J. Sánchez, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, D. García, L. A. López-Fernández and M. A. Muñoz-Fernández, *BioDrugs*, 2010, **24**, 331–343.
- 53 M. Pion, M. J. Serramía, L. Díaz, M. Bryszewska, T. Gallart, F. García, R. Gómez, F. J. de la Mata and M. A. Muñoz-Fernández, *Biomaterials*, 2010, **31**, 8749–8758.
- 54 D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, O. Nowacka, M. Kumar, M. Zaborski, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández and M. Bryszewska, *Colloids Surf., B*, 2011, **83**, 388–391.
- 55 R. Gras, M. I. García, R. Gómez, F. J. de la Mata, M. A. Muñoz-Fernández and L. A. López-Fernández, *Mol. Pharmaceutics*, 2012, **9**, 102–110.
- 56 E. Pedziwiatr-Werbicka, D. Shcharbin, J. Maly, M. Maly, M. Zaborski, B. Garbara, P. Ortega, F. J. de la Mata,

Paper

RSC Advances

- R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández, B. Klajnert and M. Bryszewska, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2012, **8**, 57–73.
- 57 J. Cohen, *Nature*, 2002, **420**, 885–891.
- 58 J. Sánchez-Nieves, P. Ortega, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez and F. J. de la Mata, *Tetrahedron*, 2010, 9203–9213.
- 59 D. K. Wilkins, S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson, J. A. Jones and L. J. Smith, *Biochemistry*, 1999, **38**, 16424.
- 60 D. Zuccaccia and A. Macchioni, *Organometallics*, 2005, **24**, 3476–3486.
- 61 F. E. Appoh, D. S. Thomas and H.-B. Kraatz, *Macromolecules*, 2005, **38**, 7562–7570.
- 62 I. Angurell, L.-I. Rodríguez, O. Rossell and M. Seco, *Organometallics*, 2011, **30**, 5771–5775.
- 63 T. Stoeger, C. Reinhard, S. Takenaka, A. Schroepel, E. Karg, B. Ritter, J. Heyder and H. Schulz, *Environ. Health Perspect.*, 2006, **114**, 328–333.
- 64 M. Fujihara, M. Muroi, K. Tanamoto, T. Suzuki, H. Azuma and H. Ikeda, *Pharmacol. Ther.*, 2003, **100**, 171–194.