

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Molecular**

**Efecto de la infección por el VIH-1 sobre el fenotipo y la funcionalidad de las células T reguladoras (Treg). Uso de los dendrímeros carbosilano como protectores de las Treg frente a la infección por el VIH.**

**TESIS DOCTORAL**

**Leidy Didiana Jaramillo Ruiz**

**Madrid, 2014**

**Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular**

**Hospital General Universitario Gregorio Marañón**

**Directores de Tesis:**

**Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz Fernández**

**Dr. Rafael Correa Rocha**

Esta Memoria ha sido realizada en el laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid bajo la dirección de los Doctores: M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz-Fernández y Rafael Correa-Rocha. El trabajo de investigación que constituye esta Memoria ha sido realizado gracias a la financiación concedida por el Instituto de Salud Carlos III (FIS) del “Subprograma de Proyectos de Investigación en Salud” con números de expediente PS09/02618, PI12/00934 PI13/02016 y el proyecto EuroNanoMed DENPEPTHIV número de expediente PS09/02669.



Hospital General Universitario  
Gregorio Marañón

Comunidad de Madrid



La Doctora M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz-Fernández, Jefe de Sección del Servicio de Inmunología, Jefe del Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular y Directora del BioBanco VIH HGM del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, y el Doctor Rafael Correa Rocha, Investigador Senior del Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón.

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral Titulada: “Efecto de la infección por el VIH-1 sobre el fenotipo y la funcionalidad de las células T reguladoras (Treg). Uso de los dendrímeros carbosilano como protectores de las Treg frente a la infección por el VIH” ha sido realizado por Leidy Didiana Jaramillo Ruiz, bajo su dirección. 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.

En Madrid, a 27 de enero de 2014.

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz Fernández

Fdo. Dr. Rafael Correa Rocha

*“Nada os pertenece en propiedad más que vuestros sueños”*

Friedrich Nietzsche

**A mis padres**

**A Álvaro**

# **AGRADECIMIENTOS**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a M<sup>a</sup> Ángeles y a Rafa por la oportunidad que me han brindado para terminar esta etapa de mi vida profesional.

M<sup>a</sup> Ángeles, gracias por todo el apoyo, paciencia y por esas palabras de ánimo que llenan de tranquilidad cuando más se necesita *“Todo llega”*. Gracias por creer en mí y darme la oportunidad de haber trabajado a tu lado.

Rafa, ha sido una etapa llena de mucho aprendizaje, puedo decirte con seguridad que he aprendido más de lo que llegué a imaginar y todo Gracias ti. Gracias por todo tu apoyo y paciencia.

Dr. Manuel Leal y Dra. Yolanda Pacheco, gracias por vuestra ayuda, confianza y por permitirme trabajar con vosotros.

A mis niñas. Irene, Sandra y Marta, nuestra amistad es la prueba de que en el trabajo también hay amigos. Gracias por todo vuestro apoyo, por escucharme tantas veces con lo mismo, pero sobre todo por los momentos de risa compartidos dentro y fuera del trabajo.

A Javi y Quique ¡Chicos sois los mejores! Mi portada es inmejorable. Es muy grato saber que se cuenta con amistades como las vuestras.

Santi, Jose M<sup>a</sup>, Pilar, José, Coral, Almudena, Isabel e Irene L. gracias por vuestro apoyo y las palabras de ánimo que me habéis brindado todo este tiempo.

Marjorie, Miguel, Susana, Maribel y Verónica, muchas gracias por permitirme compartir con vosotros la pasión por la ciencia, os admiro mucho.

Judith, Alberto, Danny, Raquel y Chusa, gracias por estar siempre dispuestos a echarme una mano cuando más lo necesité y por todo vuestro apoyo. A Laura, gracias por toda tu ayuda con el sorter y por tu paciencia, seguro que no olvidaré reservar el turno.

A mi prima Socorro ¡Eres un encanto! Recuerdo con mucho cariño la primera sonrisa que recibí cuando llegue a Barajas. Gracias por apoyarme todo este tiempo y por animarme a continuar en los momentos más difíciles.

A mi familia andaluza, Maria luisa, Antonio sois unos padres para mí, gracias por apoyarme y por brindarme vuestro afecto y cariño, por cuidarme tanto. Nuria y Pedro, cuñis gracias por ser tan buena conmigo y gracias a los dos por todo vuestro apoyo.

A mis hermanos, Alex y Andrés gracias por creer en mí y estar siempre pendiente de cada paso que doy. ¡Os quiero!

A Nancy, sin duda, la roca más preciosa y valiosa que he visto jamás, por tu apoyo incondicional y tus consejos durante todo este tiempo fuera de casa, por ser mí mejor amiga. Gracias hermanita.

A mis padres, sois los mejores padres del mundo, los pilares de mi vida, gracias por vuestro apoyo, por escucharme tranquilos cada vez que he sentido que perdía las fuerzas, por acompañarme todos los días sin falta, y sobre todo por haberme inculcado siempre valentía y confianza en mí misma, por haberme ayudado a encaminarme en una nueva oportunidad, por impulsarme siempre a perseguir mis sueños y conseguir el objetivo, sois mi tesoro más preciado ¡Lo hemos logrado!

Álvaro, gracias mi vida por escucharme todos los días con paciencia, por creer en mí y por tus consejos, por regalarme día tras día una sonrisa y por tanto mimo. Espero con ilusión compartir esta nueva etapa de mi vida a tu lado y seguir adelante con nuestros sueños.

A todos ¡muchas gracias! Didiana



# ÍNDICE

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	15
SUMMARY .....	19
1. INTRODUCCIÓN .....	21
1.1. El virus de la inmunodeficiencia humana y SIDA .....	23
1.1.1. Epidemiología de la infección por el VIH .....	23
1.1.2. Características del ciclo viral del VIH .....	24
1.1.3. Efectos de la infección por el VIH en el Sistema Inmunológico .....	26
1.2. Las células T reguladoras .....	29
1.2.1. Origen y clasificación de las células Treg .....	29
1.2.2. Homeostasis de las células Treg .....	30
1.2.3. Las células Treg y la infección por el VIH .....	30
1.3. Uso de nanopartículas frente a la infección por el VIH .....	33
1.3.1. Dendrímeros .....	34
1.3.2. Aplicaciones biomédicas de los dendrímeros .....	37
2. OBJETIVOS .....	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
3.1. Análisis <i>in vitro</i> de la Infección de las células Treg por el VIH-1 .....	43
3.1.1. Procesamiento de muestras y aislamiento de las células Treg .....	43
3.1.2. Expansión y activación de las células Treg .....	44
3.1.3. Producción, cuantificación y titulación de los aislados virales X4 VIH-1 <sub>NL4-3</sub> y R5 VIH-1 <sub>AD8</sub> .....	44
3.1.4. Infección <i>in vitro</i> de las células Treg por el VIH-1 .....	46
3.1.5. Viabilidad celular de los cultivos de células Treg .....	46
3.1.6. Análisis de la expresión de Foxp3 y enzimas metilasas por PCR a tiempo real .....	47
3.1.7. Marcaje de Foxp3 y P24gag intracelular por citometría de flujo ....	48

3.1.8. Análisis del perfil de metilación del gen FOXP3 .....	48
3.1.9. Análisis de la capacidad supresora de las células Treg sobre la proliferación de células T efectoras.....	51
3.1.10. Análisis de la capacidad supresora de las células Treg sobre la activación de células mononucleares de sangre periférica.....	52
3.1.11. Cuantificación de p24gag y de la producción de citoquinas en sobrenadante de los cultivos .....	52
3.2. Análisis de las células Treg en pacientes infectados por el VIH .....	53
3.2.1. Características de las muestras estudiadas de individuos sanos e individuos infectados por el VIH .....	53
3.2.2. Análisis de las poblaciones celulares inmunitarias .....	54
3.2.2.1. Análisis del porcentaje y número absoluto de subpoblaciones inmunes.....	54
3.2.2.2. Análisis de las células Treg totales y de subpoblaciones <i>naïve</i> , activada y memoria .....	56
3.2.3. Purificación de las células Treg y análisis de la capacidad supresora	56
3.3. Efecto protector de los dendrímeros frente a la infección por el VIH en las células Treg.....	57
3.3.1. Procesamiento de muestras y purificación de células Treg.....	57
3.3.2. Dendrímeros carbosilano .....	57
3.3.3. Análisis del efecto de los dendrímeros en las células Treg .....	61
3.3.4. Efecto protector de los dendrímeros en la infección de células Treg por el VIH-1 .....	62
3.4. Análisis estadístico .....	63
4. RESULTADOS.....	64
4 .1. Estudio <i>in vitro</i> del efecto de la Infección por el VIH-1 en las células Treg .....	65
4.1.1. Purificación de células Treg .....	65
4.1.2. Viabilidad de las células Treg .....	67

4.1.3. Las células Treg son susceptibles de ser infectadas por el VIH .....	67
4.1.4. Efecto de la infección por el VIH-X <sub>NL4.3</sub> en el fenotipo de las células Treg .....	72
4.1.4.1. Efecto de la infección por el VIH en la expresión de CD3 y CD4 en las células Treg .....	72
4.1.4.2. Efecto de la infección por el VIH sobre la expresión de Foxp3 en células Treg .....	73
4.1.5. La infección por el VIH-1 de células Treg aumenta el grado de metilación del gen FOXP3.....	79
4.1.6. Análisis de la expresión de enzimas ADN metiltransferasa en células Treg infectadas por el VIH-1.....	82
4.1.7. Efecto de la infección por el VIH-1 sobre la función supresora de células Treg .....	85
4.1.8. Expresión de citoquinas en las células Treg infectadas por el VIH-1	89
4.2. Efecto de la infección por el VIH en las células Treg de individuos VIH+.	90
4.2.1. Poblaciones de linfocitos en los pacientes infectados por el VIH ....	92
4.2.2. Análisis de función tímica mediante la cuantificación de células emigrantes recientes del timo .....	94
4.2.3. Distribución de las sub-poblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 en pacientes infectados.....	96
4.2.4 Valores de células <i>Natural Killer</i> en pacientes infectados.....	104
4.2.4.1. Distribución de las sub-poblaciones de Natural killer .....	106
4.2.5 Valores de granulocitos y monocitos en pacientes infectados .....	109
4.2.6. Recuento y fenotipo de células Treg en pacientes infectados .....	110
4.2.6.1. Los individuos VIH+ presentan alteraciones en la frecuencia y número absoluto de células Treg. ....	110
4.2.6.2. La presencia de VIH afecta al fenotipo de las células Treg en individuos VIH+. ....	112

4.2.7. Posibles mecanismos involucrados en la deficiencia de células Treg en individuos VIH+ .....	115
4.2.7.1. Alteraciones en la producción tímica de células T como posible mecanismo de la deficiencia de Treg .....	115
4.2.7.2. Efecto de la carga viral en el número absoluto de Treg en individuos VIH+ .....	117
4.2.7.3. Equilibrio entre la cantidad de células Treg y la proporción de células activadas en individuos VIH+ .....	118
4.2.8. Los individuos infectados por el VIH presentan un desequilibrio entre el número de células Treg y el número de células T CD4 productoras de IL-2 .....	120
4.2.8.1. Las células Treg de individuos VIH+ presentan una expresión de IL2-R $\alpha$ disminuida.....	121
4.2.8.2. La infección <i>in vitro</i> de células Treg por el VIH afecta a la expresión de CD25 y la fosforilación de STAT5 .....	123
4.2.9. Capacidad supresora de las células Treg en pacientes infectados por el VIH. ....	125
4.3. Propiedades antivirales de los dendrímeros carbosilano en células Treg purificadas .....	126
4.3.1. Efecto del tratamiento con dendrímeros sobre la viabilidad de las células Treg .....	127
4.3.2. Efecto de los dendrímeros carbosilano sobre el fenotipo de las células Treg .....	129
4.3.2.1. Efecto de los dendrímeros carbosilano en la expresión de CD4 .....	129
4.3.2.2. Efecto de los dendrímeros carbosilano en la expresión de Foxp3+ en las células Treg .....	130
4.3.2.3. Efecto de los dendrímeros carbosilano en la expresión de marcadores de activación y memoria en células Treg .....	132
4.3.2.4 Efecto de los dendrímeros carbosilano sobre la capacidad supresora de las células Treg. ....	137

4.3.3. Efecto protector de dendrímeros carbosilano frente a la infección por el VIH en células Treg .....	138
4.3.3.1. El dendrímero aniónico 2GS16 protege a las células Treg de la infección por el VIH-1.....	138
4.3.3.2. Los dendrímeros 2G-S16 y 2G-S24P protegen a las células Treg infectadas por el aislado VIH-X4 del efecto sobre la expresión de Foxp3 .....	140
5. DISCUSIÓN .....	143
5.1. Estudio <i>in vitro</i> del efecto de la infección por el VIH en células Treg ..	144
5.2. Efecto de la infección por el VIH-1 en el fenotipo y capacidad supresora de las células Treg en individuos VIH+.....	150
5.3. Efecto de los dendrímeros sobre la viabilidad, fenotipo y la capacidad supresora de las células Treg .....	157
5.3.1. Efecto protector de dendrímeros aniónicos en células Treg frente a la infección por el VIH.....	161
6. CONCLUSIONES.....	165
7. BIBLIOGRAFÍA.....	167
8. ANEXOS.....	180

# **ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido DesoxirriboNucleico

**ARN:** Ácido RiboNucleico

**ARNm:** Ácido RiboNucleico mensajero

**AZT:** Zidovudina

**CCR5:** *C-C chemokine receptor type 5*

**CFSE:** CarboxiFluoresceinin Succinimidil Ester

**CNS2:** *Conserved Noncoding Sequence 2*

**CMSP:** Células Mononucleares de Sangre Periférica

**CV:** Carga Viral

**CVi:** Carga Viral indetectable

**CXCR4:** C-X-C chemokine receptor type 4

**DMSO:** DiMetilSulfóxido

**DNMTs:** *DNA methyltransferases*

**DNMT 1:** *DNA methyltransferase 1*

**DNMT3a:** *DNA methyltransferase 3a*

**DNMT3b:** *DNA methyltransferase 3b*

**ELISA:** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FITC:** Fluoresceína IsoTioCianato

**Foxp3:** *forkhead box protein 3*

**1G-03NN12:** Dendrímero catiónico (+12) con núcleo polifenólico de primera generación.

**2G-03NN24:** Dendrímero catiónico (+24) con núcleo polifenólico de segunda generación.



**2G-NN16:** Dendrímero catiónico (+16) de tipo carbosilano con núcleo de silicio de segunda generación

**2G-S16:** Dendrímero aniónico (-16) de tipo carbosilano con grupos sulfato de segunda generación.

**2G-S24P:** Dendrímero aniónico (-24) de tipo carbosilano con grupos sulfato de segunda generación

**G3-S16:** Dendrímero aniónico (-16) de tipo carbosilano con grupos sulfato de tercera generación

**Gp120:** Glicoproteína 120

**Gp41:** Glicoproteína 41

**HeLa:** Human Endometrial Carcinoma cells

**HGUGM:** Hospital General Universitario Gregorio Marañón

**HLA-DR:** *Human Leukocyte Antigen DR*

**MFI:** *Median Fluorescence Intensity*

**IL-:** Interleuquina-

**LTR:** *Long Terminal Repeat*

**MOI:** *Multiplicity Of Infection*

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

**NK:** *Natural Killer*

**ONUSIDA:** Programa Conjunto de Naciones Unidas sobre el VIH/sida

**PBS:** *Phosphate buffered saline*

**PC5:** *Phycoerythrin-Cyanin 5.*

**PC7:** *Phycoerythrin-Cyanin 7.*

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**SIDA:** Síndrome de la InmunoDeficiencia Adquirida

**STAT3:** *Signal transducer and activator of transcription 3*

**STAT5:** *Signal transducer and activator of transcription 5*

**T-efect:** T efectora

**Treg:** célula T reguladora

**TARGA:** Tratamiento AntiRetroviral de Gran Actividad

**TGF- $\beta$ :** *Transforming growth factor beta*

**Th-:** *T helper-*

**T-20:** Enfuvirtide

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

# SUMMARY

Regulatory T cells (Treg) are a subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells that play a crucial role in establishing and maintaining self-tolerance and immune homeostasis. During an infectious process, Treg cells play a key role modulating host immune responses and thus avoiding over-reactive immunity. This mechanism could be especially important in the case of HIV infection, due to the frequent immune hyperactivation observed in HIV-infected patients. However, there are controversial findings about the role of these cells in HIV infection and the exact role of Treg cells in HIV infection is not clear.

In this study, we demonstrated that HIV-1 directly infects Treg cells, down-regulating the Foxp3 expression, which was followed by a reduction in the suppressive capacity, and alterations in the cytokine secretion pattern. The results showed that Foxp3 down-regulation in HIV-infected Treg was related with an increase in the DNMT3b expression, associated with higher methylation of CpG sites in the FOXP3 locus.

Other objective of this Memory was to corroborate if this mechanism also occurs *in vivo*, analysing the Treg population in HIV infected patients. The results indicated that the absolute number of Treg cells was significantly lower in HIV-infected patients, notably in patients with high VL, in comparison with healthy subjects. The deficiency of Treg cells in patients was probably due to the direct effect of HIV on Treg, and also by a desregulation of the IL-2 signaling pathway on these cells. We also confirmed that suppressive function of Treg from HIV-infected patients was impaired, which could contribute to the HIV-mediated hyperactivation.

On the other hand, we also investigated the efficacy of carbosilan dendrimers to block or reduce the HIV-infection, and to prevent the effects of infection in the phenotype of Treg. In general, cationic and anionic dendrimers showed high biocompatibility in Treg cells, and dendrimers did not produce important changes in the viability, phenotype or suppressive function of Treg cells. The results also showed that anionic dendrimers 2G-S24P and 2G-S16 have the capacity *per se* of inhibit HIV infection in Treg cell, and prevent the effects of HIV infection in the Treg phenotype. The capacity of these dendrimers to protect the Treg against HIV infection could have interesting applications in the therapeutically use of Treg in HIV patients.

# 1. INTRODUCCIÓN



En los procesos infecciosos, las células Treg juegan un papel clave modulando las respuestas inmunes para evitar una respuesta excesiva o hiperactivación del sistema inmunológico (SI). Este proceso de hiperactivación es especialmente importante en la infección por el VIH. Por tanto, conocer el comportamiento y la dinámica de las células Treg a lo largo del curso de la infección es clave para entender la respuesta inmune frente a la infección y buscar nuevas estrategias para controlar su progresión. Sin embargo, existe una gran controversia sobre el papel que podrían jugar las Treg en la infección por el VIH. Por un lado las células Treg tienen la capacidad potencial de suprimir las respuestas inmunes específicas frente al VIH [1], pero también su efecto supresor es clave en la homeostasis inmune y en la prevención de la hiperactivación del SI.

Con el fin de bloquear o disminuir el efecto de la infección de células Treg por el VIH, en esta Memoria también se ha estudiado el empleo de la nanomedicina con el objetivo de preservar el fenotipo y la funcionalidad de las células Treg. La nanomedicina es la aplicación médica de la nanotecnología. Por nanomedicina se entiende todo aquel proceso de diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades y lesiones traumáticas, que mitiguen el dolor y preserven la salud humana mediante el uso de herramientas y dispositivos a una escala menor que un micrómetro, es decir, a nivel molecular [2]. Existen numerosas estrategias y vías que se están desarrollando en nanomedicina. Nanomateriales y compuestos artificiales como los nanoporos [3], los nanocristales [4] y nanotubos [5], comprenden todo un conjunto de herramientas con las cuales hoy en día se investiga en diferentes campos de la medicina. Uno de estos nanocompuestos, son los dendrímeros. Los dendrímeros son polímeros químicos versátiles, con forma bien definida y tamaño nanoscópico, que se están utilizando, entre otras aplicaciones, como vectores para la liberación de fármacos a las células diana, péptidos, oligonucleótidos antisentido o siRNAs, microbicidas y como fármacos *per se*. Por todo ello en esta Memoria se ha estudiado el uso de dendrímeros de tipo carbosilano, como fármacos *per se* protectores de las células Treg frente a la infección por el VIH.

## 1.1. El virus de la inmunodeficiencia humana y SIDA

### 1.1.1. Epidemiología de la infección por el VIH

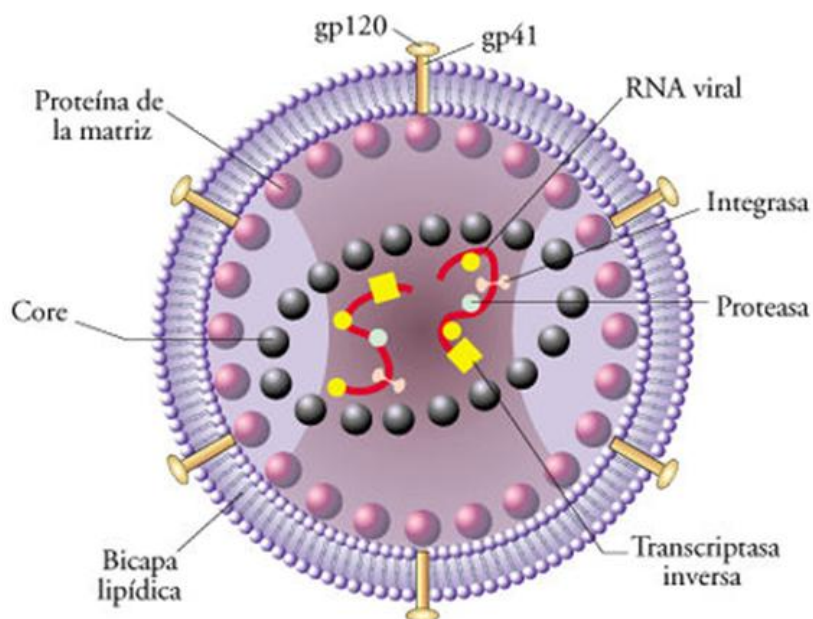
Las últimas estimaciones de ONUSIDA indican que a finales del año 2012 existían en el mundo cerca de 35,3 millones de personas portadoras del VIH. En ese año se dieron 2,3 millones de nuevas infecciones y 1,6 millones de muertes por el *Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida* (SIDA). Cerca del 68% de la población infectada vivía en el África Subsahariana. El panorama mundial de personas que vivían con el VIH en el 2012 se observa en la **Figura 1**. No obstante, en África Sub-Sahariana, la región del mundo más afectada por la infección por el VIH, se ha reducido el número de personas fallecidas por causas relacionadas con el SIDA en un 32% entre los años 2005 y 2011. En los países más desarrollados, donde existe un mayor acceso a nuevos tratamientos antirretrovirales y en especial a la terapia antirretroviral de gran eficacia o TARGA, la incidencia de muertes por SIDA ha disminuido drásticamente ya los que los individuos VIH+ consiguen controlar la replicación del virus mejorando su calidad y esperanza de vida.



**Figura 1. Epidemiología del VIH.** Número estimado de Adultos y Niños que viven con el VIH a nivel mundial. Fuente: UNAIDS, 2012

### 1.1.2. Características del ciclo viral del VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia retroviridae del género Lentivirus, su tamaño es de aproximadamente entre 100 nm de diámetro, y su forma es esférica (**Figura 2**) [6]. Posee una nucleocápside icosaédrica y una bicapa lipídica, capa más externa, en la que se localizan dos glicoproteínas virales: la gp120 y la gp41.

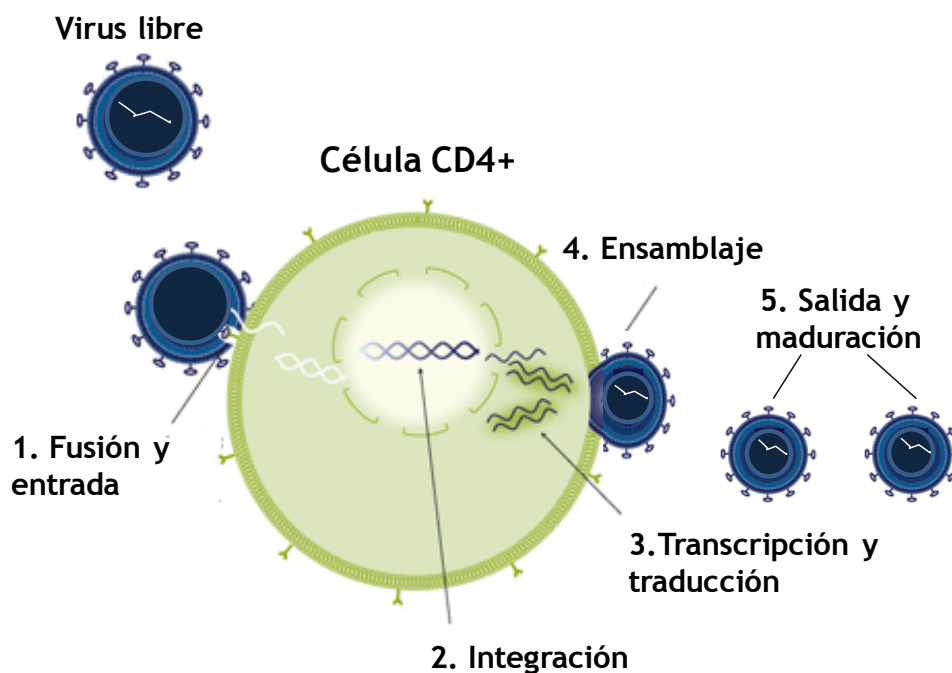


**Figura 2. Estructura del VIH.** Estructura del virión del VIH, representación de las proteínas más relevantes encontradas en todos los retrovirus y que participan en la replicación.

El ciclo de infección del VIH comienza cuando las partículas víricas, a través de las espículas de la envuelta, se unen a las células que presentan la proteína CD4 en la membrana, generando cambios conformacionales en la gp120 que permiten la exposición del sitio de unión al correceptor. De esta forma, la proteína gp41 desencadena el proceso de fusión de la envuelta vírica con la membrana celular [7]. En este proceso participa la glicoproteína gp41, tras la interacción de gp120 con los correceptores CXCR4 o CCR5, permitiendo así la internalización de la nucleocápside y la desencapsidación



del genoma viral dentro de la célula diana [8]. En el ciclo infectivo, la retrotranscriptasa inversa genera ADNc. Una vez que se sintetiza el ADN de doble cadena, es transportado al núcleo en el denominado complejo de preintegración [9] y en un proceso no bien conocido, el ADN viral es covalentemente integrado en el genoma de la célula hospedadora, mediado por la enzima integrasa (**Figura 3**).

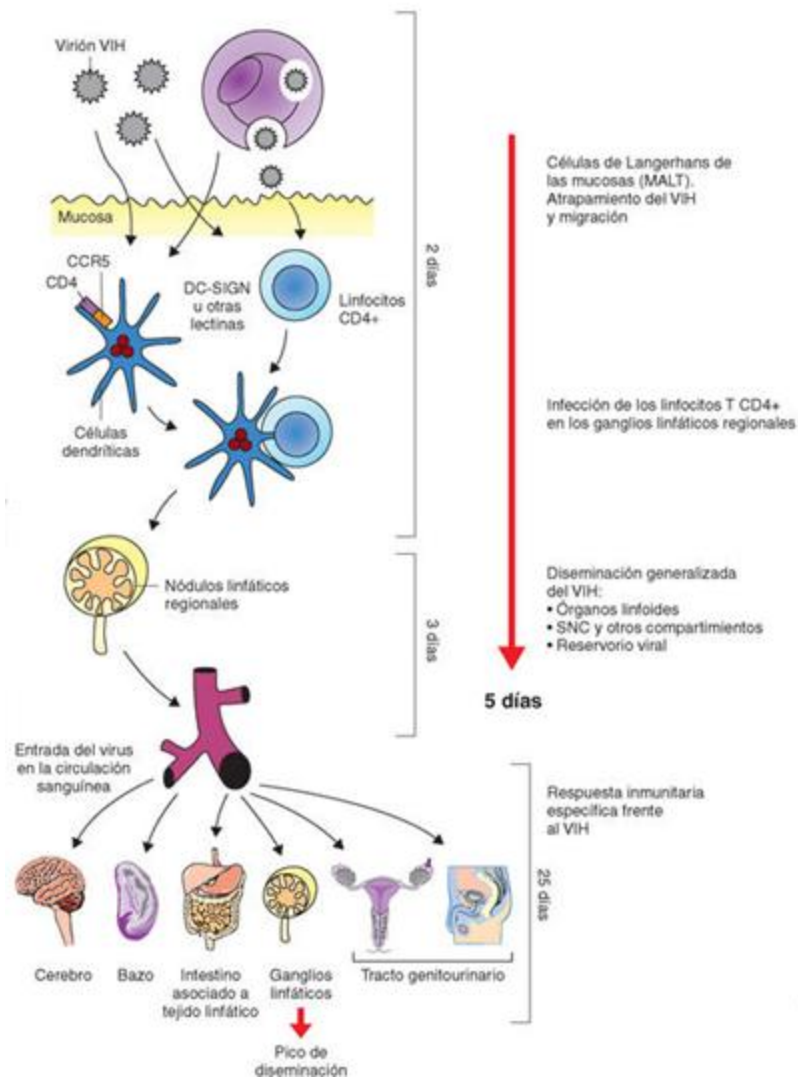


**Figura 3. Ciclo infectivo por el VIH.** (1) Fusión y entrada del VIH: las glicoproteínas gp120 y gp41 de envoltura del VIH, se unen a una molécula de CD4 y un tipo de correceptor (CCR5 o CXCR4) de la célula huésped, vaciando su contenido dentro de la célula. (2) Integración: la enzima viral transcriptasa inversa copia el ARN viral en una hebra de ADN, y lo transporta al interior del núcleo para unirse al ADN celular por la enzima integrasa. (3) Transcripción y traducción: la célula se divide y transcribe el ADN viral formando cadenas largas de proteínas virales. (4) Ensamblaje: Los grupos de proteínas virales se juntan para el ensamblaje de los nuevos virus. (5) Salida y maduración: los virus inmaduros salen por gemación llevándose parte de la membrana celular, la proteasa forma las cadenas virales del virus que conforman el núcleo viral, formando un nuevo virus infectivo.

El VIH, una vez integrado puede permanecer latente, manteniendo una replicación viral residual o experimentar una replicación masiva y extenderse por todo el organismo. El que el virus permanezca latente o no depende de factores virales y celulares [10, 11]. Cuando el VIH replica activamente, utiliza la maquinaria celular que permite la transcripción de ARN mensajeros necesarios para la expresión de sus proteínas a partir del ADN viral integrado en el núcleo. Una vez procesadas, las proteínas virales son modificadas después de la traducción y antes del ensamblaje de las partículas virales maduras [12]. El ciclo infectivo termina con la salida de nuevos viriones por gemación [13]. La duración de un ciclo infeccioso del VIH está estimada, en condiciones *in vivo*, en aproximadamente 1 a 2 días [14].

### ***1.1.3. Efectos de la infección por el VIH en el Sistema Inmunológico***

La infección por el VIH se transmite a través del intercambio de fluidos biológicos contaminados; por lo tanto, es una infección de transmisión sexual, y/o parenteral. De tal forma que la entrada del VIH puede darse a través de las mucosas (**Figura 4**) o bien directamente en circulación por el uso de agujas o jeringuillas infectadas.



**Figura 4. Proceso de infección a través de mucosas.** La gráfica muestra la secuencia inicial de la infección por el VIH por transmisión sexual y su consecuente diseminación generalizada en todo el organismo. Fuente: adaptado de Pilcher *et al*, 2004 [11]

Aunque a los pocos días de la infección se observa una respuesta inmunológica específica frente al VIH, esta respuesta no es suficiente para erradicar al virus, y si no se emplean la terapia antirretroviral adecuada se produce una degradación progresiva del SI, principalmente una pérdida de linfocitos T CD4, su principal diana, que conduce a la enfermedad del SIDA. De tal forma que el principal efecto de la infección por el VIH en el organismo es una progresiva pérdida del número de linfocitos T CD4 en sangre periférica

y en tejido linfoide [15], observándose defectos funcionales en las células, que incluyen fallos en la proliferación y en la producción de citoquinas en respuesta a antígenos comúnmente encontrados, y anergia para hipersensibilidad retardada en piel [16, 17].

Además de la profunda deficiencia inmune, la presencia del VIH y los esfuerzos del SI de combatir la infección conducen a un estado de activación inmune crónica, sobre todo en los linfocitos T CD4, T CD8 y monocitos [18, 19]. Esta hiperactivación inmune contribuye a la erosión y el agotamiento de las poblaciones inmunes y en especial de los linfocitos T CD4, lo cual limita la capacidad del huésped para proveer defensas contra patógenos oportunistas, y potencia la propagación del VIH ya que los linfocitos T CD4 activados son más permisivos a la replicación del virus.

Las infecciones oportunistas observadas en los individuos VIH+ son principalmente debidas a defectos en número y funcionalidad de linfocitos T CD4, como resultado directo o indirecto de la infección por el VIH [20]. Los efectos directos del VIH incluyen infección y citotoxicidad con pérdida de linfocitos T CD4. Los efectos indirectos incluyen una disminución de la proliferación y diferenciación de linfocitos T CD4, desregulación del fenotipo y cambios en el patrón de secreción de citoquinas, y otras alteraciones a nivel de precursores como la infección de células progenitoras CD34+ de la médula ósea y timocitos [15]. Estos defectos pueden contribuir a la falta de reconstitución o recuperación de linfocitos T en fases más tardías de la enfermedad [21, 22].

La infección por el VIH se caracteriza por una inversión del cociente de linfocitos T CD4/CD8. Hasta las fases muy tardías de la enfermedad, el número total de células CD3+ permanece relativamente constante con un aumento de linfocitos T CD8 que contrarrestan la pérdida de linfocitos T CD4 [23]. En las fases más tardías de la enfermedad, los defectos en la linfopoyesis producen una incapacidad para mantener la homeostasis de linfocitos T, produciéndose una pérdida subsiguiente de ambos tipos celulares CD4+ y CD8+ [24].

## 1.2. Las células T reguladoras

El SI cuenta con poblaciones celulares muy especializadas capaces de defender a los individuos frente a factores exógenos e internos del organismo. La comunicación entre ellas, la coordinación en los procesos, la respuesta efectiva frente a una alerta hacen la diferencia entre un SI equilibrado y uno patológicamente defectuoso. Las células Treg son una subpoblación especializada de células T CD4 que constituyen un componente celular indispensable del SI normal y juegan un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento de la auto-tolerancia y la homeostasis inmunológica [23, 25]. En cuanto a sus mecanismos de acción, las células Treg suprimen la proliferación y la función de las células T CD4 y CD8, y de otras células como las células B, NK (siglas en inglés: *Natural killer cells*), macrófagos, osteoclastos y células dendríticas [26]. Debido a su gran capacidad para regular las respuestas inmunológicas, las Treg tienen un papel muy importante en las enfermedades autoinmunes, cáncer, alergias, rechazo a trasplantes e infecciones [23, 27, 28].

### 1.2.1. Origen y clasificación de las células Treg

Las células Treg, se originan principalmente en el timo. Estas células se identifican por una alta expresión constitutiva de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25), y se caracterizan principalmente por expresar el factor de transcripción Foxp3 (siglas en inglés: *forkhead box protein 3*), por lo que la definición más aceptada de célula Treg son aquellos linfocitos con fenotipo CD4+CD25+Foxp3+. Las Treg originadas en el timo se definen como células Treg naturales [29].

Estudios *in vitro* han demostrado que las células Treg también pueden inducirse en periferia a partir de células T *naïve* convencionales. Estas Treg son conocidas como Treg inducidas, y se generan bajo ciertas condiciones como: la activación a través del TCR, la presencia de citoquinas inmunosupresoras como el factor transformante de crecimiento beta (TGF-β) y la interleuquina IL-10, en presencia de células dendríticas tolerogénicas, o

de agentes inmuno-moduladores como el ácido retinoico, la vitamina D3, la dexametasona y la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) [30].

### 1.2.2. Homeostasis de las células Treg

La homeostasis periférica de células Treg está asociada a un aumento en paralelo al número de células activadas, de este modo, la expansión o activación periférica de células durante una respuesta inmune permanece bajo control evitando una activación excesiva del SI. Este mecanismo de homeostasis depende de la presencia de IL-2 y la expresión del receptor para IL-2 (IL-2R $\alpha$  o CD25) en las Treg [31, 32]. El mecanismo por el cual la IL-2 cumple dicha función es debido a que está implicada en el control de la expresión del gen de *FOXP3* en las Treg y no en células CD4+CD25– [33]. La regulación a través de IL-2 y su receptor en la superficie de las Treg (CD25) se realiza a través de la molécula STAT5 para la cual existen sitios de unión altamente conservados que se encuentra en el primer intrón del gen *FOXP3* [34]. El gen *Foxp3*, además de ser el marcador que define a esta población juega un papel primordial en la funcionalidad o capacidad supresora de la célula Treg [35]. Se ha descrito que este mecanismo de homeostasis permite mantener un estrecho equilibrio entre la población de células T CD4 activadas o efectoras y las células Treg. Si el número de células T CD4 productoras de IL-2 (activadas/efectoras) aumenta, las concentraciones de IL-2 también aumentarían, esto generaría una activación/expansión en paralelo de las células Treg en respuesta a la activación/expansión de células T CD4 y finalmente, se establecería un estado de equilibrio [31, 36]. De esta manera, la proporción relativa de Treg y células T activadas se mantiene de forma estable incluso cuando el número total de células T CD4 se altera drásticamente.

### 1.2.3. Las células Treg y la infección por el VIH

En la mayoría de las infecciones las células Treg se inducen o expanden con el fin de modular la respuesta inmune del huésped y así evitar la

hiperactivación del mismo [37]. La hiperactivación inmune asociada a la infección por el VIH puede conducir al agotamiento de la población de células T CD4+ pudiendo comprometer la respuesta inmune específica contra el VIH [37]. Por ello, la hiperactivación inmune se considera el marcador más fiable de la progresión de la enfermedad a SIDA [38]. El papel de las células Treg en el proceso de la infección por el VIH es fundamental, debido por un lado a su capacidad potencial para suprimir las respuestas inmunes específicas frente al VIH[1], pero también por su implicación en la homeostasis inmune y en la prevención de la hiperactivación del SI.

Sin embargo, los hallazgos en relación con las Treg en pacientes infectados por el VIH no son concluyentes, y existe una gran controversia sobre el papel exacto de estas células en la infección por el VIH. Esto se debe principalmente a la falta de consenso en la determinación del fenotipo Treg, y al desconocimiento existente de la dinámica de las células Treg en sangre periférica durante el transcurso de la infección por el VIH. De hecho, distintos grupos han demostrado la presencia de valores disminuidos de Treg [39, 40] y de valores aumentados [29, 41] en individuos VIH+. Existen varias explicaciones posibles para estos resultados contradictorios. Se ha demostrado que en pacientes infectados por el VIH se da una inducción transitoria de Foxp3 en célula que no son Treg a causa de la activación o la estimulación del TCR [29]. En muchos estudios las células Treg se han identificado fenotípicamente como CD4+CD25+CD127-, sin embargo un estudio reciente demostró que en pacientes con carga viral alta el porcentaje de esta subpoblación no se correlaciona con el porcentaje de las células Foxp3 [42]. Otra posible explicación es que en la mayoría de trabajos determinan los porcentajes y no los valores absolutos de Treg, y una marcada depleción de células CD4+ o un agotamiento de células T CD4 efectoras en los pacientes VIH aumentaría la proporción relativa de células Treg en el total de las células CD4+ sin coincidir con un aumento en el número absoluto de las células Treg.

Otro factor que dificulta el estudio de las células Treg en la infección por el VIH es el hecho de que estas células, al ser una subpoblación de células CD4 y que también expresan los correceptores CCR5 y CXCR4, serían por tanto

susceptibles de ser infectadas por el VIH [40, 43]. Sin embargo, este hecho no se ha confirmado y se desconocen los efectos potenciales de la infección por el VIH sobre el fenotipo y la funcionalidad de las Treg.

La **expresión de Foxp3** en las células Treg determina su fenotipo y su identidad como célula reguladora, ya que de su expresión depende la capacidad funcional supresora de estas células [44]. No obstante, una de las dificultades para definir la población de células Treg funcionales es que Foxp3 también puede ser expresado por las células T CD4 *naïve* activadas en periferia [45]. Sin embargo, esa expresión es transitoria [35] y además se ha demostrado que estas Treg inducidas poseen una capacidad supresora muy limitada [46, 47]. Por otra parte, varios estudios han demostrado que la regulación epigenética del gen *FOXP3* es fundamental para la expresión de Foxp3 en las células Treg [48]. De hecho, se ha descrito que es necesario que la región promotora del gen *FOXP3* y otras regiones próximas a sus elementos regulatorios no se encuentren metiladas, para que Foxp3 pueda expresarse adecuadamente [48, 49]. La metilación del DNA es además un mecanismo natural de las células por el que activan o inhiben la expresión de determinados genes, y se ha demostrado que la metilación es también un mecanismo de defensa de la célula frente a virus dirigido a suprimir la expresión de los genes virales [50]. De hecho, se ha demostrado que durante la infección retroviral se produce un aumento de la metilación del genoma viral, particularmente en las regiones LTR que estaría mediado por aumento de las enzimas metiltransferasas (DNMT) [51]. También se ha demostrado que concretamente la infección por VIH de células T CD4 produce un incremento de estas DNMT [51]. Dado que el perfil de metilación es un factor clave para la expresión de Foxp3, y que la infección por VIH podría aumentar la expresión de enzimas que favorecen la metilación, cabe pensar que la infección por el VIH de células Treg podría producir alteraciones en su fenotipo y funcionalidad.

La potencial desregulación de la población Treg a causa de la infección tendría consecuencias en la homeostasis inmune y podría estar detrás de la hiperactivación inmune presente en estos pacientes. Las Treg han demostrado



modular las respuestas inmunes del hospedador evitando la sobre-activación del SI [37]. De hecho, varios autores han demostrado que una disminución en el número absoluto de las células Treg genera un fallo sobre el control de la activación del SI [52-54]. Además, dado que la activación de las células CD4+ las convierte en dianas preferentes de la infección por el virus, esta situación favorecería la expansión del VIH [55].

### 1.3. Uso de nanopartículas frente a la infección por el VIH

En los últimos años, el interés por la nanotecnología ha aumentado considerablemente por sus posibles aplicaciones en el campo de la medicina. La nanomedicina mezcla los conocimientos biológicos, químicos y físicos para intentar diseñar o fabricar materiales a nivel molecular (1 a 10nm) (**Figura 5**) con fines preventivos, de diagnóstico o terapéuticos [56, 57]. En los últimos años la nanotecnología ha brindado importantes avances particularmente en el diagnóstico y tratamiento del cáncer [58, 59].

En el campo de la infección por el VIH, las aplicaciones de la nanotecnología en la prevención y tratamiento del VIH/SIDA han ido aumentando [57, 60]. La gran mayoría de los estudios de nanomedicina aplicada al VIH van dirigidos hacia la mejora de las estrategias terapéuticas, como la terapia génica y la inmunoterapia, además del estudio de los efectos *per se* de los nanomateriales [61, 62]. También se han descrito aplicaciones en las estrategias de prevención mediante el desarrollo de vacunas y microbicidas [62-65]. El desarrollo de las nanopartículas como plataformas a través de las cuales se consiga una mejora en la liberación de medicamentos está revolucionando el tratamiento del VIH/SIDA [66]. De este modo, se puede reducir la toxicidad asociada al fármaco, manteniéndose en la circulación las concentraciones adecuadas y durante más tiempo [67], necesario para evitar el desarrollo de resistencias a los medicamentos, de gran impacto en el sector biotecnológico.

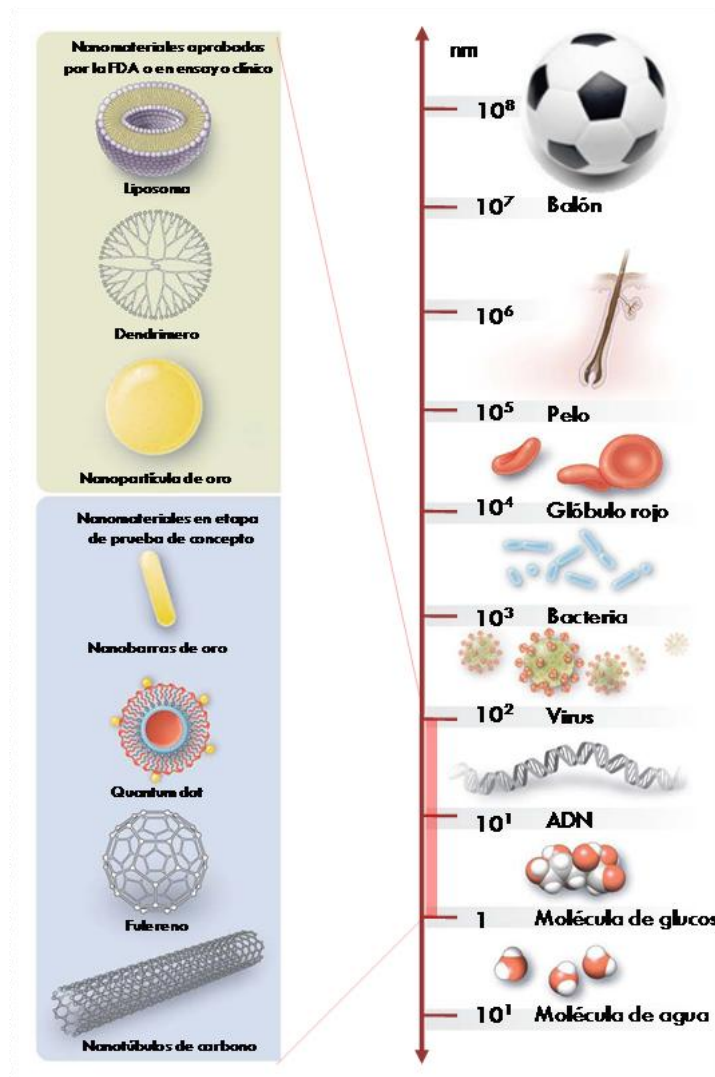
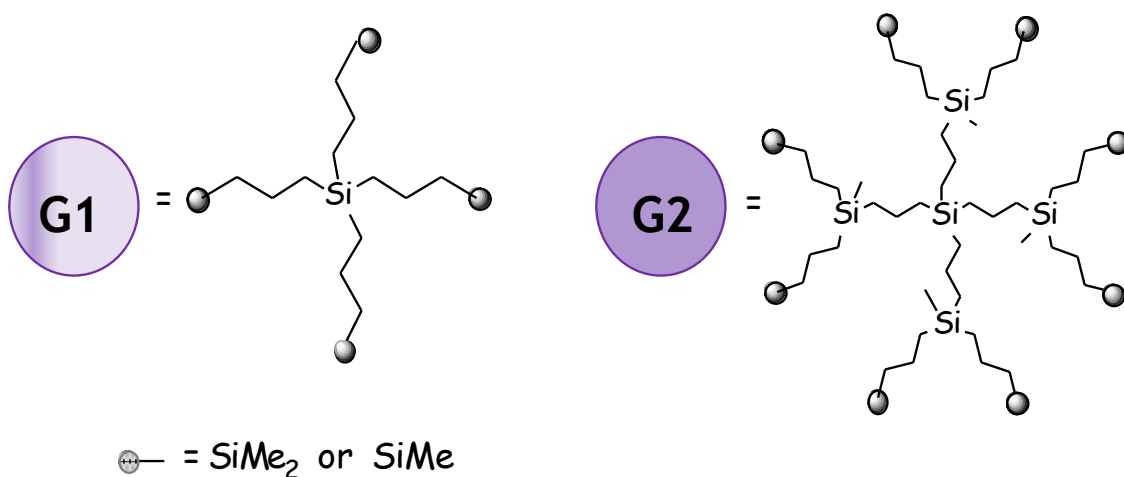


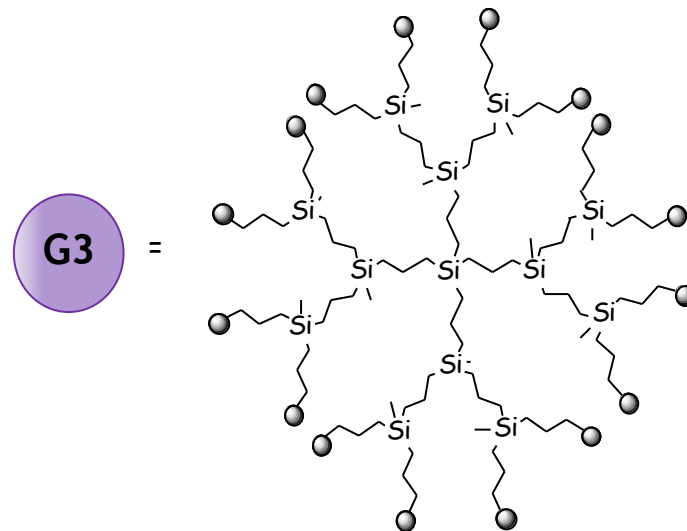
Figura 5. Nanopartículas utilizadas en biomedicina. Listado de nanopartículas en fase de ensayo clínico para su aplicación en humanos, aprobados por la Agencia de Fármacos y Alimentos de EEUU (FDA). Se muestra el tamaño de las nanopartículas en escala nanométrica comparada con el tamaño de distintas moléculas u objetos. Fuente: Kim, BY. 2010 [68].

### 1.3.1. Dendrimeros

Los dendrimeros tienen un gran interés en biomedicina debido a su posible valor terapéutico. El término dendrimer procede del griego *dendrón* que significa árbol o rama y *mero* que significa segmento [69]. Otro nombre que reciben los dendrimeros es el de “árboles” por su semejanza con las raíces de

los árboles [70]. Esta arquitectura molecular híper-ramificada (**Figura 6**), que desarrollaron por primera vez Buhleier y col. en 1978 [71] se puede dividir en tres partes principales: **i) el núcleo central o core:** es el átomo (o grupo de átomos) a partir del cual aparecen las primeras ramas. Es la unidad central sobre la que se ramifican las sucesivas capas del dendrímero; **ii) grupos de enlace:** son las unidades que están enlazadas con el núcleo central y que a su vez enlazan con nuevos grupos de la siguiente capa del dendrímero. Realizan la función de punto focal sobre la que parten las nuevas ramas o los grupos finales. Cada nueva determinará la generación del dendrímero; **iii) corteza:** el almacén externo, los grupos terminales situados en la parte más superficial del dendrímero. De tal forma que cuanto mayor sea el número de capas de los grupos de enlace, mayor será la generación del dendrímero. Así, un dendrímero de generación 3 presenta por tanto 3 puntos focales entre el núcleo y la superficie. A medida que la estructura dendrímica se va incrementando, van apareciendo nuevos compartimentos, y a su vez la corteza va creciendo, aumentando así la cantidad de superficie multivalente (potenciales grupos reactivos).





**Figura 6. Ejemplos de la estructura de un dendrímero carbosilano.** De izquierda a derecha: primera generación (G1), segunda generación (G2) y tercera generación (G3).

Los dendrímeros utilizados en esta Memoria son carbosilano y se caracterizan por tener estructuras basadas en enlaces carbono-carbono y carbono-silicio, este tipo de enlaces es el que confiere a la molécula una gran hidrofobicidad [72]. 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 se sintetizaron en 1992 y son una clase muy importante y extensa debido a la gran estabilidad química, puesto que se necesita mucha energía para romper el enlace entre el carbono y el silicio (306 kJ/mol), y a la capacidad de sintetizarse hasta generaciones muy altas (7G) [73]. 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. Esto genera un alto control sobre la densidad de las estructuras formadas. 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 en comparación con otros tipos de dendrímeros.

### 1.3.2. Aplicaciones biomédicas de los dendrímeros

Para validar un dendrímero para su aplicación en biomedicina, se deben considerar varios aspectos, como la biocompatibilidad debida a la toxicidad, la posible inmunogenicidad en el caso del desarrollo de vacunas, la capacidad de atravesar barreras biológicas dependiendo de la diana celular que sea de interés, la internalización en las células dependiendo de la función deseada, y poder direccionar al dendrímero de un modo específico a las células u órgano diana.

La toxicidad de los dendrímeros está determinada por la naturaleza química del esqueleto dendrimérico y por grupos activos de su superficie. Se ha demostrado que a mayor generación de los dendrímeros mayor toxicidad [74]. Otra característica de los dendrímeros que parece afectar a las células es la flexibilidad del dendrímero, ya que los dendrímeros catiónicos con estructura globular y poca flexibilidad, generan menos daños celulares que los dendrímeros lineales con aminas, que son más flexibles [70]. Los dendrímeros amino-terminados catiónicos que tienen carga neta positiva, presentan mayor toxicidad debido a las interacciones con la membrana celular que tiene carga neta negativa, dañándola y causando la lisis de la célula. Sin embargo, los dendrímeros aniónicos, son menos tóxicos [74]. La toxicidad de un dendrímero disminuye cuando se acompleja con otra molécula. En los estudios realizados *in vivo*, la tolerancia a los dendrímeros aumenta, ya que concentraciones altas de dendrímeros no producen toxicidad en ratones [75].

Según los grupos funcionales que presenten los dendrímeros, se pueden clasificar en tres grupos: dendrímeros neutros, catiónicos y aniónicos. Los dendrímeros neutros, sin cargas en la superficie, se desarrollaron para obtener moléculas que presenten una menor toxicidad y actúen como agentes antibacterianos [76]. Los dendrímeros con grupos catiónicos, debido a las uniones que pueden formar con moléculas cargadas negativamente, pueden utilizarse como agentes transportadores de fármacos aniónicos [77, 78],

transfectantes en terapia génica, como transportadores de ácidos nucleicos [79-82] y como transportadores de péptidos en células dendríticas 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 [83, 84]. Los dendrímeros catiónicos pueden unir las moléculas en su superficie o bien en los bolsillos centrales, en el caso de los dendrímeros carboxilano, se unen en la superficie debido a que es la parte polar del dendrímero. El complejo de moléculas unidas al dendrímero recibe el nombre de dendriplex.

Además, los dendrímeros catiónicos poseen efectos farmacológicos *per se*, como su capacidad de solubilizar agregados de proteínas priónicas [85], o péptidos amiloides frente a la enfermedad de Alzheimer [86, 87] y cáncer [88]. Muy importante, estos dendrímeros pueden inducir cambios en la expresión génica de tipos celulares, reprimiendo IL17A, IL17F, IL23R y IL23A, por lo que podrían utilizarse para tratar procesos autoinmunes [79, 80, 89] o producir cambios de polarización en macrófagos [90].

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 algunos dendrímeros polianiónicos frente a infecciones por el virus del herpes simplex [91], o que bloquean y evitan la infección por el VIH-1 en distintos tipos celulares y podrían tener una aplicación como microbicidas frente al VIH [62, 64, 92, 93]. Estudios que se realizaron en los que se combinaban dendrímeros carboxilano con antirretrovirales demostraron tener un efecto significativo impidiendo la infección por el VIH-1 [62, 64, 92, 93]. Los dendrímeros aniónicos también han mostrado tener un efecto bactericida [94].

Debido a las múltiples aplicaciones de los dendrímeros, en esta Memoria se ha investigado el efecto de dendrímeros carboxilano catiónicos (2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-NN24) y aniónicos (2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16) sobre el fenotipo y función de las células Treg, así como la capacidad antiviral

*per sede* de dendrímeros aniónicos como protectores de las células Treg frente a la infección por el VIH [95].

A modo de resumen, aunque existen muchos estudios descriptivos sobre la frecuencia de células Treg en pacientes infectados por el VIH, los resultados obtenidos hasta el momento son controvertidos. Además, se desconoce si el VIH es capaz de infectar las Treg, y en tal caso, cómo afecta a su fenotipo y funcionalidad, lo cual es imprescindible para el correcto entendimiento de la dinámica y el papel de las Treg en la infección. Basado en lo anterior, el objetivo de esta Memoria fue esclarecer la interacción existente entre las células Treg y el VIH. Para ello se estudiaron los efectos de la infección por el VIH sobre las células Treg en un modelo *in vitro*. Otro objetivo fue trasladar las observaciones obtenidas a un modelo *in vivo* con pacientes infectados por el VIH, haciendo un análisis completo de la población de células Treg, teniendo en cuenta parámetros como la carga viral y el estado inmunológico de los pacientes. Y por último, otro objetivo fue evaluar la seguridad, efecto sobre el fenotipo, y actividad anti-VIH de los dendrímeros carbosilano catiónicos y aniónicos en células Treg.

Por lo tanto, los resultados presentados en esta Memoria abren la puerta al desarrollo de nuevas terapias basadas en células Treg, con el fin de favorecer la respuesta de las células Treg y mejorar la homeostasis inmune de los individuos VIH+. Además, los hallazgos sobre la población de células Treg presentados en esta memoria pueden ser explotados para otros estudios y como herramienta para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y diversas patologías inmunológicas.

## 2. OBJETIVOS

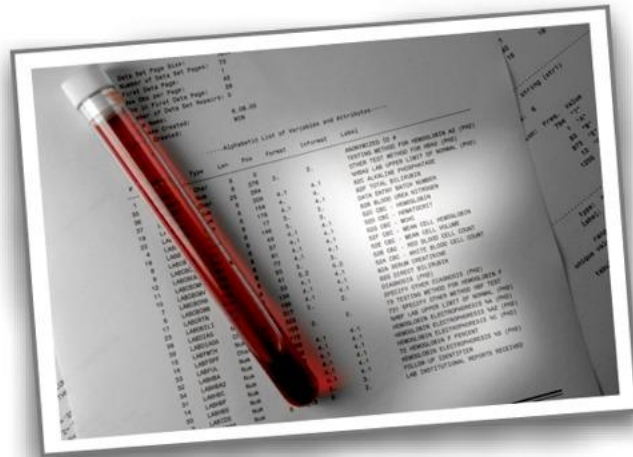




**El objetivo principal** de esta Memoria fue evaluar el efecto de la infección por el VIH-1 sobre las células Treg, determinar cómo afectan las Treg a la homeostasis inmunológica en pacientes infectados por el VIH, y ensayar un posible tratamiento basado en la nanomedicina, que evite la infección de estas células. Para ello fueron planteados los siguientes objetivos concretos:

- 1) Realizar un estudio *in vitro* para saber si las células Treg son susceptibles de ser infectadas por el VIH-1, y en tal caso estudiar los efectos de la infección en el fenotipo y la funcionalidad de estas células.
- 2) Analizar los mecanismos responsables de las posibles alteraciones producidas por la infección por el VIH en las células Treg.
- 3) Estudiar la población Treg en pacientes infectados por el VIH, analizando cómo influye la presencia del VIH en el fenotipo y función de estas células, y cómo se correlacionan con el estado inmunológico del paciente.
- 4) Estudiar si el tratamiento *in vitro* con diferentes dendrímeros carboxilano tiene efectos en la viabilidad, fenotipo y funcionalidad de las células Treg.
- 5) Analizar el uso de dendrímeros carboxilano aniónicos como inhibidores de la infección por el VIH en células Treg, y su capacidad para prevenir los efectos de la infección sobre estas células.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS



## 3.1. Análisis *in vitro* de la Infección de las células Treg por el VIH-1

### 3.1.1. Procesamiento de muestras y aislamiento de las células Treg

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 15 voluntarios varones sanos con edades comprendidas entre 25-40 años. Las muestras fueron codificadas para proteger y mantener la confidencialidad de los participantes, y no se recogieron datos clínicos o demográficos, cumpliendo con las pautas del Tratado de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Todas las muestras se procesaron inmediatamente después de su extracción.

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aislaron mediante un gradiente de Ficoll (Lonza, España) siguiendo los estándares del Biobanco VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, España) [96]. La sangre se diluyó 1:1 con PBS. El gradiente de ficoll se utilizó en una proporción de 1 parte de ficoll por 3 partes de sangre dejando la sangre suspendida suavemente sobre el ficoll evitando alterar la interfase. Posteriormente, se centrifugó a 1800 r.p.m durante 30 min. Se recuperó el halo que contiene las CMSP y se realizaron 3 ciclos de lavado con PBS (10 min a 1500 r.p.m.). Posteriormente, se purificaron los linfocitos T CD4 por separación inmuno-magnética utilizando *CD4+ T cell isolation Kit II human* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los linfocitos T CD4 purificados se marcaron inmediatamente con anti-CD25 PC7 (eBioscience), anti-CD127 PE (Beckman Coulter) y anti-CD4 APC (Miltenyi Biotec), en oscuridad durante 30 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con buffer de citometría, [PBS más 0,5% BSA (Albúmina de suero bovino) y 2mM EDTA ( $C_{10}H_{16}N_{2}O_8$ ; 292,24g/mol)] para

eliminar el exceso de anticuerpo, y se resuspendieron en el mismo buffer a una concentración de  $20 \times 10^6$  células/mL. La separación de las células Treg (CD4+CD25+CD127-) se realizó en un Sorter ASTRIOS (Beckman Coulter). La pureza de las células Treg aisladas fue > 95%. Se comprobó que las Treg purificadas no estaban contaminadas con células T CD8+ por citometría de flujo, en el citómetro GALLIOS Beckman Coulter. Además, la pureza de las células Treg se analizó en los cultivos y se confirmó que más del 90% de las células eran CD4+CD25+CD127- y más del 85% de eran Foxp3<sup>+</sup>.

### 3.1.2. Expansión y activación de las células Treg

Las células Treg aisladas por “sorter” se expandieron con 200 µl de partículas recubiertas de anti-CD3/anti-CD28 por cada  $1 \times 10^6$  células utilizando *Dynabeads Human Treg Expander* (Invitrogen, Oslo, Noruega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células se incubaron durante 3 días en condiciones de cultivo (37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa), en medio *OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion SFM* (GIBCO, Invitrogen cell culture) suplementado con 26mL/L de *OpTmizer T-Cell Expansion Supplement*, 10mL/L de 200mM L-glutamina (concentración final 2mM), 500U/mL de IL-2 y 50µg/mL de penicilina. Transcurrido este tiempo, se retiraron las partículas recubiertas de anti-CD3/anti-CD28, y se dejaron las células en cultivo durante 24 h con medio RPMI-1640 (Life technology, España) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 2mM de L-glutamina, un cóctel de antibióticos (125mg/mL de ampicilina, 125mg/mL de cloxaciclina y 40mg/mL de gentamicina; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, EE.UU.) y 500U/mL de IL-2.

### 3.1.3. Producción, cuantificación y titulación de los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub>

Los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> son aislados de laboratorio producidos mediante transfección transitoria de los plásmidos pNL4.3 y pNLAD8 respectivamente (*NIH AIDS Research and Reference Reagent*

*Program, Division of AIDS, NIAID*) en la línea celular 293T. Se aislaron y purificaron plásmidos conteniendo el genoma viral, crecidos en *E.coli* (Plasmid MaxiPrep, QIAGEN®) se transfectaron placas de cultivo de células 293T con 15µg de plásmido/placa utilizando un método de transfección por cloruro cálcico. A las 24 h se eliminó el medio y se lavaron los cultivos celulares 2 veces para retirar el exceso de producto de transfección. Se añadió medio nuevo al cultivo celular, recogiendo la producción viral presente en el sobrenadante del cultivo a las 24 h. Los stocks de virus se clarificaron por filtración (filtro de 0,45µm) y se guardaron a -80°C.

Se cuantificó la proteína viral p24gag de los stock de los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> por un ensayo de ELISA (*INNOTEST® HIV-1 antigen mAB*; Innogenetics, Ghent, Bélgica) y se establecieron los µg de VIH-1 por mL. La titulación de los aislados X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> se realizó en la línea celular HeLa MAGI P4.R5. Estas células poseen una copia de β-galactosidasa bajo el control de LTR del VIH, de tal manera que las células adquieren color azul al infectarse y añadirse el sustrato de X-gal (Sigma). Se cultivaron 2x10<sup>5</sup> células HeLa MAGI P4.R5 con medio de cultivo completo en placas de 24 pocillos y se añadieron 100µL de la preparación viral (X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> o R5 VIH-1<sub>AD8</sub>) a distintas concentraciones, realizándose las diluciones correspondientes. Las infecciones se realizaron por triplicado y se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 48 h. Transcurrido este tiempo las células se fijaron con paraformaldehído 0,8% (Sigma-Aldrich) y 1% de glutaraldehído (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en PBS durante 2 min. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y se añadió 1mL de la solución de marcaje con X-gal (C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BrClNO<sub>6</sub>, 40mg/ml en DMSO), 10µL de MgCl<sub>2</sub> (2M), 20µL de Ferricianuro potásio (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,2M), 20µL de Ferrocianuro potásico (C<sub>6</sub>FeK<sub>4</sub>N<sub>6</sub>·3 H<sub>2</sub>O; 0,2M) y 940µL de PBS, incubando durante 2 h a 37°C. Finalmente, se contaron las células de color azul para determinar el número de unidades infecciosas (UI). La equivalencia de una célula azul corresponde a una UI, el resultado final se expresa en UI/mL.

### 3.1.4. Infección *in vitro* de las células Treg por el VIH-1

Las células Treg obtenidas de la expansión (apartado 3.1.2) se contaron y dividieron en tres tubos con  $5 \times 10^5$  células por tubo, correspondientes a células Treg no infectadas (NI), Treg infectadas por el X4 VIH-1<sub>NL4-3</sub> (VIH-X4) y Treg infectadas por el R5 VIH-1<sub>AD8</sub> (VIH-R5). Las células en las distintas condiciones se lavaron en PBS y resuspendieron en 200  $\mu$ L de medio RPMI 1640 con 10% de SBF. Posteriormente, las células Treg se infectaron con los aislados VIH-X4 o VIH-R5, usando distintas concentraciones de virus (MOI: 0,01; 0,5 y 0,1) durante 3 h. Se lavaron 2 veces con PBS y se cultivaron en placas de 24 pocillos con medio RPMI 1640 (Life technology, España) suplementado con 10% de FBS y 500U/mL de IL-2. En paralelo, se procesaron como controles células T no reguladoras, Treg NI y células Treg infectadas por el VIH-X4 o VIH-R5 y pre-tratadas con AZT o T20 provenientes del mismo donante. El AZT o *zidovudina* ( $C_{10}H_{13}N_5O_4$ ; Pm: 267,242 g/mol, Retrovir, GSK) es un inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa de VIH y se utilizó como control de la inhibición de la replicación viral. El T20 o *enfuvirtide* ( $C_{202}H_{298}N_{50}O_{64}$ ; Pm: 4492,1 g/mol, Trimeris Inc., Hoffman-LaRoche) es un inhibidor de la fusión que impide la fusión del VIH con la célula CD4 evitando la entrada del virus en la célula.

### 3.1.5. Viabilidad celular de los cultivos de células Treg

La viabilidad de las células Treg infectadas por el VIH y las Treg NI se determinó en cada experimento en los días 5 y 7 pos-infección, por citometría de flujo. Para ello, las células Treg se lavaron 2 veces con PBS, y se marcaron utilizando 1  $\mu$ L/10<sup>6</sup>cél de *Fixable Viability Dye Cell Staining* (eBiosciencie, San Diego, CA, EE.UU.). Posteriormente, se incubaron a 4°C durante 30 min en oscuridad. Este procedimiento es compatible con el proceso de permeabilización de las células y fijación necesario para el marcaje de Foxp3 en las células Treg.

### 3.1.6. Análisis de la expresión de *Foxp3* y enzimas metilasas por PCR a tiempo real

Se determinó el nivel de expresión de ARNm para *Foxp3* y para las metilasas DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. El ARN y ADN se aislaron a partir de los pellet congelados de células Treg almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  utilizando *RNA/DNA micro extraction kit* (Qiagen, España). La integridad del ARN se analizó con el sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Alemania) y las muestras con ARN degradado se excluyeron del análisis. Para la síntesis del ADN copia (ADNc) de cadena sencilla se utilizó *Access RT-PCR System* (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. La RT-PCR se realizó con *Brilliant II QPCR Master Mix* (Agilent Technologies, España). Los *primers* utilizados para la amplificación de ARNm se muestran en la **Tabla 1**. Los valores de ARNm detectados se normalizaron utilizando los genes *housekeeping*: gliseraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y Fosforribosiltransferasa de hipoxantina-guanina, (*HPRT*).

**Tabla 1. Listado de *primers* utilizados para la amplificación de FOXP3, DNMTs, HPRT y GAPDH por RT-PCR.**

Secuencia amplificada	Secuencia (5'-3')
Foxp3 full length (forward)	CAGCTGCAGCTGCCCCACTG
Foxp3 full length (reverse)	GCCTTGAGGGAGAAGACC
Dnmt1 (forward)	CCGAGTTGGTGATGGTGTGTAC
Dnmt1 (reverse)	AGGTTGATGTCTGCGTGGTAGC
Dnmt3a (forward)	CACAGCGGAGAAGCCCAAGGTCAA
Dnmt3a (reverse)	CGCCGAGCAGCCCGTAGGTA
Dnmt3b (forward)	GACTTGGTGATTGGCGGAA
Dnmt3b (reverse)	GGCCCTGTGAGCAGCAGA
HPRT (forward)	GCTGAGGATTTGGAAAGGGTG
HPRT (reverse)	TGAGCACACAGAGGGCTACAATG
GAPDH (forward)	ACCACATGCCATGCCATCACT
GAPDH (reverse)	GCCATCACGCCACAGTTTC

### 3.1.7. Marcaje de *Foxp3* y *P24gag* intracelular por citometría de flujo

La expresión de *Foxp3* y la presencia intracelular de la proteína viral p24gag se estudiaron por citometría de flujo realizando previamente un procedimiento de permeabilización de las células para permitir la entrada de los anticuerpos específicos. Para la identificación de las células Treg se marcaron las células con anti-CD4 ECD, anti-CD3 PE-Cy7 (Beckman Coulter), anti-CD25 PE-Cy5 (eBioscience) y el anticuerpo intracelular anti-*Foxp3* PE (eBioscience). Para el marcaje del *Foxp3* se permeabilizaron las células utilizando *Anti-Human Foxp3 Staining Set* (eBioscience). Posteriormente, las células se trataron con permeabilizador/fijador (eBioscience) durante 60 min a 4°C en oscuridad. Se lavaron 2 veces con buffer de permeabilización (1X) (eBioscience) a 1500 r.p.m durante 10 min, siguiendo las especificaciones del fabricante. Las células se bloquearon con 2µl de suero de rata (eBioscience) durante 15 min a 4°C, para evitar los marcajes inespecíficos. Inmediatamente después, se marcaron con anti-*Foxp3* PE. Al mismo tiempo, se marcaron las células con el anticuerpo anti-p24 KC57 FITC (Beckman Coulter), durante 30 min a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron 2 veces con buffer de citometría (PBS, 2mM EDTA pH 7,2 y 0,5% BSA) y se resuspendieron en un volumen final de 500µL del mismo buffer. La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro GALLIOS Beckman Coulter.

### 3.1.8. Análisis del perfil de metilación del gen *FOXP3*

El perfil de metilación del gen *FOXP3* se analizó en las células Treg NI e infectadas por el VIH-1 a 7 días pos-infección, que según trabajos previos era el tiempo donde se observaban los mayores cambios mediados por el VIH-1 en la expresión de metilasas [97]. El ADN extraído de las células Treg se sometió a la reacción de bisulfito usando *Epiect Bisulfite Kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Esta técnica llamada de pirimidinación permite diferenciar las regiones metiladas del ADN o islas CpG asociadas a la inactivación de genes, de las regiones no metiladas. De este modo, las bases

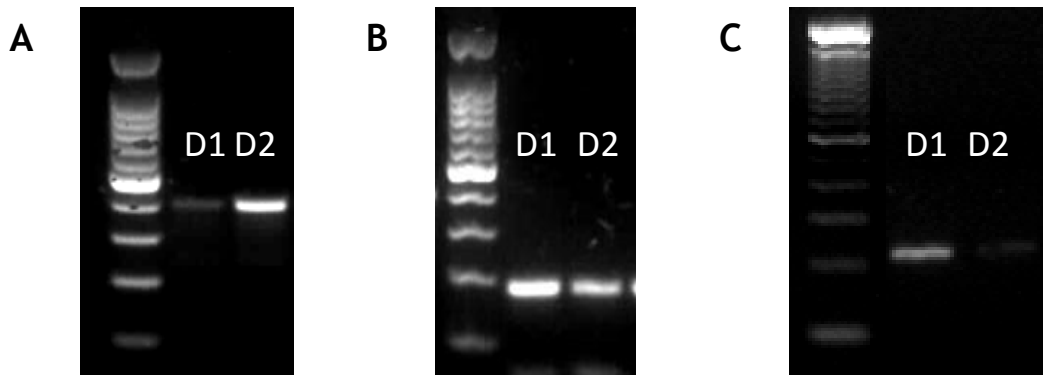


citocinas que no están metiladas se cambian por uracilo durante la amplificación del ADN y las bases citosinas metiladas no cambian, obteniéndose así, secuencias metiladas y no metiladas de ADN. Posteriormente, se amplificaron por PCR tres regiones específicas del gen *FOXP3*, usando *primers* específicos para el ADN bisulfitado (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de *primers* específicos para la amplificación de las regiones del gen *FOXP3* (Promotor, CNS2 y *enhancer*) en ADN bisulfitado.

Región amplificada	Secuencia bisulfitada (5'-3')
Promotor (forward)	TTTTTGTTGGTGAGGGGAAGAAATTATATT
Promotor (reverse)	TACCATCTCCTCCAATAAAACCCACATC
CNS2 (forward)	TTTGGGTTAAGTTTGTGTAGGATAGGGTAGTTAG
CNS2 (reverse)	AAATCTACATCTAAACCCTATTATCACAACCCC
enhancer (forward)	AATGTGGGGATTAGGTAAAATTTTT
enhancer (reverse)	AAACCTTAAACTACCACTAAC

Los productos de la PCR obtenidos de las tres regiones del gen *FOXP3* se purificaron a partir de la banda obtenida por electroforesis en un gel de agarosa al 2% utilizando *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EE.UU.), como se muestra en la **Figura 7**. Una vez obtenidos los productos de PCR puros, se clonaron dentro del pCR®II-TOPO® TA vector (Invitrogen), como se muestra en la **Figura 8**. Para ello, se utilizaron 4µL del producto de PCR, 1µl de solución salina y 1µl del vector. La mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente, siguiendo las especificaciones del protocolo *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen). Tras este tiempo, se continuó con la transformación de las bacterias *One Shot TOP10 Chemically Competent E.coli* (Invitrogen).



**Figura 7. Amplificación del gen FOXP3 en tres regiones después del tratamiento con bisulfito.** Las bandas muestran la región promotora del gen *FOXP3* (400pb) (A), región CNS2 (200pb) (B) y región enhancer (250pb) (C) de dos donantes distintos (D1 y D2), representativos de 15 donantes.

A partir de la reacción del apartado anterior, se tomaron 2µl de la reacción de clonaje y se mezclaron suavemente con bacterias *TOP10 chemically competent E.Coli* (Invitrogen) para la transformación. Las bacterias se incubaron durante 30 min sobre hielo e inmediatamente después, se realizó un choque térmico de 30 seg a 42°C y 2 min sobre hielo para permitir la entrada del vector a las bacterias. Posteriormente se agregaron 250µl de medio S.O.C y se incubaron 1 h a 37°C. Finalmente, se cultivaron 200µL de las bacterias sobre placas de LB-agar que contenían 100µg/mL de ampicilina y 20mg/mL de X-gal (sigma- Aldrich, EE.UU), precalentadas a 37°C y se incubaron toda la noche a 37°C.

Las colonias que no llevaban el inserto de interés se reconocieron por la expresión del gen *LacZα* inductor de galactosa en las bacterias, tornándolas de una coloración azul por la hidrólisis de X-gal presente en el medio de cultivo. Se analizaron 20 colonias positivas para cada región, las cuales se crecieron en 4mL de LB líquido con ampicilina 100µg/mL a 37°C a 120 r.p.m. durante 12 h. para la purificación del ADN plásmidico. El ADN se obtuvo usando *Minipreps SV Purification Kit* (Promega) y se secuenció utilizando los *primers*: M13 Forward, secuencia: 5´-GTAAAACGACGGCCAG-3´y M13 Reverse: 5´-CAGGAAACAGCTATGAC-3´.

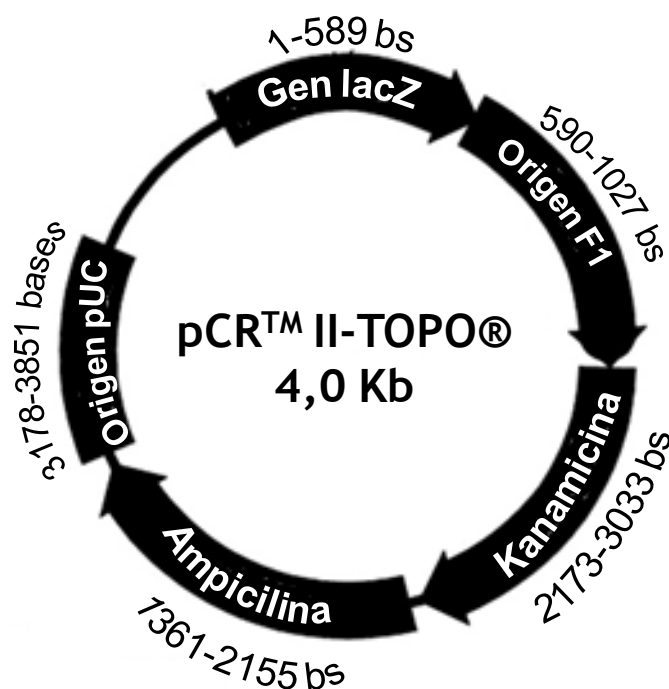


Figura 8. Mapa estructural del vector pCRII-TOPO utilizado para la clonación de los productos de PCR de las regiones del gen FOXP3. Adaptado del protocolo *TOPO TA cloning* de Invitrogen.

### 3.1.9. Análisis de la capacidad supresora de las células Treg sobre la proliferación de células T efectoras.

El análisis de la función de las células Treg se realizó a los 5 días post-infección por el VIH-1, cuando la viabilidad celular era mayor del 80%. Se analizó la capacidad supresora sobre la proliferación de las células T efectoras (T-efect). A partir de las CMSP de donantes sanos se aislaron células T-efect y se marcaron con CFSE (Invitrogen). Las células alogénicas presentadoras de antígeno (CPA) se purificaron por marcaje inmuno-magnético como fracción negativa de células T CD3<sup>+</sup> del total de CMSP, y se incubaron con 20µg/ml de *Mitomicina C* (Roche Applied Biosystems) durante 3 h a 37°C. El ensayo de proliferación celular se realizó en cultivo mixto de T-efect y las CPA (para estimular la proliferación de T-efect) con las células Treg no-infectadas e infectadas por el VIH a distintos ratios. Los cultivos celulares se estimularon con anti-CD3 durante 5 días. Se analizó por citometría de flujo la disminución

de la señal de CFSE que debería ser proporcional al grado de proliferación obtenido en células T-efect.

### **3.1.10. Análisis de la capacidad supresora de las células Treg sobre la activación de células mononucleares de sangre periférica**

Los análisis de la capacidad supresora de las Treg para inhibir la activación de las CMSP se realizaron mezclando CMSP alogénicas en un ratio 1:1 con células Treg no-infectadas e infectadas por el VIH. Los cultivos mixtos de células Treg y CMSP alogénicas se activaron con 0,5 partículas magnéticas recubiertas de anti-CD3/anti-CD28 por cada CMSP, usando *Dynabeads T-Activator anti-CD3/anti-CD28* (Gibco, Van Allen Way, Carlsbad, California) durante 7 h a 37°C. La mezcla celular se cultivó en medio X-VIVO™ 10 (Lonza, Maryland, EE.UU) libre de suero, suplementado con suero humano AB al 10%. El análisis de la capacidad supresora de las células Treg se cuantificó midiendo el porcentaje de expresión de los marcadores de activación CD69 y CD154 en las CMSP, siguiendo las instrucciones del protocolo *Regulatory T-Cell Fuction Kit* (Beckton-Dickinson, NJ, EE.UU.).

### **3.1.11. Cuantificación de p24gag y de la producción de citoquinas en sobrenadante de los cultivos**

Aunque se determinó intracelularmente la presencia de la proteína p24gag usando anti-p24 KC57-FITC (Beckman Coulter) en las células Treg infectadas por el VIH, también se confirmó dicha infección cuantificando la concentración de Ag p24gag en el sobrenadante de los cultivos celulares utilizando *HIV p24gag ELISA kit* (Innogenetics, Ghent, Bélgica).

Se realizó un ensayo de cuantificación de las citoquinas de tipo Th1, Th2, Th9, Th22, y TGF-B1 en el sobrenadante de los cultivos celulares de las células Treg después de 7 días pos-infección por el VIH utilizando *Human*

*Th1/Th2/Th9/Th22 13 plex Kit and Human TGF-B1 FlowCytomix Kit* (eBioscience).

## 3.2. Análisis de las células Treg en pacientes infectados por el VIH

### 3.2.1. Características de las muestras estudiadas de individuos sanos e individuos infectados por el VIH

El estudio se realizó en muestras de sangre periférica de voluntarios adultos sanos no infectados por el VIH-1 y de individuos adultos infectados por el VIH-1. Las muestras de individuos VIH+ se obtuvieron a través de la colaboración establecida entre el grupo del Laboratorio de Inmunovirología, Unidad clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y el grupo del laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón e Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón de Madrid.

Dentro de los individuos VIH+ se establecieron dos grupos distintos. Los **criterios de inclusión** que se tuvieron en cuenta para cada grupo fueron: Pacientes con carga viral indetectable (grupo CVi), constituido por adultos infectados por VIH-1 bajo tratamiento antirretroviral de alta actividad (TARGA) durante al menos un año previo al estudio, con valores de CD4 superiores a 300 células/ $\mu$ L, con carga viral indetectable (por debajo de 50 copias/mL) durante al menos los 6 meses previos a la obtención de la muestra, y asintomáticos en cuanto a las enfermedades asociadas a SIDA. Pacientes con carga viral detectable (grupo CV), formado por adultos infectados por el VIH-1, sin tratamiento antirretroviral, con valores de carga viral por encima de 1000 copias/mL durante al menos los 6 meses previos al estudio, y valores de CD4 por debajo de 300 células/ $\mu$ L. El grupo control estaba formado por adultos voluntarios sanos no infectados por el VIH.

### 3.2.2. Análisis de las poblaciones celulares inmunitarias

Las muestras de sangre se procesaron dentro de las 24 h. siguientes a su extracción. Se usó sangre total para estudiar las distintas poblaciones inmunes, y a continuación se aislaron las CMSP por gradiente de densidad siguiendo el protocolo mencionado en el apartado 3.1.1 para el estudio y purificación de células Treg (Figura 9).

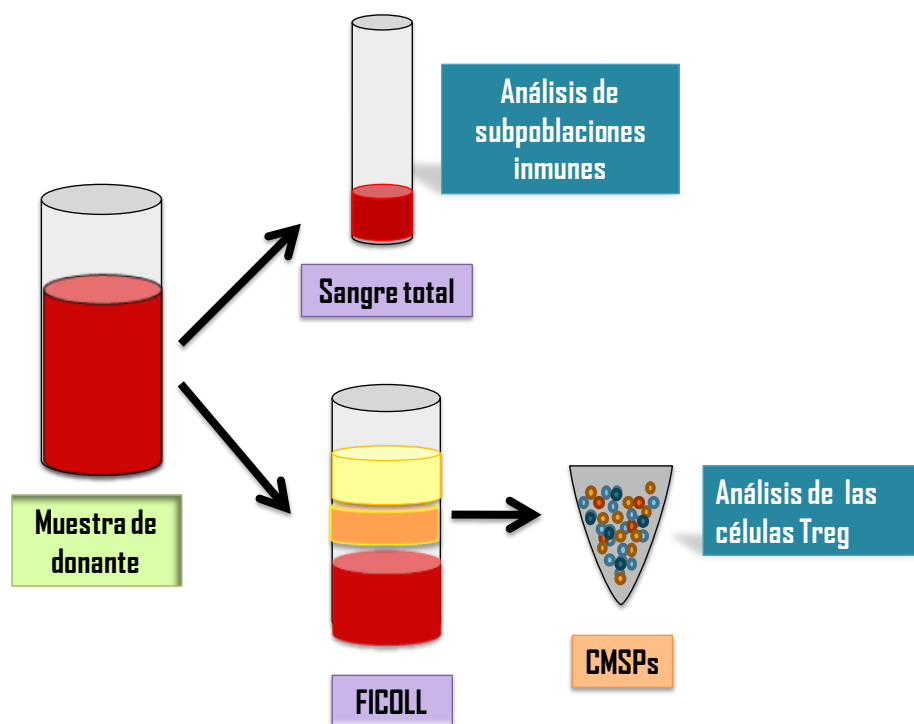


Figura 9. Esquema del procesamiento de muestras por citometría de flujo. Se representa el procesamiento de las muestras para la identificación de poblaciones celulares inmunes en sangre periférica y la identificación de células Treg en CMSP.

#### 3.2.2.1. Análisis del porcentaje y número absoluto de subpoblaciones inmunes

A partir de las muestras de sangre total se determinaron tanto la frecuencia como el número absoluto de las poblaciones y subpoblaciones

inmunes descritas en la **Tabla 3**. Para ello, se utilizaron 50µL de sangre total con cada uno de los paneles de anticuerpos descritos en la **Tabla 3**. Los anticuerpos se añadieron directamente a la sangre y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se llevó al equipo de lisis *TQ-Prep* Beckman Coulter para la lisis de eritrocitos y la obtención de la suspensión celular. Los valores absolutos de cada subpoblación se determinaron usando el kit *Flow count* (Beckman Coulter) y la adquisición de las muestras se realizó en el citómetro de flujo *Cytomics FC500* (Beckman Coulter).

**Tabla 3. Identificación de las poblaciones celulares del sistema inmunitario por citometría de flujo**

Población	Marcadores
Monocitos	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup>
Basófilos	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>low</sup> CD3 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup>
Granulocitos	SS <sup>high</sup> CD45 <sup>+</sup>
▪ Neutrófilos	SS <sup>high</sup> CD45 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>
▪ Eosinófilos	SS <sup>high</sup> CD45 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>
Linfocitos totales	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>
▪ Células NK	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>
▪ Células NKT	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>
▪ Linfocitos B	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>
▪ <u>Linfocitos T</u>	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>
– TCD4+	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
• Naive	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup>
• Memoria	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>
• Activadas	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
• Pre Efectoras	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup>
• Efectoras	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup>
• RTEs	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup>
– TCD8+	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
• Naive	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup>
• Memoria	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>
• Activadas	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
• Pre- Efectoras	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup>
• Efectoras	SS <sup>low</sup> CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup>

### 3.2.2.2. Análisis de las células Treg totales y de subpoblaciones *naïve*, activada y memoria

Para la identificación de las células Treg y de sus subpoblaciones de células Treg *naïve*, activadas y memoria, las CMSP se marcaron con anti-CD4 PC5.5 (eBioscience), anti-CD25 PC7 (eBioscience), anti-HLA-DR PB (eBioscience), anti-CD45RO ECD (Beckman coulter) y anti-CD45RA FITC (Beckman Coulter) y se incubaron durante 30 min a 4°C. Después, mediante el protocolo de permeabilización de la membrana se realizó el marcaje intracelular de Foxp3 para definir a las células Treg, tal y como se describe en el apartado 3.1.7.

### 3.2.3. Purificación de las células Treg y análisis de la capacidad supresora

A partir de las CMSP aisladas se purificaron las células Treg por separación inmuno-magnética usando *Regulatory T cell Isolation Kit II human* (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, USA). El proceso se realizó en dos pasos: primero se hizo una depleción negativa de células CD4+CD127– para separarlas del resto de células. Después, estas células se marcaron con partículas magnéticas recubiertas de anticuerpo anti-CD25 para obtener células CD4+CD25+CD127– o Treg. Posteriormente, las células Treg se cultivaron en placas de 96 pocillos con fondo en “V” ( $10^5$  células por cada pocillo) con medio X-VIVO™ 15 (Lonza, Maryland, EE.UU.), suplementado con suero humano AB al 10%, en cultivo mixto con CMSP autólogas a un ratio 1:1 y se activaron durante 7 h usando *Dynabeads T- Activator anti-CD3/anti-CD28* (Gibco, Van Allen Way, Carlsbad, California). El análisis de la capacidad supresora se realizó por citometría de flujo utilizando el protocolo *Regulatory T-Cell Function Kit* (Beckton-Dickinson, NJ, EE.UU.), como se ha descrito previamente en el apartado 3.1.10.



### 3.3. Efecto protector de los dendrímeros frente a la infección por el VIH en las células Treg

#### 3.3.1. *Procesamiento de muestras y purificación de células Treg*

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de *buffy coats* de donantes anónimos sanos procedentes del centro de transfusiones de la Comunidad de Madrid, y se procesaron en el BioBanco VIH HGM siguiendo las recomendaciones de la normativa vigente (Real Decreto 1088/2005). A partir de estas muestras de sangre se purificaron las células Treg tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

#### 3.3.2. *Dendrímeros carbosilano*

Los dendrímeros carbosilano se obtuvieron debido a la colaboración establecida entre el grupo de Biodendrímeros de Aplicaciones Biomédicas del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá (Alcalá de Henares, Madrid, España) y el grupo del Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón e Instituto de Investigación Biomédica Gregorio Marañón de Madrid.

En esta Memoria se utilizaron los dendrímeros carbosilano catiónicos 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 y los dendrímeros carbosilano aniónicos 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16 (Tabla 4). La caracterización de éstos dendrímeros se realizó por técnicas de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$ , espectroscopia de masas y análisis elemental de C, H y N en el mismo grupo.

Tabla 4. Generación, fórmula y peso molecular de los dendrímeros catiónicos 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24, y dendrímeros aniónicos 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16.

Dendrímero	Generación	Formula	Peso molecular (g/mol)
2G-NN16	segunda	$N+(CH_3)_2CH_2CH_2N+(CH_3)_3$	4644,6
1G-03NN12	primera	$C_{10}H_{246}I_{12}N_{12}O_9Si_9$	3596,77
2G-03NN24	segunda	$C_{213}H_{510}I_{24}N_{24}O_{15}Si_{21}$	7283,98
2G-S24P	segunda	$C_{189}H_{402}N_{12}Na_{24}O_{75}S_{24}Si_{21}$	5954,36
2G-S16	segunda	$C_{72}H_{156}F_{24}N_{80}O_{248}Si_{58}^+$	2342,91
G3-S16	Tercera	$C_{256}H_{508}N_{48}Na_{16}O_{64}S_{16}Si_{29}$	6978,41

El dendrímero 2G-NN16 es un dendrímero catiónico inestable de segunda generación con 16 cargas positivas en la superficie que deriva de un núcleo de silicio (**Figura 10A**) [98]. Los dendrímeros 1G-03NN12 y 2G-03NN24 son dos generaciones de una nueva familia de dendrímeros catiónicos inestables derivada de un núcleo polifenólico [90] de primera y segunda generación con 12 y 24 cargas positivas, respectivamente (**Figura 10B**).

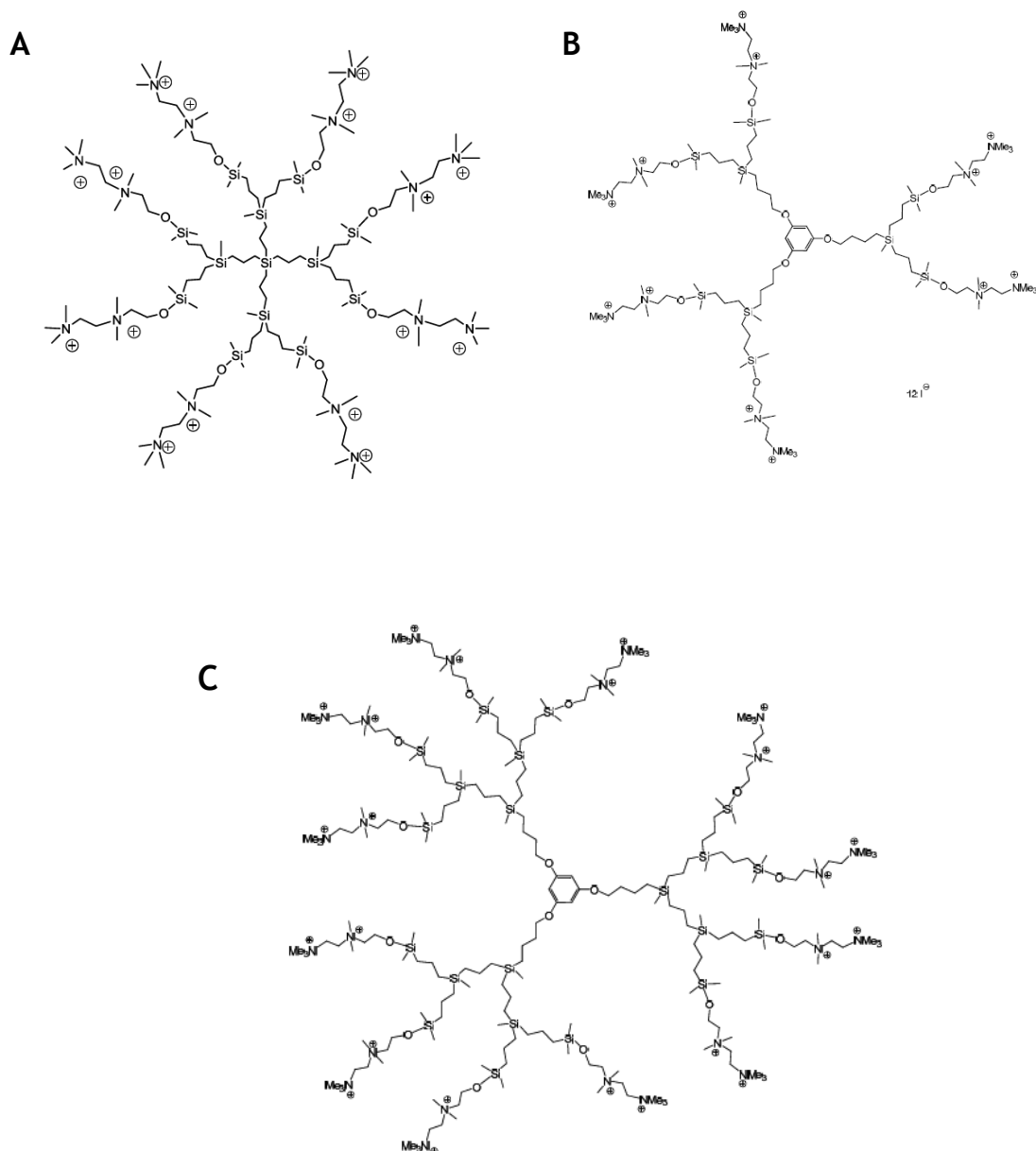


Figura 10. Estructura de los dendrímeros catiónicos utilizados en esta Memoria. Se muestra el dendrímero 2G-NN16 (A), 1G-03NN12 (B) y 2G-03NN24 (C).

El dendrímero 2G-S24P es un dendrímero aniónico de segunda generación, con núcleo polifenólico y 24 grupos sulfanatos en la superficie (Figura 11A). El dendrímero 2G-S16 es un dendrímero aniónico de segunda generación con 16 grupos sulfonatos en la superficie (Figura 11B) [64]. El dendrímero G3-S16 es un dendrímero aniónico de tercera generación con 16 grupos sulfato terminales (Figura 11C) [92].

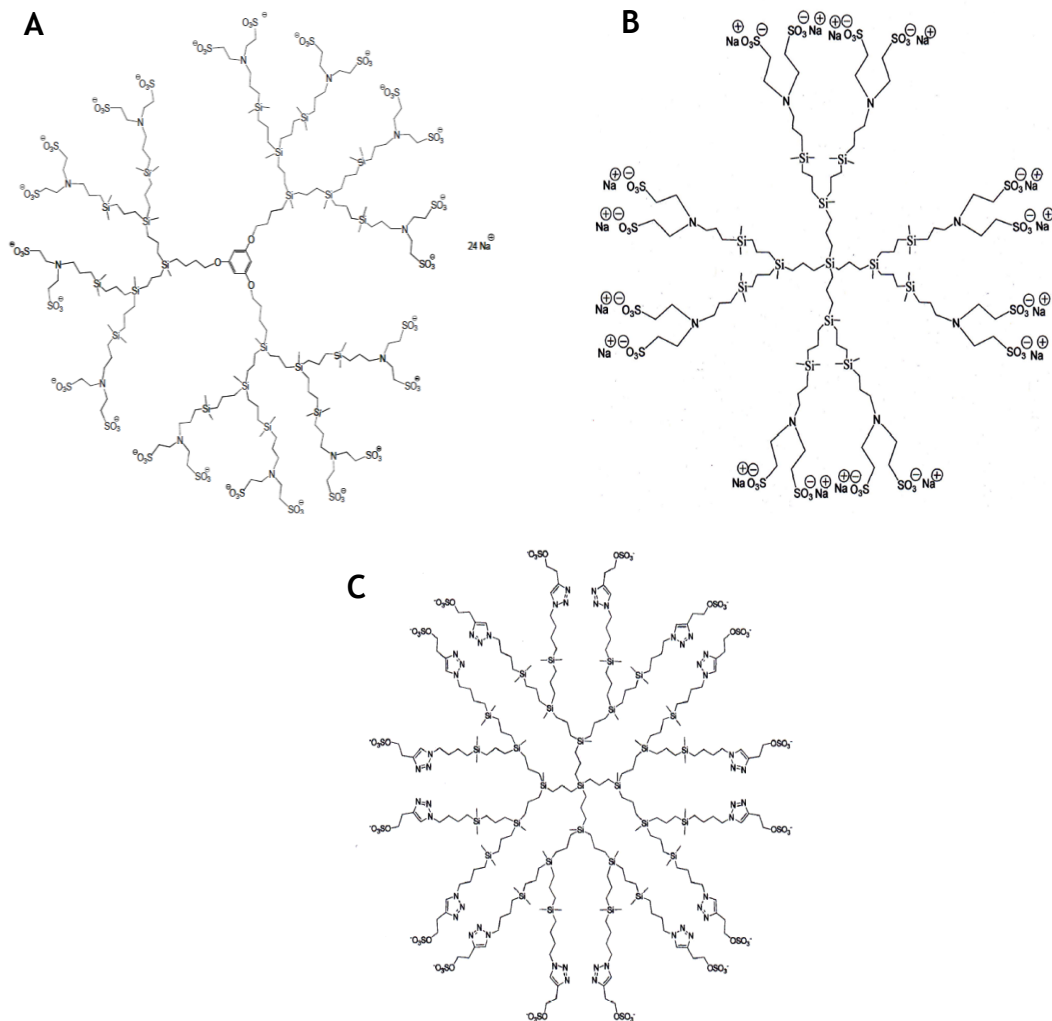


Figura 11. Estructura de los dendrímeros aniónicos utilizados en esta Memoria. Se muestra el dendrímero 2G-S24P (A), 2G-S16 (B) y G3-S16 (C).

Las concentraciones de uso de los diferentes dendrímeros se determinaron previamente en el laboratorio mediante ensayos de citotoxicidad analizando la actividad de la enzima succinato mitocondrial (método MTT) en distintas líneas celulares [64, 79, 81, 92, 99]. El ensayo de MTT fue realizado usando *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*, MTT (Sigma-Aldrich), este ensayo permite determinar la viabilidad de las células analizando 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 distintos tipos celulares en placa de 96 pocillos con los diferentes dendrímeros a distintas concentraciones durante 24 h. Se añadió MTT a los cultivos y tras 4 h se centrifugaron las placas a 13000 r.p.m durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 200µl de DMSO a los pocillos para disolver los cristales de formazán. Como control de muerte celular se trataron los cultivos primarios y líneas establecidas con DMSO al 20% durante el mismo tiempo que los estímulos. Se midió la absorbancia de las placas con el lector Synergy 4 (Biotek). Gracias a estos resultados obtenidos en el grupo se determinó que los dendrímeros carbosilano catiónicos 2G-NN16, 1G-03NN12 o 2G-03NN24 fueron no tóxicos a la concentración de 5µM/mL [79, 81] y los aniónicos 2G-S24P, 2G-S16 o G3-S16 a la concentración de 10µM/mL [64, 92, 99]

### 3.3.3. Análisis del efecto de los dendrímeros en las células

#### Treg

Las células Treg se obtuvieron a partir de CMSP por inmuno-separación magnética usando *Regulatory T cell Isolation Kit II human* (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, USA), descrito previamente en el apartado 3.1.1. Posteriormente, se expandieron usando usando *Dynabeads Human Treg Expander* (invitrogen, Oslo, Noruega), como se describe en el apartado 3.1.2. Pasado este tiempo, se cultivaron  $5 \times 10^6$  de células Treg durante 48 h. a 37°C en medio de cultivo RPMI 1640 (Life technology, España) suplementado con 10% de SFB con cada uno de los dendrímeros catiónicos 2G-NN16, 1G-03NN12 o 2G-03NN24 a una concentración de 5µM/mL [79, 81] y de los dendrímeros aniónicos 2G-S24P, 2G-S16 o G3-S16 a una concentración de 10µM/mL [64, 99]. En paralelo, se cultivaron  $5 \times 10^6$  de células Treg sin tratar del mismo donante como control del experimento.

La viabilidad de las células Treg tratadas con los diferentes dendrímeros carbosilano catiónicos o aniónicos se analizó por citometría de flujo marcando las células con *Fixable Viability Dye Cell Staining* (1µL/mL de

células) durante 15 min a 4°C. Este marcador de viabilidad es compatible con la permeabilización y fijación de las células necesarias para el marcaje del anticuerpo intracelular Foxp3. Una vez marcadas las células Treg con el anticuerpo de viabilidad, se marcaron las moléculas de superficie para el análisis del fenotipo de las células Treg. Las células se marcaron con los anticuerpos anti-CD4 APC (Miltenyi Biotec), anti-CD25 PC7 (eBioscience), anti-HLA-DR PE, anti-CD45RO ECD, anti-CD38 FITC (Beckman Coulter) y anti-Foxp3 PE (eBioscience). El Foxp3 se marcó después de la permeabilización previa y fijación de las células, siguiendo el protocolo de *Anti-Human Foxp3 Staining Set* (eBioscience). Finalmente, las células se analizaron en el citómetro de flujo GALLIOS Beckman Coulter.

Finalmente se analizó el efecto de los dendrímeros sobre la capacidad supresora de las células Treg. Para ello, tras el tratamiento de 48 h. con los diferentes dendrímeros se lavaron las células con PBS y se distribuyeron 10<sup>5</sup> cél/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en “V” con medio X-VIVO™ 15 (Lonza, Maryland, EE.UU.), suplementado con suero humano AB al 10% y filtrado antes de su uso. Las células Treg no tratadas y tratadas con los distintos dendrímeros se incubaron con CMSP alogénicas en un ratio 1:1 (CMSP:Treg) y la capacidad supresora de las células Treg se realizó siguiendo el protocolo *Regulatory T-Cell Function Kit* (Becton-Dickinson, NJ, EE.UU.) explicado anteriormente (apartado 3.1.10).

#### 3.3.4. Efecto protector de los dendrímeros en la infección de células Treg por el VIH-1

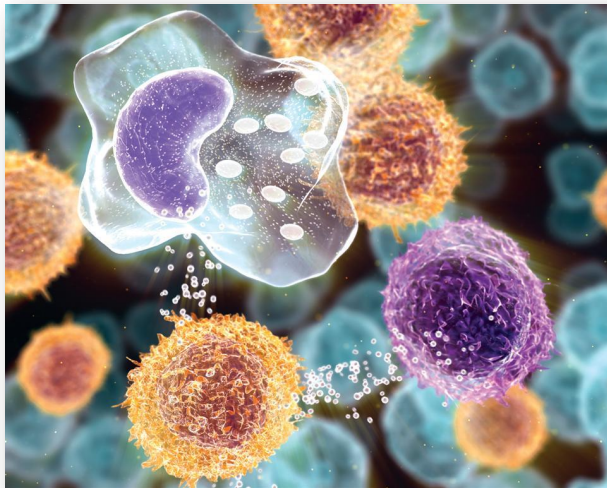
Para el analizar el efecto protector *per se* de los dendrímeros frente al VIH en células Treg, primero se expandieron células Treg aisladas de *buffy coats*, del mismo modo que en el apartado 3.1.1. Después, las células Treg obtenidas de la expansión se cultivaron con los dendrímeros carbosilano cationicos 2G-S24P y 2G-S16 a 10µM a 37°C durante 24 h. Tras este tiempo, las células Treg se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200µL de PBS. Las células Treg se infectaron con 0,1 MOI del aislado VIH-X4 durante 3 h en

presencia o ausencia de los dendrímeros catiónicos 2GS24P y 2GS16. Posteriormente, las células Treg se lavaron 2 veces con PBS a 4°C y se cultivaron  $1 \times 10^6$  células Treg en placas de 24 pocillos con medio RPMI 1640 (Life technology, España) suplementado con 10% de FBS y 500U/ml de IL-2. En paralelo se cultivaron como controles células Treg no infectadas por el VIH-X4 y en ausencia de los dendrímeros y como control de la inhibición de la replicación del VIH se utilizaron células Treg infectadas por el VIH-X4 y tratadas con AZT ( $C_{10}H_{13}N_{5}O_4$ ; Pm: 267,242g/mol, Retrovir, GSK). Los cultivos de las células Treg en las distintas condiciones se incubaron a 37°C durante 5 días. Para confirmar la infección de las células Treg se utilizó el anticuerpo KC57 FITC frente a la proteína p24gag del VIH por citometría de flujo y también se midió la presencia de p24 en el sobrenadante como se ha descrito en apartados anteriores.

### 3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa de SPSS v18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU). Dado que la mayoría de variables no seguían una distribución normal, y que el número de experimentos en los distintos estudios era inferior a 20, se utilizaron test no-paramétricos. Para las comparaciones entre grupos se utilizó el análisis de la *U de Mann-Whitney* y en el caso de analizar datos pareados se empleó el test de *Wilcoxon*. La correlación entre las variables se estableció mediante el test de correlación de *Pearson*. Se ha considerado significativo un *p-valor*  $< 0,05$ . Los resultados se han expresado mediante la media, y se ha representado la desviación estándar (SD) o el error estándar de la media (EEM) dependiendo de los experimentos (en cada caso se indica en el pie de figura).

## 4. RESULTADOS



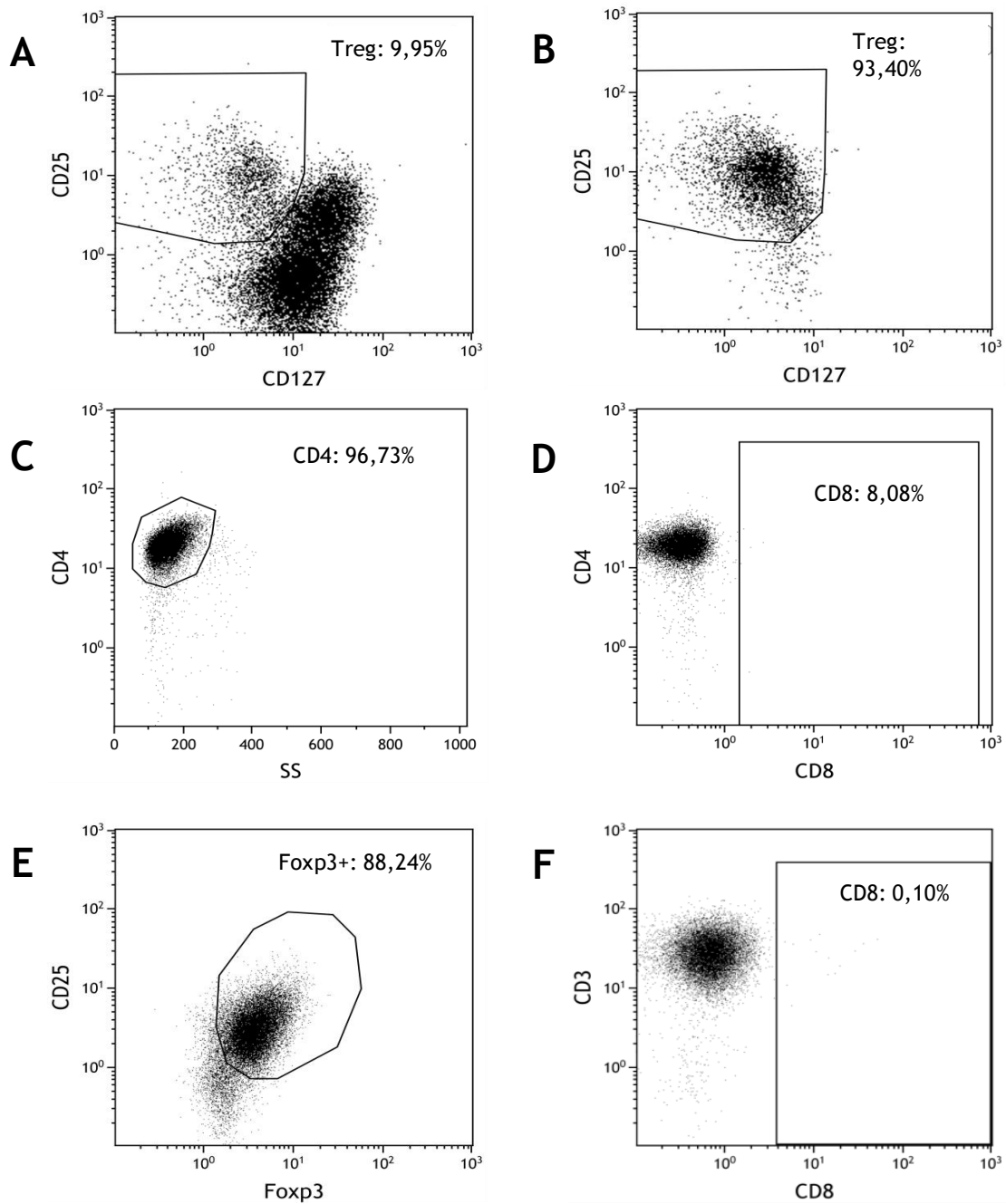


## 4.1. Estudio *in vitro* del efecto de la Infección por el VIH-1 en las células Treg

Las células Treg son un subtipo de linfocitos T CD4, célula diana de la infección por el VIH, de tal forma que las células Treg podrían ser susceptibles de ser infectadas por el VIH y dicha infección podría afectar a su fenotipo y funcionalidad causando la desregulación del SI. Las células Treg juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis del SI [32] y en la modulación de la respuesta inmune hacia antígenos propios, células tumorales y patógenos [100-102]. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue en primer lugar analizar si las células Treg obtenidas de individuos sanos eran susceptibles de ser infectadas *in vitro* por el VIH.

### 4.1.1. Purificación de células Treg

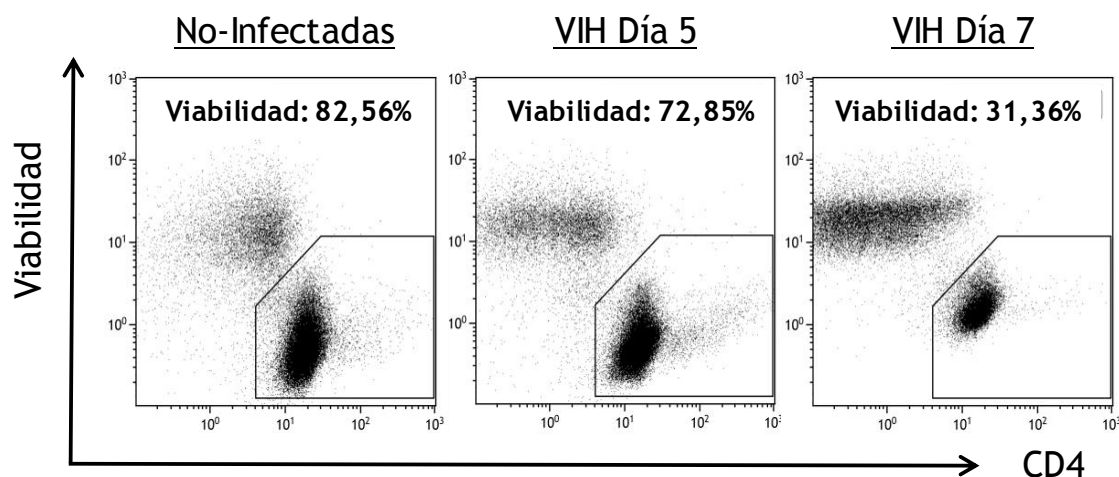
Las células Treg utilizadas en este estudio fueron purificadas por sorter como células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (Figuras 12A, 12B), tal y como se menciona en el apartado 3.1.1 de metodología. Durante la realización de los experimentos se controló en todo momento la calidad de las células aisladas. Se confirmó una pureza mayor del 95% de células T CD4 en las muestras procesadas (Figura 12C), y que no hubiera contaminación de células T CD8 (Figura 12D). Además, se analizó la expresión de Foxp3 de las células Treg purificadas. El porcentaje de células Foxp3<sup>+</sup> que se obtuvieron fue superior al 85% en todos los casos (Figura 12E). Al finalizar el cultivo de células Treg se verificó nuevamente que no hubiera contaminación por linfocitos T CD8 (Figura 12F) con el objetivo de garantizar la calidad y fiabilidad de los resultados, y que la disminución de células con fenotipo Treg no se debiera a una expansión de células T CD8 que contaminase el cultivo.



**Figura 12.** Estrategia de purificación de las células Treg por el VIH-X4 o VIH-R5. Se muestran los *dot plots* de un donante sano representativo de 15 donantes reflejando la frecuencia de células Treg definidas como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> antes (A) y después de realizar el *sorter* (B). Las células Treg aisladas mostraron más de un 95% de pureza de linfocitos T CD4 (C) y ausencia de contaminación por linfocitos T CD8 (D). En todos los experimentos, la pureza de las células Treg fue mayor del 90% de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (F). Además, en la tinción intracelular se confirmó un porcentaje de células Foxp3<sup>+</sup> superior al 85% (E). La ausencia de contaminación con linfocitos T CD8 se confirmó en todos los cultivos a día 5 y 7 pos-infección. El *dot plot* (E) representa el análisis de células Treg purificadas tras 8 días en cultivo.

#### 4.1.2. Viabilidad de las células Treg

La viabilidad celular es un factor importante para la fiabilidad de los resultados que se obtengan. De esta manera, se determinó el efecto citopático causado por la infección por el VIH en las células Treg. Las células Treg viables se identificaron a los días 5 y 7 pos-infección utilizando el marcador *fixable viability dye*. Los resultados mostraron que las células Treg a día 5 pos-infección tenían una viabilidad similar a las células Treg no infectadas por el VIH-1. Sin embargo, se observó una disminución significativa de la viabilidad de las células Treg a día 7 pos-infección (**Figura 13**).



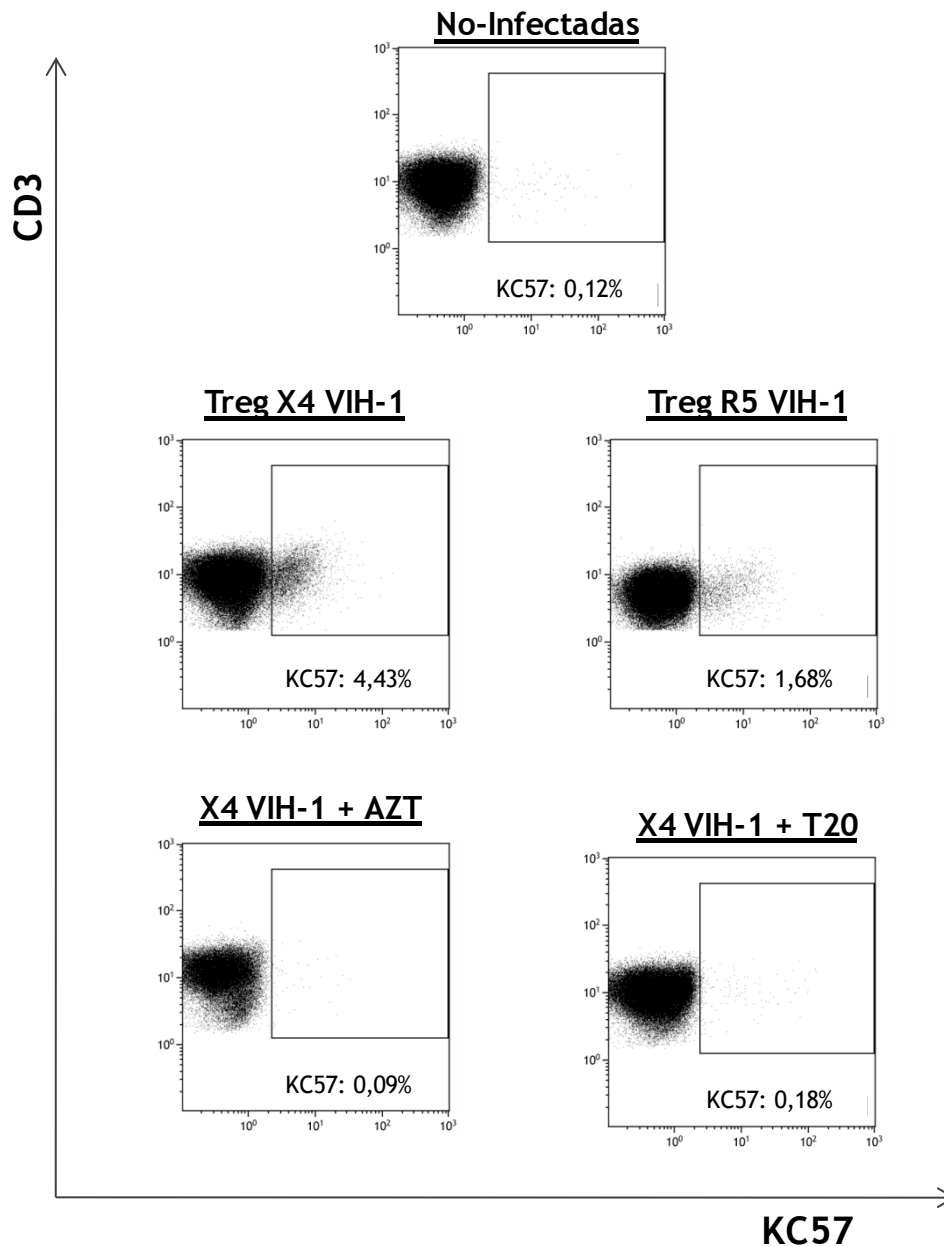
**Figura 13.** Viabilidad de las células Treg infectadas por el VIH. Los *dot plots* corresponden a 1 donante representativo de 15 donantes. De izquierda a derecha se muestra la viabilidad de las células Treg no infectadas y Treg infectadas por el VIH-1 a día 5 pos-infección y día 7 pos-infección.

#### 4.1.3. Las células Treg son susceptibles de ser infectadas por el VIH

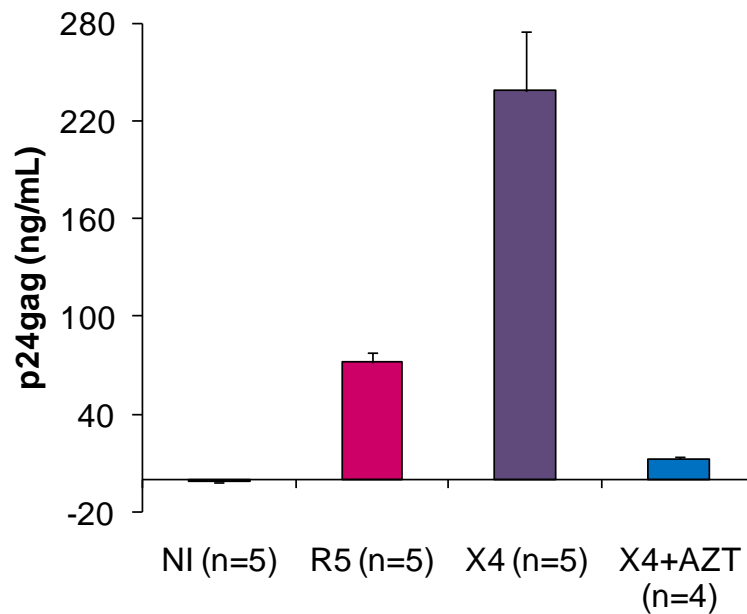
Las células Treg expresan en su superficie el receptor CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4 utilizados por el VIH como dianas de entrada a la célula. De este modo, las células Treg son susceptibles de ser infectadas por el VIH. Sin embargo, se desconoce el efecto que podría tener esta infección

en las células Treg. Con este objetivo, primero se estudió si las células Treg eran susceptibles de infectarse por el VIH-1. Las células Treg purificadas se infectaron con los aislados R5 VIH-1<sub>AD8</sub> (VIH-R5) y X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> (VIH-X4) a una MOI= 0,1 durante 3 h, y se pusieron en cultivo. En las células Treg infectadas por los aislados VIH-R5 o VIH-X4 se analizó la presencia de p24gag (KC57) intracelular por citometría de flujo (**Figura 14**). Además, se cuantificó por ELISA la producción de p24gag en el sobrenadante de los cultivos celulares a día 5 pos-infección (**Figura 15**).

Los resultados demostraron que los dos tipos del VIH-1 utilizados (X4 y R5) podían infectar eficazmente a las células Treg purificadas, y que podían replicar en estas células liberando nuevas partículas virales al sobrenadante. Sin embargo, la frecuencia de células KC57+ (**Figura 14**) y los valores de p24gag cuantificado por ELISA en las células Treg infectadas por el VIH-X4 fueron significativamente más altos que los observados en las células infectadas por el aislado VIH-R5 (**Figura 15**). Como control de inhibición de la replicación del VIH-1 en las células Treg se utilizaron los fármacos antirretrovirales AZT y T20, que impiden la infección/replicación del VIH como se refleja en la baja frecuencia de KC57 en las células Treg tratadas (**Figura 14, 15**).

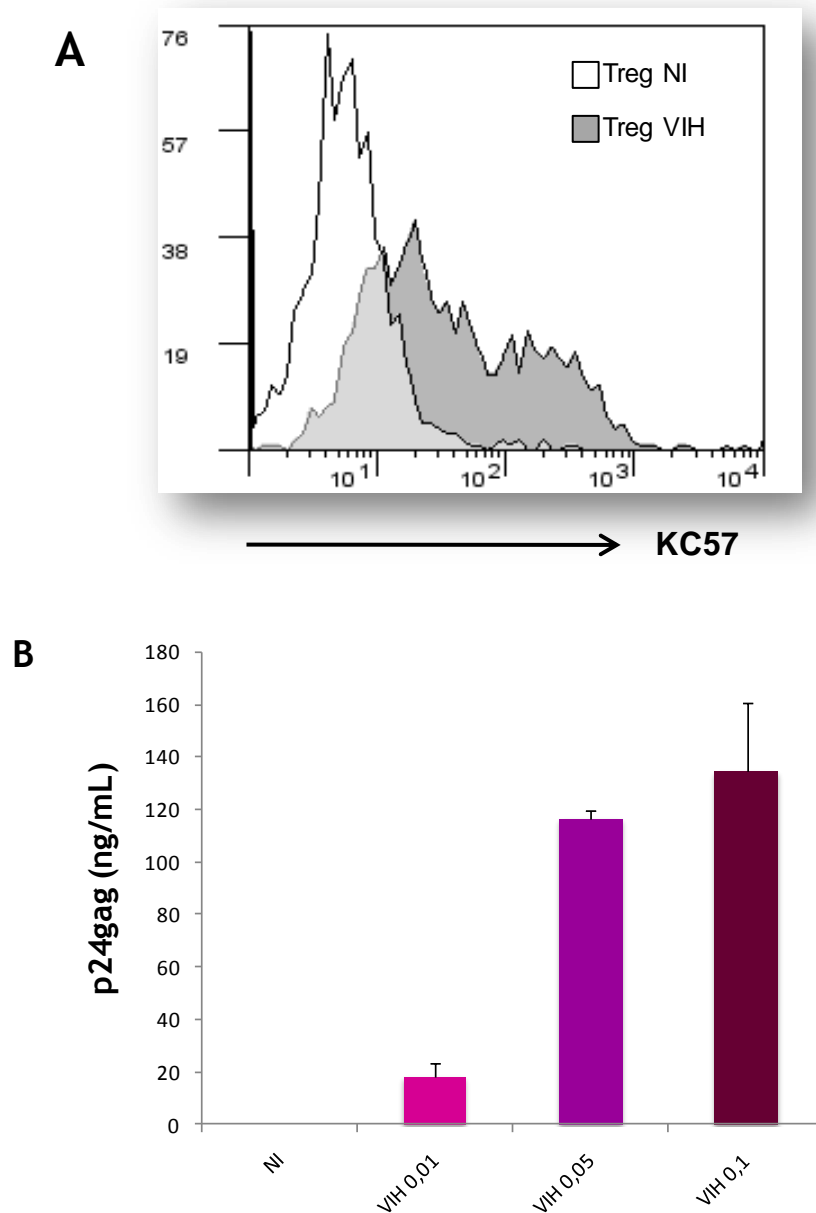


**Figura 14.** Infección de las células Treg por el VIH-X4 o VIH-R5. Los *dot plots* muestran que las células Treg infectadas por el VIH-R5 presentaron menor frecuencia de KC57 (p24gag) intracelular que las células Treg infectadas por el VIH-X4. Como control, las células Treg se infectaron por el VIH-X4 (MOI= 0,1) en presencia de AZT (5 $\mu$ M) o de T20 (20 $\mu$ M). Los datos son representativos de las células Treg obtenidas de 4 donantes diferentes.



**Figura 15.** Cuantificación de p24gag en el sobrenadante de los cultivos a día 5 pos-infección. Se muestran los valores de la media $\pm$ EEM de la cuantificación de Ag p24gag (ng/mL) por ELISA después de 5 días pos-infección en los sobrenadantes de los cultivos de las células Treg no infectadas e infectadas por el VIH-R5 (MOI 0,1), VIH-X4 (MOI 0,1) y VIH-X4 + AZT (5 $\mu$ M).

Se estudió si el grado de infección por el VIH-X4 de las células Treg era dosis dependiente utilizando distintas concentraciones del virus. Las células Treg purificadas se infectaron durante 3 h con el VIH-X4 utilizando 3 concentraciones de virus (MOI VIH-X4 = 0,01; 0,05 y 0,1). La infección por el VIH-X4 se confirmó detectando p24gag intracelular y en sobrenadante del cultivo de las células Treg (**Figura 16A, 16B**). Se observó que incluso concentraciones muy bajas del VIH-X4 (MOI= 0,01) eran capaces de infectar las células Treg a día 3 pos-infección. Sin embargo, los valores de replicación altos se obtuvieron con concentraciones de MOI= 0,05 y 0,1 (**Figura 16B**).



**Figura 16. Producción de la proteína viral p24gag en células Treg infectadas por el VIH-X4. (A)** El histograma muestra la presencia de p24gag (KC57) intracelular en células Treg infectadas por el VIH-X4 en comparación con las células Treg no infectas. **(B)** La gráfica muestra los valores de la media±EEM de la expresión de p24gag (ng/ml) cuantificado por ELISA a día 3 pos-infección en el sobrenadante de los cultivos de las células Treg infectadas a distintas concentraciones de VIH-X4 (MOI= 0,01, 0,05 y 0,1) en 5 donantes distintos.

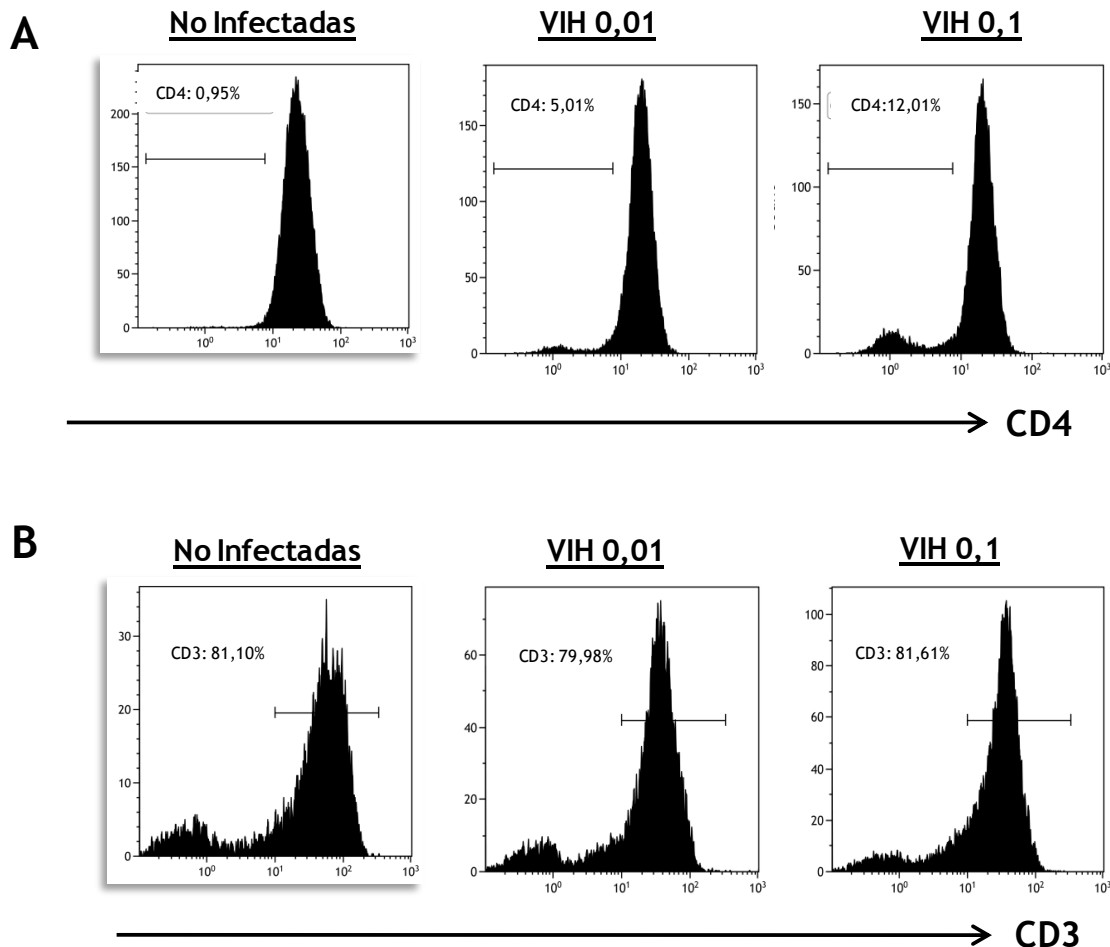
#### 4.1.4. Efecto de la infección por el VIH-X4<sub>NL4.3</sub> en el fenotipo de las células Treg

Una vez confirmado que las células Treg eran susceptibles de ser infectadas por el VIH-1, se estudió que efecto producía esta infección sobre el fenotipo de las células infectadas.

##### 4.1.4.1. Efecto de la infección por el VIH en la expresión de CD3 y CD4 en las células Treg

Como se ha descrito previamente, una de las moléculas que permite la entrada e infección por el VIH a sus células diana es el CD4. Por este motivo, se estudió el efecto de la infección por el VIH sobre dicha molécula en células Treg. La expresión de CD4 en células Treg infectadas por el VIH-X4 disminuyó en los 15 donantes a día 3 pos-infección (**Figura 17A**). Sin embargo, se observó que los porcentajes de expresión de CD3 eran similares entre las células Treg no-infectadas (NI) e infectadas por el VIH-X4. (**Figura 17B**). Los resultados muestran que la infección por el VIH-X4 de las células Treg producía una disminución específica de la expresión de CD4. Por otro lado, debido a que la expresión de CD4 en la superficie celular podría estar afectada por la infección por el VIH-X4 y que la expresión de CD3 parecía no estar afectada, la estrategia que se siguió para identificar a las células Treg consistió en: **i)** hacer una ventana de selección en las células vivas; **ii)** seleccionar las células CD3<sup>+</sup> y **iii)** analizar en esta población CD3<sup>+</sup> el porcentaje de células CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>.



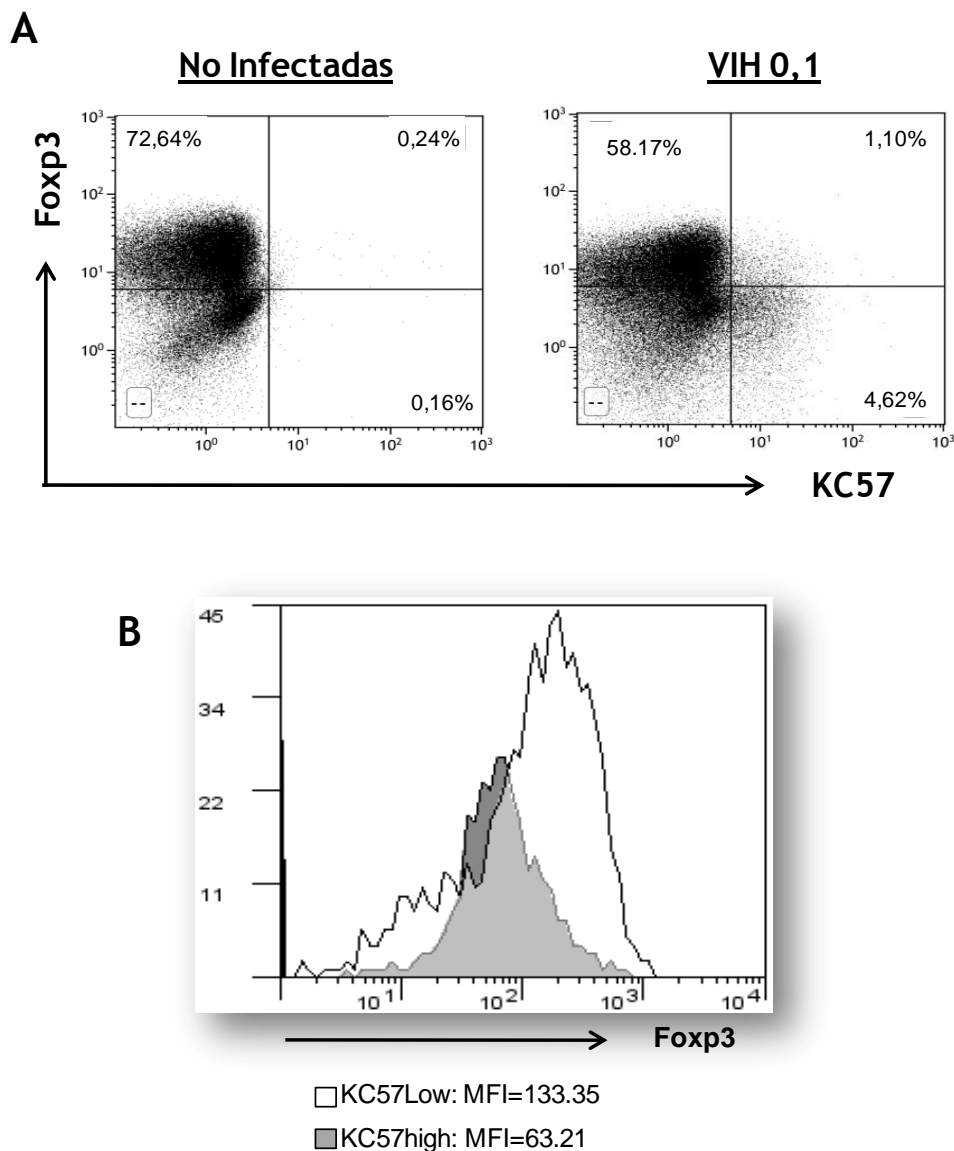


**Figura 17.** Fenotipo de las células Treg infectadas por el VIH-X4. **(A)** Los histogramas se realizaron seleccionando a las células Treg  $CD3^+Fxp3^+$ . Se observa una disminución de la frecuencia de la expresión de CD4 en las células Treg infectadas por el VIH-X4 a día 3 pos-infección. **(B)** Los histogramas muestran que la frecuencia de la expresión de CD3 no varía entre las células Treg no infectadas y las Treg infectadas por el VIH-X4 incluso a día 7 pos-infección.

#### 4.1.4.2. Efecto de la infección por el VIH sobre la expresión de Fxp3 en células Treg

Al analizar el fenotipo de las células Treg infectadas por el VIH-X4 se observó que la infección producía una disminución en la expresión del Fxp3, que es el marcador que define a estas células y que controla su funcionalidad. Se mostró que el porcentaje de células  $Fxp3^+$  en las células Treg infectadas por el VIH-X4 era inferior al de Treg no infectadas (**Figura 18A**). Además, las células Treg que mostraron una mayor expresión intracelular de p24gag

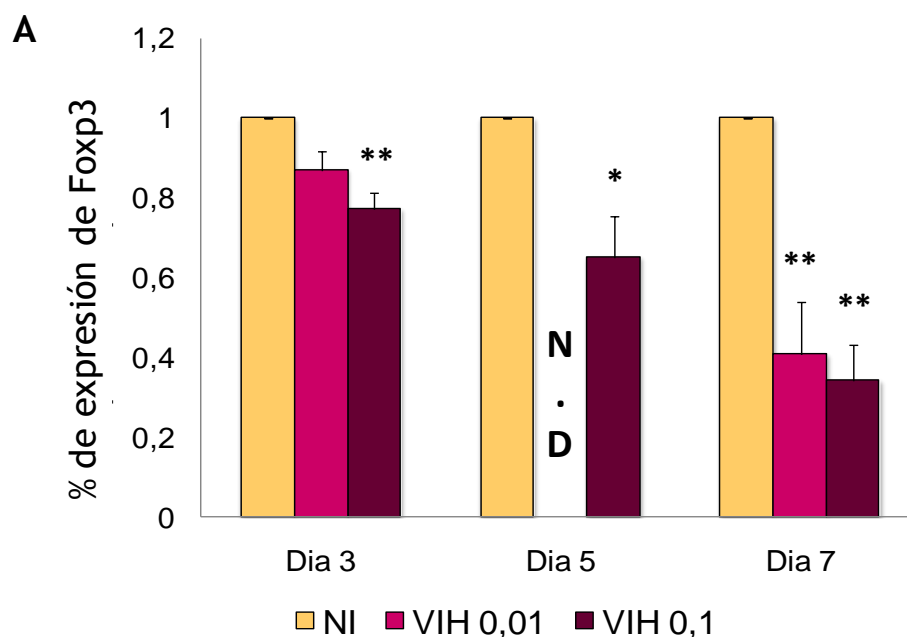
(KC57), que representaría una mayor replicación del VIH, eran precisamente las células que perdían parte de la expresión de Foxp3 (Figura 18A). También se observó que las células Treg que presentaban una mayor expresión de p24gag (KC57<sup>high</sup>) tenían menor cantidad por célula de Foxp3 (medida como Intensidad Media de Fluorescencia o MFI) que las células Treg que presentaban menos p24gag (Figura 18B).



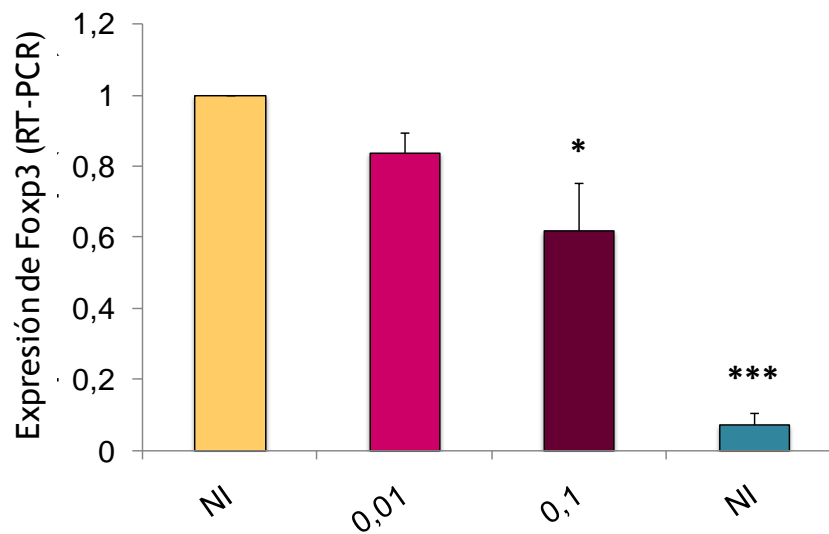
**Figura 18.** Expresión de Foxp3 en células Treg infectadas por el VIH-X4. (A) Los *dot plot* muestran células Treg no infectadas y Treg infectadas por el VIH-X4 de un donante representativo de un total de 15 analizados. El análisis muestra que las células Treg con alta expresión intracelular de p24gag tienen una menor expresión de

Foxp3. **(B)** Histograma de un donante representativo que muestra la diferencia de MFI de Foxp3 en células Treg infectadas por el VIH-X4 con alta expresión intracelular de p24gag (color gris) y con baja expresión de p24gag (color blanco).

La disminución de Foxp3 en las células infectadas por el VIH-X4 en comparación con las Treg no infectadas se observó ya a día 3 con la concentración más alta de virus (MOI=0,1; n= 10,  $p= 0,005$ ). Esta disminución fue significativa a día 7 pos-infección con las dos MOI utilizadas (n=10; MOI=0,01:  $p= 0,018$ ; MOI=0,1:  $p= 0,003$ ) (**Figura 19A**). La disminución de Foxp3 se confirmó midiendo los valores de ARNm de Foxp3 mediante RT-PCR en células infectadas a distintas concentraciones virales (n=7; MOI= 0,01 y 0,1). Los resultados mostraron una disminución significativa de la expresión de Foxp3 con la MOI= 0,1 ( $p= 0,018$ ) (**Figura 19B**). Como control del experimento se incluyó una muestra de células CD4 no-Treg que no expresaban Foxp3.



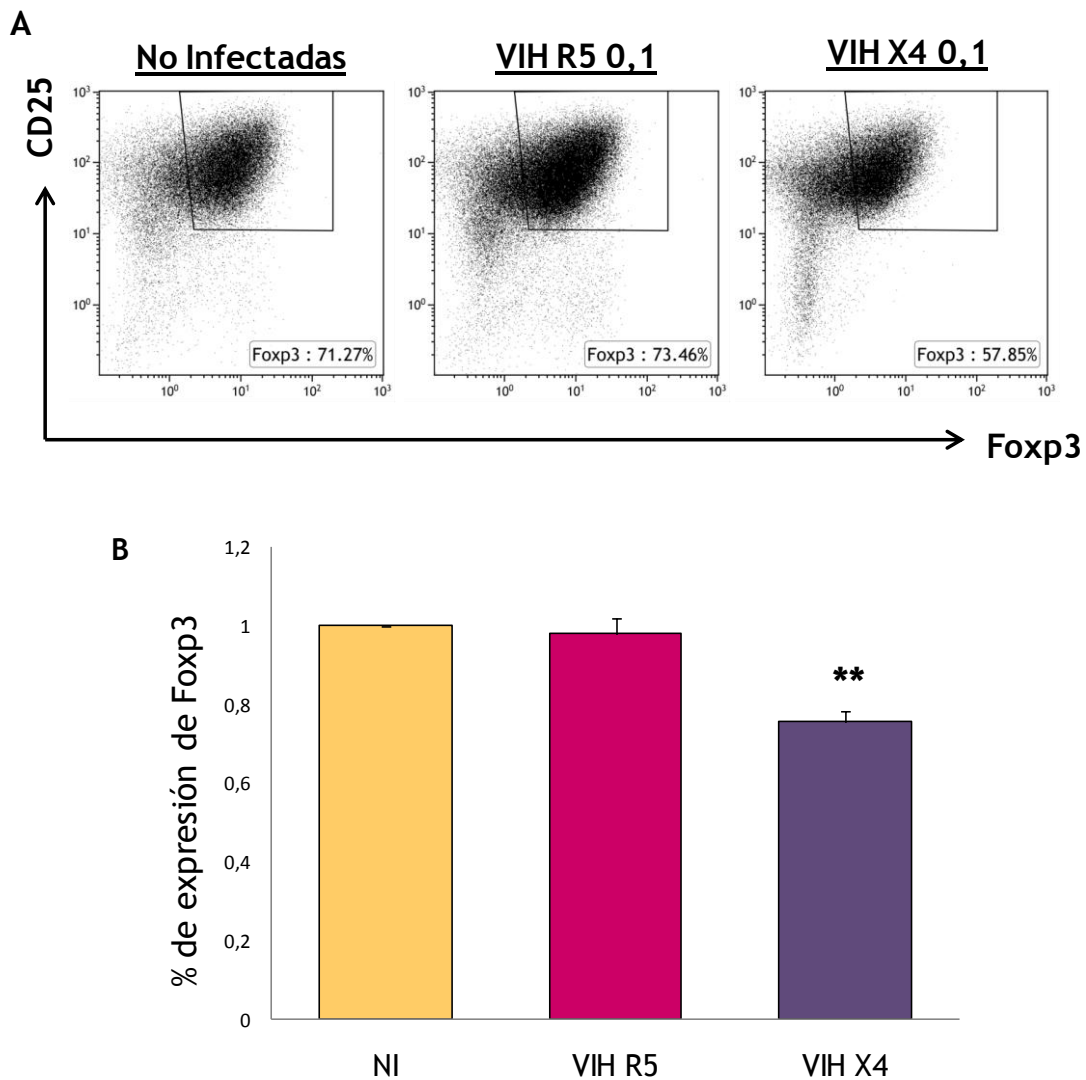
B



**Figura 19.** La disminución de Foxp3 en células Treg infectadas por el VIH-X4 fue dosis dependiente. (A) Se muestran los valores de la media $\pm$ EEM de la expresión de Foxp3 en células Treg infectadas por el VIH-X4 normalizadas con respecto a las Treg no infectadas a días 3, 5 y 7 pos-infección. (N.D): la MOI de 0,01 no se determinó a día 5. (B) Se representa la expresión del ARNm de Foxp3 (normalizado y comparado con las Treg NI) cuantificado mediante PCR a tiempo real en células T CD4 no infectadas, Treg no infectadas y Treg infectadas por el VIH-X4 (MOI= 0,01; MOI= 0,1) a día 7 pos-infección. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  y \*\*\*:  $p < 0,001$  con el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

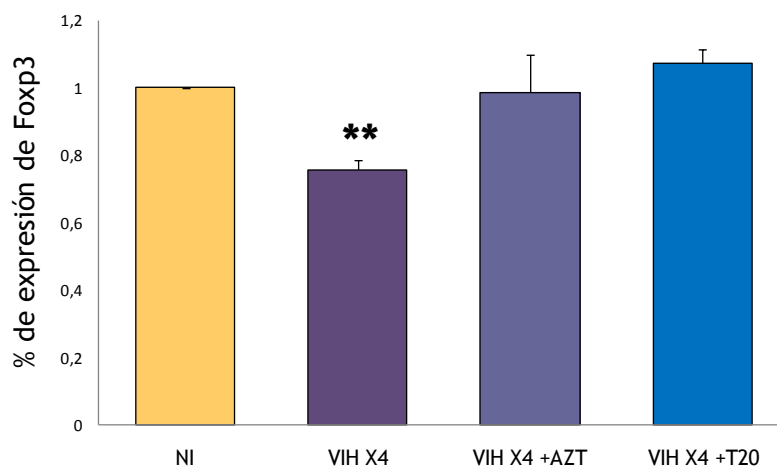
Se estudió si la infección por el VIH-R5 producía el mismo efecto en la expresión de Foxp3 que el observado con el VIH-X4 a una MOI= 0,1. Las células se analizaron a día 5 pos-infección y se observó que la infección por el VIH-R5 no afectó a la expresión de Foxp3 en las células Treg infectadas, siendo su expresión similar a la observada en Treg NI (**Figura 20A**). Asimismo, los valores de Foxp3 en Treg infectadas por el VIH-X4 ( $n = 6$ ) fueron significativamente más bajos ( $p < 0,01$ ) que los observados en Treg infectadas por el VIH-R5 ( $n = 5$ ) y Treg NI ( $n = 6$ ) (**Figura 20B**). Estos datos indicaban, que aunque las células Treg podían ser infectadas por ambos aislados del VIH-1, los aislados virales con fenotipo R5 parecían no afectar a la expresión de

Foxp3 a las concentraciones y tiempos de infección en las que los aislados con fenotipo X4 sí disminuían su expresión.



**Figura 20.** Diferencias en el porcentaje de expresión de Foxp3 tras la infección de células Treg por el VIH-1 con tropismo X4 o R5. **(A)** Los *dot-plots* muestran la expresión de Foxp3 de un donante representativo a día 5 pos-infección en células Treg infectadas por el VIH-R5 y VIH-X4 (MOI= 0,1). **(B)** La gráfica muestra los valores de media±EEM de la expresión de Foxp3, normalizados frente a células Treg no infectadas, en Treg infectadas por el VIH-R5 y VIH-X4 (MOI= 0,1). \*\*:  $p < 0,01$  en el *test* no paramétrico U de *Mann-Whitney*.

Se estudió el mecanismo mediante el cual el VIH-1 desregulaba la expresión de Foxp3 en células Treg utilizando únicamente el aislado viral VIH-X4, ya que sólo la infección por este aislado afectó a la expresión de Foxp3 en células Treg. En primer lugar se estudió si la replicación activa del VIH-1 era necesaria para reducir la expresión de Foxp3 en las células Treg o si era suficiente el contacto del virus con la superficie celular. Las células Treg se trataron previamente con 5mmol/L de AZT (n= 5) o 20mmol/L de T-20 (n= 3), antes de infectar con VIH-X4. Los tratamientos con los fármacos antirretrovirales inhibieron la infección por el VIH-X4 de las células Treg medido por la cuantificación de p24gag (**Figura 14**). Además, los valores de Foxp3 en las células tratadas con los fármacos antirretrovirales fueron similares a los valores de Foxp3 en las Treg no infectadas ( $p > 0,05$ ). (**Figura 21**).



**Figura 21.** El aislado VIH-X4 requiere una replicación activa para afectar al porcentaje de expresión de Foxp3 en las células Treg. La gráfica muestra los valores de la media±EEM de la frecuencia normalizada, comparada a células Treg no infectadas, de Foxp3 en células Treg infectadas por el VIH-X4 (MOI= 0,1), Treg infectadas por el VIH-X4 y tratadas con AZT (5mmol/L) o infectadas y tratadas con T-20 (20mmol/L) (n= 3). \*\*:  $p < 0,01$  en el *test* no paramétrico U de *Mann-Whitney*.

En resumen, los resultados claramente indican que las células Treg infectadas por el VIH-1 experimentan cambios en el fenotipo, destacando una

disminución de la expresión del marcador Foxp3. Esta disminución se observó en las células infectadas por el aislado VIH-X4 pero no en las células infectadas por el aislado VIH-R5, y se observó en mayor medida en las células Treg que tuvieron mayor replicación viral. El efecto del VIH-X4 sobre la expresión de Foxp3 requiere una replicación activa del virus y no es suficiente el mero contacto, porque en presencia de fármacos antirretrovirales, que interfieren en su ciclo viral, no se produjo disminución de Foxp3.

#### **4.1.5. La infección por el VIH-1 de células Treg aumenta el grado de metilación del gen FOXP3**

Debido a que la expresión de Foxp3 en células Treg es dependiente de la regulación epigenética basada en la metilación del ADN [103], se estudió la posibilidad de que la infección por el VIH produjera cambios en la metilación de regiones específicas para la expresión del gen *FOXP3*, lo cual podría ser responsable de la disminución de Foxp3 en células Treg infectadas. Se analizó el patrón de metilación de tres regiones claves para la expresión de Foxp3: una región denominada “*enhancer*”, que aparece metilada en células T CD4 periféricas pero no en células Treg [103] y dos regiones localizadas en el gen *FOXP3*: una región en el *Promotor FOXP3*, y una secuencia 2 conservada no-codificante Foxp3 (*CNS2*, siglas en inglés: *conserved noncoding sequence 2*) [104, 105]. Para aumentar la sensibilidad de la técnica y la fiabilidad de los resultados el patrón de metilación se analizó en 20 clones distintos de células Treg infectadas por el VIH-X4 y 20 clones de células Treg no infectadas para cada una de las 3 regiones. Para cada uno de los experimentos se utilizaron células Treg procedentes de 5 donantes distintos.

El grado de metilación observado en las células Treg infectadas y no-infectadas fue heterogéneo dependiendo del donante. Sin embargo, en todos los casos se observó que las células Treg infectadas por el VIH-X4 mostraban mayor metilación que las correspondientes células Treg no infectadas (**Figura 22A**). Interesantemente, aunque no se observaron cambios en la metilación

para la región *enhancer*, la infección por el VIH-X4 aumentó significativamente la metilación en las regiones *promotora* (3,3 veces;  $p=0,043$ ) y *CNS2* (3,8 veces;  $p=0,043$ ) (**Figura 22B**). Estos resultados demuestran que la infección por el VIH-X4 de las células Treg produce un aumento en el patrón de metilación de los sitios CpG en dos regiones que son cruciales para la regulación de la expresión de Foxp3 en estas células.

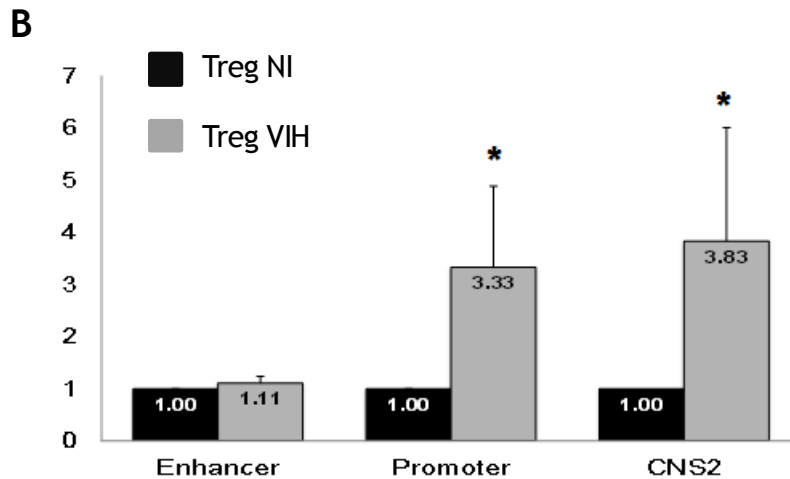


A

	CpG	Mean NI	Mean HIV
Enhancer	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
	9		
	10		
	11		
	12		
	13		
	14		
	15		
	16		
	17		
	18		
	19		
	20		
	21		
	22		
	23		
	24		
	25		
	26		
	27		
	28		
	Mean		
	Mean %	1.52	1.77

	CpG	Mean NI	Mean HIV	
Promoter	-256			
	-216			
	-139			
	-127			
	-114			
	-78			
	-66			
	-59			
	-44			
	-16			
		Mean		

	CpG	Mean NI	Mean HIV	
CNS2	3824			
	3829			
	3870			
	3878			
	3888			
	3891			
	3897			
	3901			
	3909			
	3918			
	3937			
		Mean		

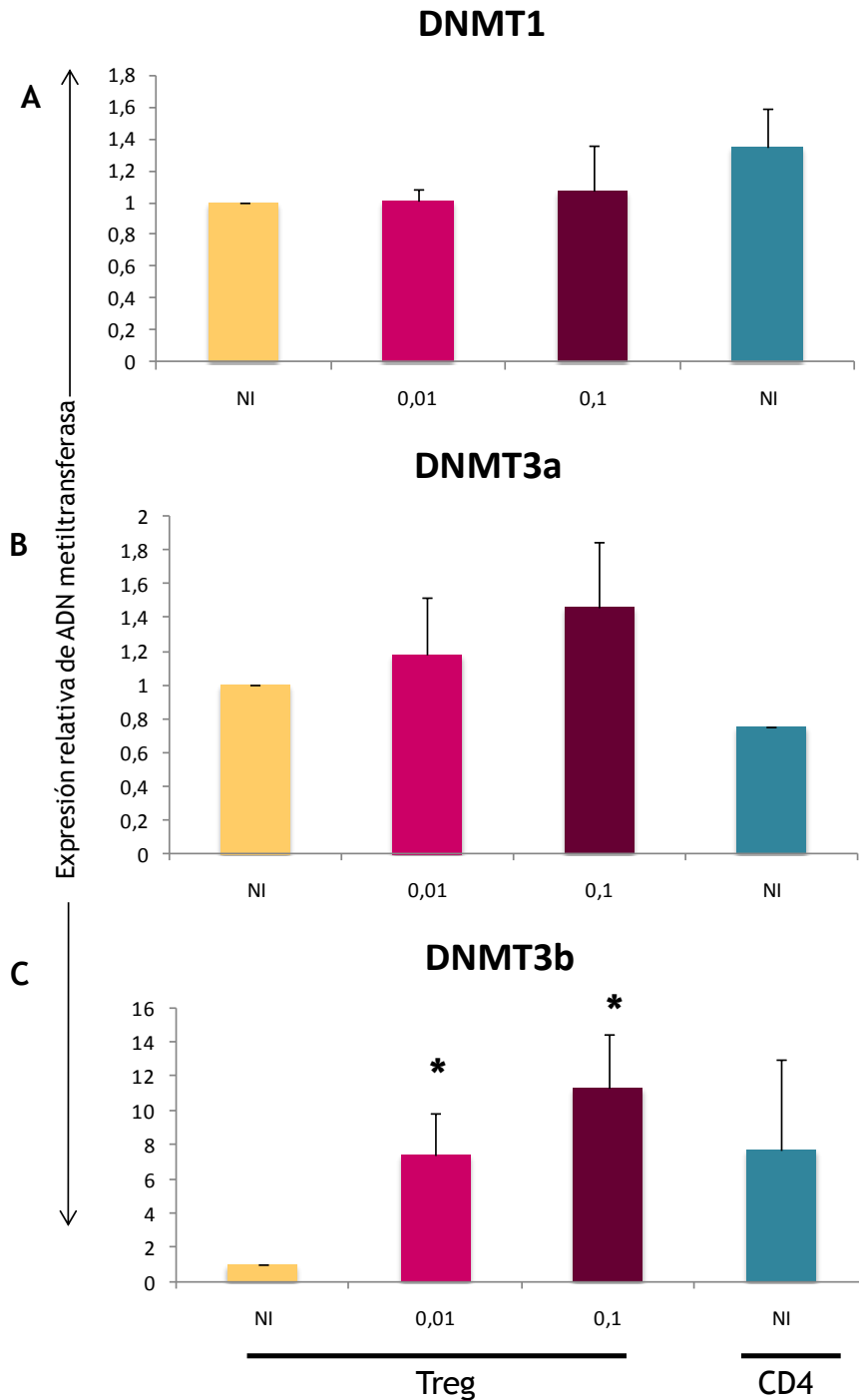


**Figura 22.** La infección por el VIH de las células Treg incrementa la metilación de los sitios CpG del locus *FOXP3*. **(A)** Los gráficos representan el porcentaje medio de metilación de los distintos sitios CpG para cada región del gen *FOXP3* (*Enhancer*, *Promotor* y *CNS2*). Los segmentos de color negro representan el promedio de metilación en cada sitio CpG en 20 clones diferentes para los 5 donantes, los segmentos blancos corresponden al promedio respectivo de sitios no metilados. **(B)** La gráfica muestra el incremento relativo del porcentaje de metilación para cada región. Los aumentos en la metilación de las células Treg infectadas por el VIH-X4 (MOI= 0,1) de cada donante se determinaron con respecto al porcentaje de metilación correspondiente en células Treg no infectadas, las barras representan los valores de la media±EEM del incremento observado en 5 donantes. \*:  $p < 0,05$  en el *test Wilcoxon* para muestras relacionadas.

#### 4.1.6. Análisis de la expresión de enzimas ADN metiltransferasa en células Treg infectadas por el VIH-1.

La metilación del ADN ocurre por la acción de tres enzimas metilasas o DNMT (del inglés *DNA Methyl Transferase*): DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. Estas metilasas son responsables del mantenimiento y de la metilación *de novo* en las células. Los resultados presentados en esta Memoria muestran claramente que la infección por el VIH-1 aumentaba el grado de metilación de *Foxp3*, por lo tanto se estudió el efecto de la infección por el VIH-X4 sobre la expresión de ARNm de DNMT en células Treg infectadas (n= 6).

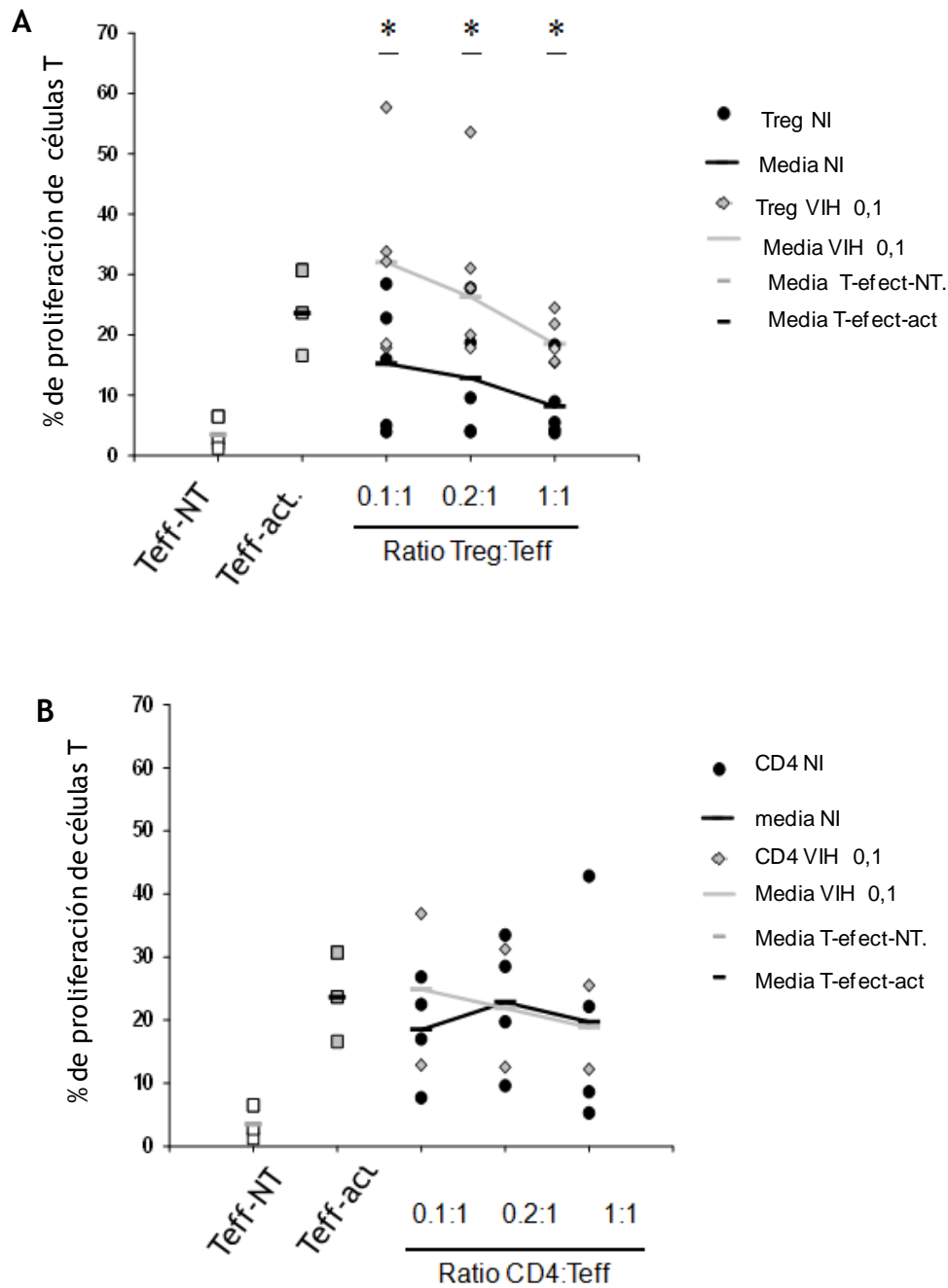
La infección por el VIH-X4 no modificó significativamente las expresiones de DNMT1 y DNMT3a utilizando dos concentraciones distintas de virus (MOI= 0,01 y 0,1) (**Figura 23A, 23B**). Sin embargo, se observó un incremento significativo de la DNMT3b en las células Treg infectadas por el VIH comparadas con las Treg NI ( $p < 0,05$ ) que aumentó su expresión en 7,3 veces y 11,3 veces con MOI de 0,01 y 0,1 respectivamente (**Figura 23C**). Los valores de ARNm de DNMT1 y DNMT3a en células T CD4+ que no eran Treg fueron similares a los valores obtenidos en células Treg NI e infectadas por el VIH-1. Sin embargo, la expresión de DNMT3b, que en las Treg NI era 7 veces inferior que en células CD4 no Treg, alcanzó en las células Treg infectadas por el VIH-1 valores similares a los de las células T CD4+ no Treg que no expresan Foxp3 (**Figura 23C**).



**Figura 23.** Expresión relativa de ADN metiltransferasas en células Treg infectadas por el VIH. La expresión de DNMT1 (A), DNMT3a (B) y DNMT3b (C) se estudió por RT-PCR en linfocitos T CD4, Treg NI y Treg infectadas por el VIH-X4 a el día 7 pos-infección. La expresión de las DNMT se normalizó con respecto a la expresión en células Treg no infectadas. Se representan los valores de la media $\pm$ EEM correspondientes a 6 donantes. \*:  $p < 0,05$  se obtuvo en el *test* no paramétrico U de Mann-Whitney.

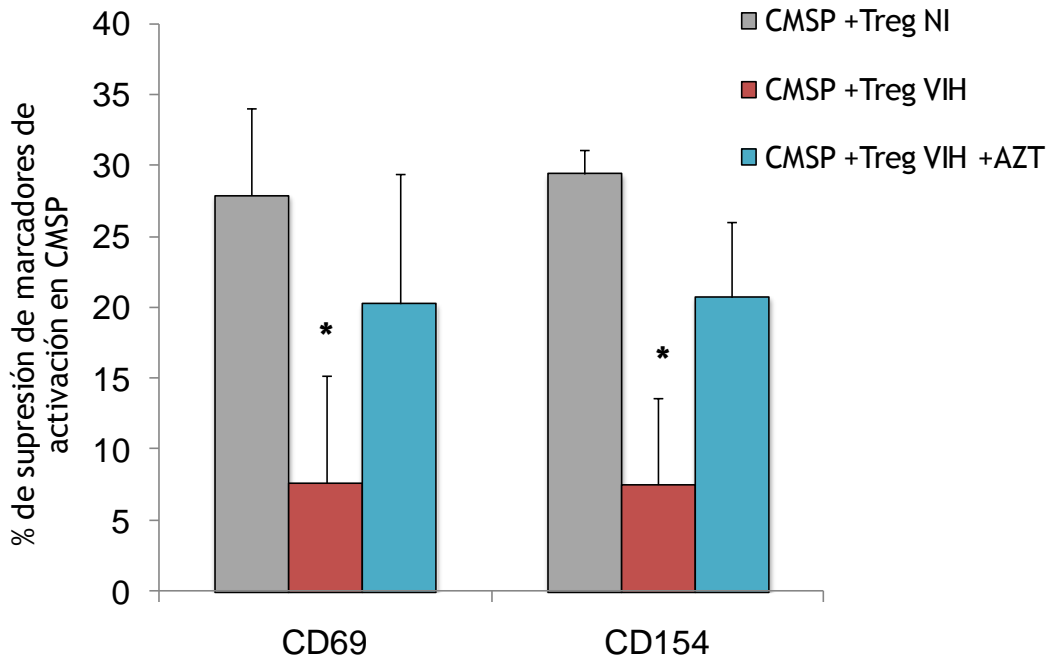
#### 4.1.7. Efecto de la infección por el VIH-1 sobre la función supresora de células Treg

El Foxp3 juega un papel clave en la capacidad supresora de las células Treg, y la disminución de su expresión debido a la infección por el VIH podría afectar también a la funcionalidad de las células infectadas. Por esta razón, se estudió si la infección por el VIH-1 modificaba la capacidad supresora de las células Treg para controlar tanto la proliferación como la activación de células T-efectoras (T-efect). Para ello, se comparó la proliferación de las células T-efect marcadas con CFSE, y cultivadas en presencia de células Treg infectadas o no infectadas por el VIH-X4. Los resultados mostraron que las células Treg infectadas tenían una capacidad supresora significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que las correspondientes Treg NI a los 3 ratios utilizados de Treg:T-efect (0,1:1; 0,2:1 y 1:1) (**Figura 24A**). Además, la proliferación de las células T-efect cultivadas con Treg infectadas, fue similar a la de las T-efect solas, lo cual indica una pérdida casi total de la capacidad supresora de las células Treg infectadas por el VIH-X4. Como control del experimento, se realizó el mismo cultivo mixto pero utilizando células T CD4 no infectadas e infectadas por el X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> en lugar de utilizar células Treg. Los resultados demostraron que la presencia del VIH-1 o de células CD4 no-Treg en los cultivos no modificaban la proliferación de las células T-efect (**Figura 24B**).



**Figura 24.** La capacidad supresora de las c3lulas Treg disminuye tras la infecci3n por el VIH-X4. Las gr3ficas representan la proliferaci3n de c3lulas T-effect alog3nicas tratadas con CFSE y cultivadas con c3lulas Treg a diferentes ratios Treg:T-effect (A) y con c3lulas T CD4 como control del experimento (B) a d3a 5 pos-infecci3n. Para los 3 ratios ensayados, la supresi3n de la proliferaci3n fue significativamente inferior en presencia de c3lulas Treg infectadas por el VIH que cuando se utilizaron Treg no infectadas. \*:  $p < 0,05$  en el test no param3trico U de *Mann-Whitney*.

Por otra parte, se comprobó si la infección por el VIH-1 afectaba a la capacidad de las células Treg para inhibir la activación de las CMSP (**Figura 25**). Se cuantificó la frecuencia de dos marcadores de activación (CD154 y CD69) en CMSP estimuladas, en cultivo mixto con células Treg infectadas o no por el VIH-X4 (Treg:CMSP ratio 2:1). La capacidad supresora de las células Treg se calculó como el porcentaje de supresión de los marcadores de activación en CMSP:  $100 - [(\% \text{ expresión en presencia de células Treg} / \% \text{ en ausencia de Treg}) \times 100]$ . Las células Treg no infectadas suprimieron en más del 25% la expresión de CD154 y CD69 en CMSP. Sin embargo, las células Treg infectadas por el VIH-X4 suprimieron en torno a un 8% la expresión de ambos marcadores, mostrando una menor capacidad supresora que las células Treg NI (CD69:  $p = 0,035$ ; CD154:  $p = 0,034$ ). Cuando las células Treg se trataron con AZT (5 mmol/L) antes de la infección por el VIH-X4 la capacidad supresora se preservó inhibiendo la expresión de los marcadores de activación en más de un 20%, similar a lo observado con las células Treg NI (CD69:  $p = 0,281$ ; CD154:  $p = 0,339$ ). Estos resultados confirman que el efecto sobre la función supresora en las células Treg es debido a la replicación activa del virus y no a su mera presencia en los cultivos.



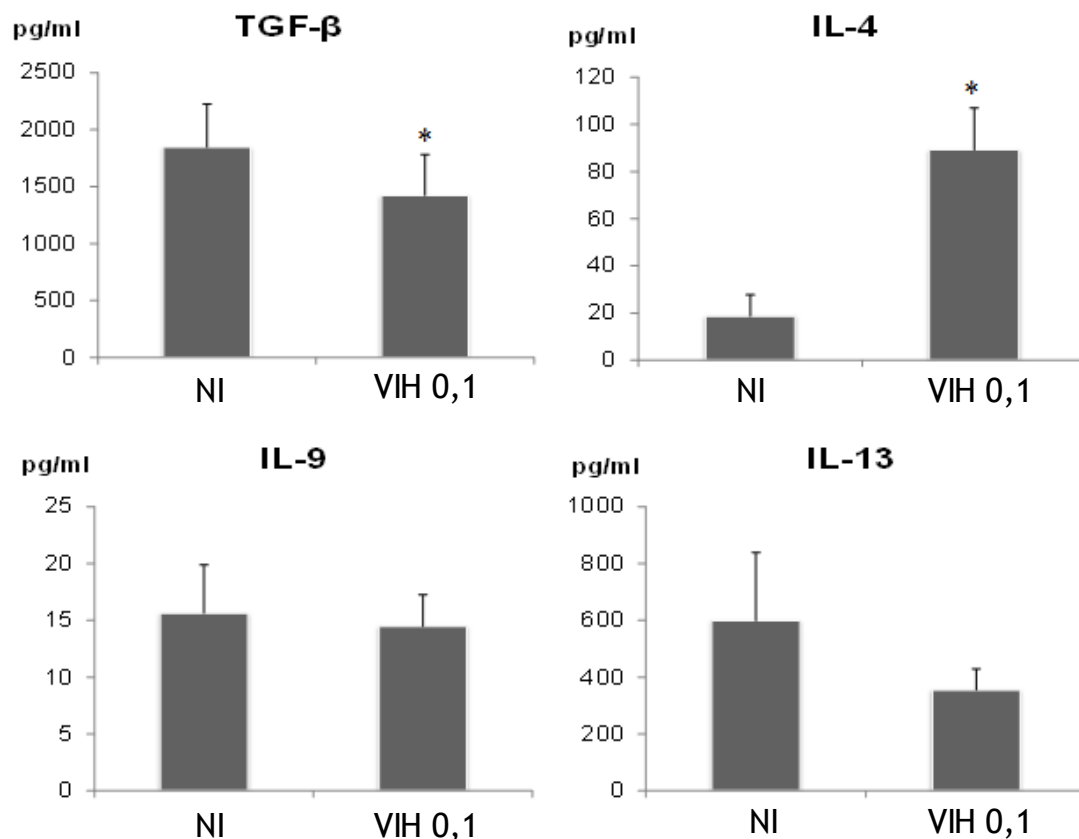
**Figura 25.** Capacidad supresora de las células Treg infectadas por el VIH-X4 en respuesta a la activación de CMSP. La gráfica representa los porcentajes de supresión de los marcadores de activación CD69 y CD154 (Media±EEM) en CMSP estimuladas en presencia de células Treg a un ratio Treg:CMSP de 2:1. Se indican los valores de supresión obtenidos con Treg NI, Treg VIH-X4 (MOI= 0,1) y Treg VIH-X4 (MOI= 0,1) más AZT (5mmol/L), de 4 donantes distintos. \*:  $p < 0,05$  en el *test* no paramétrico U de *Mann-Whitney*.

En resumen, las células Treg infectadas por el VIH-1 pierden gran parte de su capacidad supresora sobre la proliferación y la activación de células T efect cuando se comparan con las células Treg no infectadas. Esta pérdida de parte de la capacidad supresora de las células Treg se puede asociar a la disminución de Foxp3 que se observa en las células Treg infectadas por el VIH-1 que afectaría a su capacidad funcional.



#### **4.1.8. Expresión de citoquinas en las células Treg infectadas por el VIH-1**

Se estudió si la infección por el VIH-X4 de células Treg producía algún cambio en el patrón de secreción de citoquinas. La producción de citoquinas se cuantificó en el sobrenadante de los cultivos de las células Treg infectadas a día 7, con el objetivo de tener suficiente cantidad de citoquinas para su detección. Se observó una disminución significativa del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) ( $p= 0,028$ ) y un incremento significativo de la producción de IL-4 ( $p= 0,018$ ) en las células Treg infectadas por VIH-X4 comparadas con las Treg no infectadas (**Figura 26**). No se observaron diferencias significativas en la producción de IL-9 (Th9), e IL-13 (Th2), aunque la expresión en células Treg infectadas por el VIH de esta última citoquina fue bastante más baja con respecto a las Treg NI. Los valores en plasma fueron indetectables para las siguientes citoquinas: IL-12 (Th1), IL-5, IL-6 e IL-10 (Th2), e IL-17A (Th17) tanto en células Treg NI como infectadas. Por tanto, los resultados muestran que la infección por el VIH-X4 de las células Treg produce cambios en la expresión de determinadas citoquinas que están implicadas en la función de estas células.



**Figura 26.** La infección por el VIH-1 modifica la secreción de algunas citoquinas en las células Treg infectadas. La cantidad de TGF-β, IL-4, IL9 e IL13 (pg/mL) se cuantificó por citometría de flujo en el sobrenadante de los cultivos de las células Treg NI y Treg infectadas por el VIH-X4 a día 7 pos-infección. Las gráficas muestran la media±EEM de 7 donantes distintos. \*:  $p < 0,05$  en el *test* no paramétrico de U Mann-Whitney.

## 4.2. Efecto de la infección por el VIH en las células Treg de individuos VIH+.

Las células Treg son un componente crucial para mantener la correcta homeostasis del SI, y por tanto una alteración en esta población puede tener consecuencias en las demás poblaciones inmunitarias y en el equilibrio inmunológico general. De hecho, se ha descrito que los pacientes infectados

por el VIH, incluso aquellos que tienen controlada la carga viral, presentan diversas alteraciones inmunes y con bastante frecuencia presentan una hiperactivación inmune generalizada [106]. A la vista de los resultados obtenidos *in vitro*, que demuestran que el VIH es capaz de desregular el fenotipo y la funcionalidad de las células Treg, cabe pensar que este hecho guarde relación con la hiperactivación y la pérdida de la homeostasis del SI sufrida en pacientes infectados. Por tanto, en esta parte de la Memoria, se analizó el estado inmunológico de los individuos VIH+, midiendo el porcentaje y el número absoluto de distintas poblaciones celulares del SI, tales como: linfocitos T *helper* (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+), linfocitos B, células NK, monocitos y granulocitos. A continuación se estudió el fenotipo y funcionalidad de las células Treg en individuos VIH+ y se estableció si existe una correlación entre las alteraciones en la población Treg y el estado inmunológico de los pacientes.

Con el fin de determinar cómo afecta la presencia del VIH a las distintas poblaciones inmunes, y en particular a las Treg, en pacientes infectados, se dividieron a los individuos VIH+ en dos grupos, individuos con carga viral indetectable (CVi) e individuos con carga viral detectable (CV). Además, se incluyó un grupo control de donantes sanos no infectados (controles) con una media de edad similar a estos dos grupos como se muestra en la **Tabla 5**. El grupo CVi está formado por individuos VIH+ con carga viral indetectable (<50 copias/mL de sangre) durante al menos los 6 meses previos a la obtención de la muestra, mientras que el grupo CV lo formaban pacientes que tuvieron más de 1000 copias/mL durante los 6 meses previos a la muestra.

Tabla 5. Características clínicas/demográficas presentes en los tres grupos de estudio. Los datos se muestran como la media±EEM en el momento de la obtención de la muestra

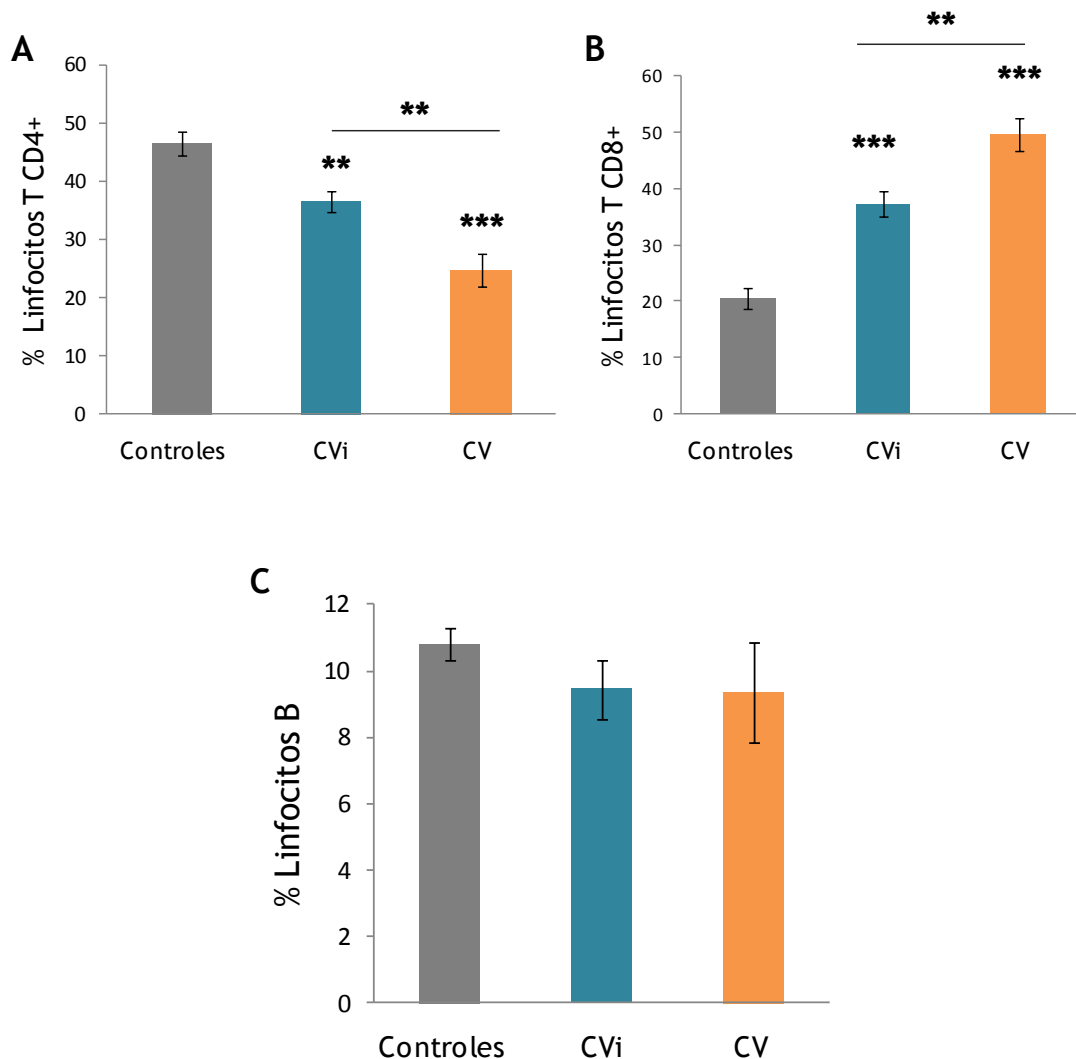
Grupo	sexo	n	Edad (años) Media±EEM	N° Abs de T CD4 (cél/μL) media±EEM	Carga viral (copias/mL) Media±EEM
Control	Hombre	7	34,11±3,61	837,16±73,27	
	Mujer	7			
	Total	14			
CVi	Hombre	17	41,00±2,36	681,10± 64,50	47,15±15,75
	Mujer	3			
	Total	20			
CV	Hombre	10	36,00± 4,03	471,76± 94,28	79003,84± 36528,75
	Mujer	3			
	Total	13			

#### 4.2.1. Poblaciones de linfocitos en los pacientes infectados por el VIH

Las distintas poblaciones inmunes se analizaron mediante la detección de moléculas de superficie que identifican a los distintos tipos celulares. Los linfocitos T se definieron por el marcaje de CD3 en membrana, y dentro de la población de linfocitos CD3+ se distinguieron células T *helper* y células T citotóxicas por la presencia en membrana de las moléculas CD4 y CD8, respectivamente. Además, dentro de cada población de linfocitos T también se identificaron los subtipos de células *naïve* (CD27+CD45RA+), efectora (CD27–CD45RA+) y pre-efectora (CD27–CD45RA–). También, se analizaron marcadores de activación y de células memoria, identificando células activadas (HLA-DR+) y células memoria (CD45RO+).

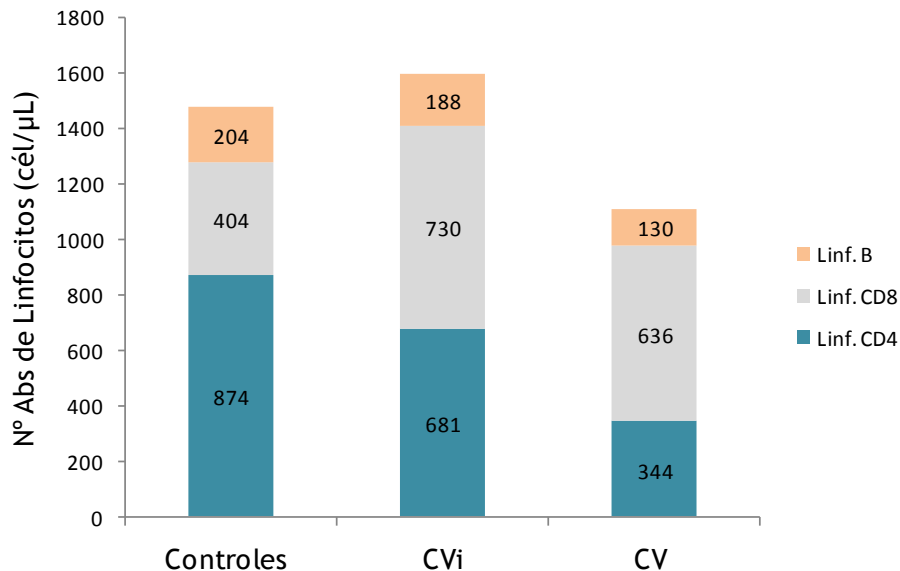
El grupo de pacientes con alta CV mostró un porcentaje de células T CD4 menor que el grupo CVi ( $p= 0,001$ ) y que el grupo control ( $p= 0,000$ ) (Figura 27A). El porcentaje de células T CD4 también fue menor en el grupo CVi que en el grupo control ( $p= 0,001$ ). De forma contraria, el porcentaje de

linfocitos T CD8 fue mayor en el grupo CV que en el grupo CVi ( $p= 0,004$ ) y el grupo control ( $p= 0,000$ ), y también fue mayor en el grupo CVi comparado con el grupo control ( $p= 0,000$ ) (**Figura 27B**). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos B entre los tres grupos (**Figura 27C**).



**Figura 27. Porcentajes de poblaciones de linfocitos presentes en los tres grupos.** Las gráficas representan la media±EEM de los porcentajes de linfocitos T CD4 (A), T CD8 (B) y linfocitos B (C), en pacientes con carga viral indetectable (CVi) y con alta carga viral (CV) comparados con donantes sanos (controles). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  y \*\*\*:  $p < 0,001$  en el *test* no paramétrico U de *Mann-Whitney*.

En cuanto a los valores absolutos de linfocitos se observó un menor número absoluto de linfocitos T CD4 en el grupo CV y en el grupo CVi comparados con el grupo control (CV:  $p= 0,000$ ; CVi:  $p= 0,017$ ). Además, el grupo CVi presentó mayor número absoluto de linfocitos T CD4 que el grupo CV ( $p= 0,000$ ). El número absoluto de células T CD8 fue mayor en ambos grupos de pacientes VIH comparados con el grupo control (CV:  $p= 0,015$ ; CVi:  $p= 0,002$ ) (**Figura 28**). Por otra parte, el número absoluto de linfocitos B presente en el grupo con CV fue menor al observado en el grupo CVi ( $p= 0,010$ ) y el grupo control ( $p= 0,004$ ), tal y como se observa en la **Figura 28**.



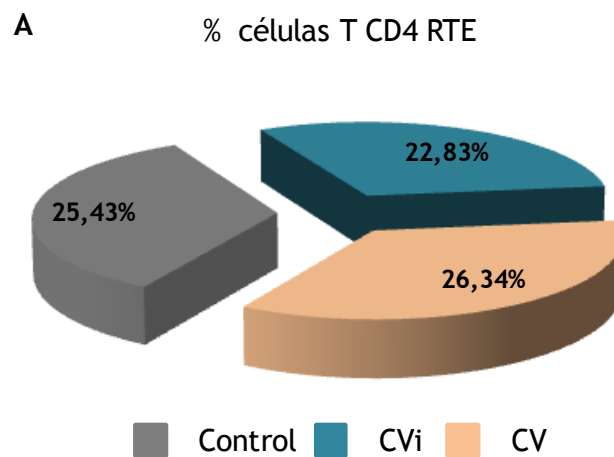
**Figura 28.** Número absoluto de linfocitos T CD4, CD8 y linfocitos B presentes en los tres grupos. La gráfica muestra la media del número absoluto de los linfocitos T CD4 y CD8 y linfocitos B presentes en el grupo control, grupo CVi y grupo CV.

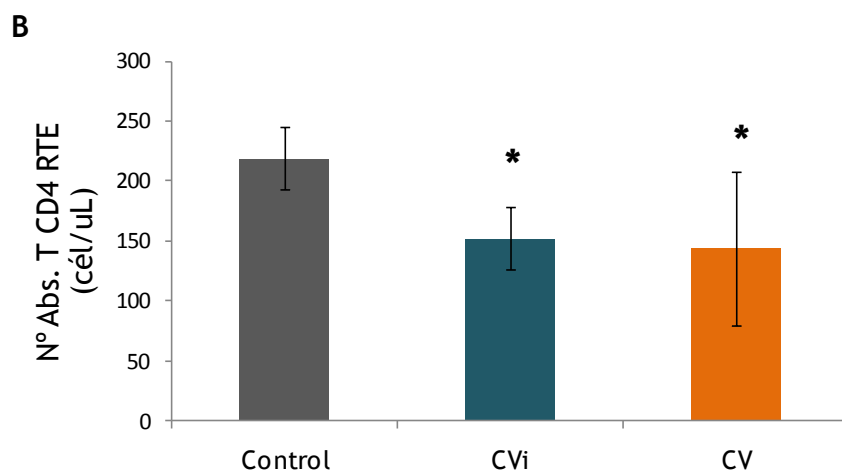
#### 4.2.2. Análisis de función tímica mediante la cuantificación de células emigrantes recientes del timo

Un marcador indirecto de la producción tímica de nuevas células T es la expresión de la molécula CD31 en células T CD4. Este marcador desaparece al

dividirse la célula en la periferia, por lo que a las células T CD4 CD31+ se las considera emigrantes recientes del timo o RTE (*recent thymic emigrants*) y su cuantificación se considera proporcional a la producción tímica de nuevas células T [107].

El porcentaje de células T CD4 RTE fue similar entre los grupos CV y CVi, y fueron comparables al grupo control (CV:  $p= 0,827$ ; CVi:  $p= 0,172$ ) (**Figura 29A**). Se observó un menor número absoluto de células T CD4 RTE en el grupo con CV ( $p= 0,013$ ) y en el grupo CVi ( $p= 0,013$ ) en comparación con el grupo control, tal y como se muestra en la **Figura 29B**. Estos resultados indican que la producción de nuevas células T por parte del timo está disminuida en los individuos VIH+ en comparación con controles sanos, tanto en el grupo de pacientes con CV como en el grupo CVi.





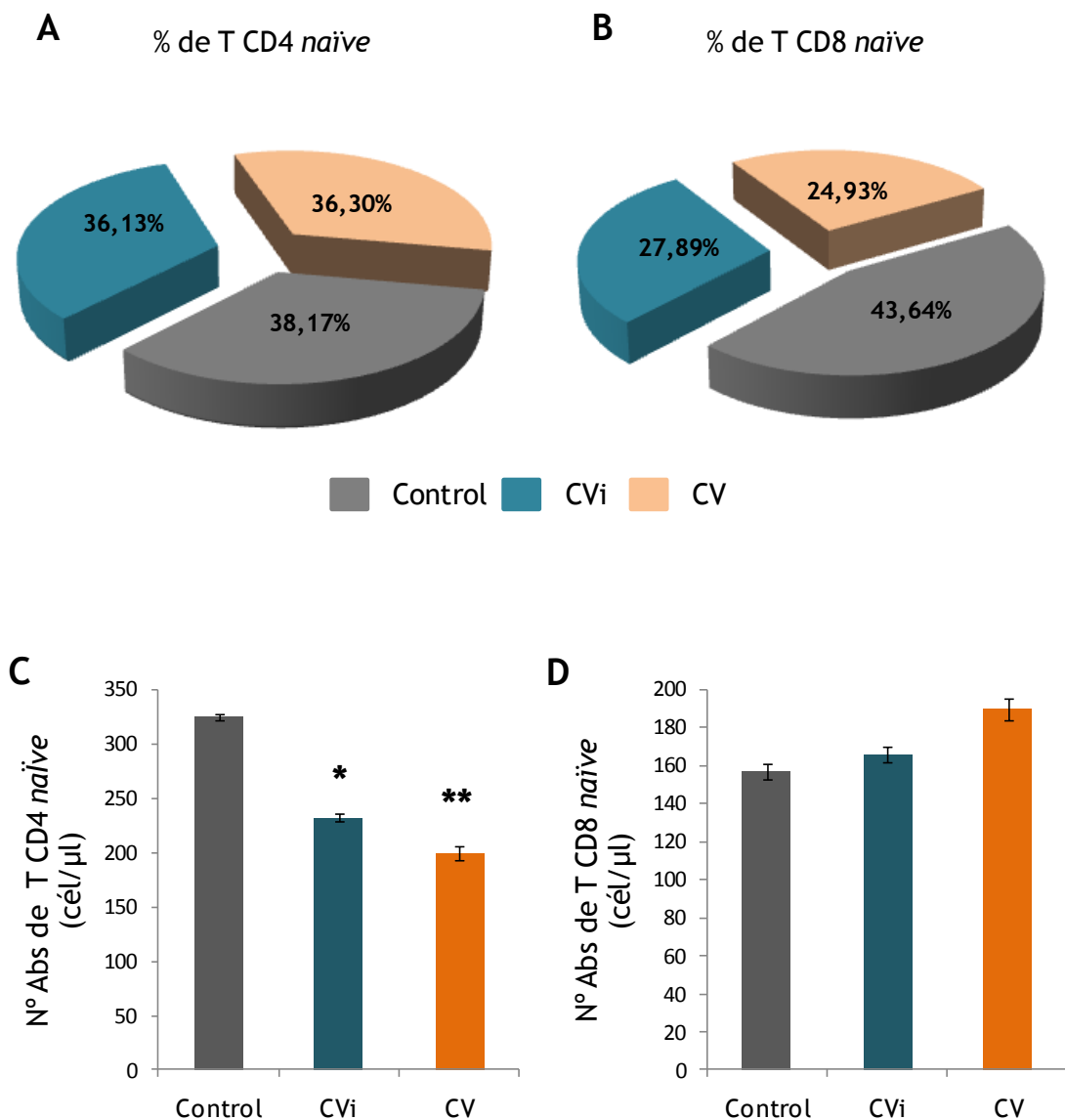
**Figura 29. Producción tímica de células T en pacientes infectados por el VIH. (A)** Porcentaje de células T CD4 RTE en el grupo CVi y el grupo CV comparados con el grupo control. **(B)** Las gráficas representan la media±EEM del número absoluto de células T CD4 RTE (cél/μL) en el grupo CVi y el grupo CV, comparados con el grupo control. \*:  $p < 0,05$  en el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

#### 4.2.3. Distribución de las sub-poblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 en pacientes infectados

Con el fin de establecer el estado inmunológico de los pacientes y su relación con las alteraciones en la población Treg se analizaron también las distintas subpoblaciones *naïve*, activada o memoria dentro de los linfocitos T CD4 y T CD8.

En cuanto a la población *naïve*, los resultados muestran que no había diferencias significativas en el porcentaje de células T CD4 *naïve* entre los grupos. El porcentaje de células T CD8 *naïve* fue menor en los individuos VIH+ comparado al observado en el grupo control (CVi:  $p = 0,003$ ; CV:  $p = 0,003$ ) (**Figura 30A, 30B**). El número absoluto de células T CD4 *naïve* fue inferior en los dos grupos de pacientes comparado al grupo control (CVi:  $p = 0,030$ ; CV:  $p = 0,006$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los 2 grupos de pacientes infectados. Tampoco se observaron diferencias en el número absoluto de células CD8 *naïve* entre los grupos (**Figura 30C, 30D**).





**Figura 30.** Subpoblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 *naïve* en los tres grupos de estudio. Las gráficas circulares representan el porcentaje de linfocitos T CD4 *naïve* (A) y T CD8 *naïve* (B) presentes en los tres grupos. Las gráficas muestran la media $\pm$ EEM de los números absolutos (cél/ $\mu$ L) de linfocitos T CD4 (C) y T CD8 (D) presentes en el grupo CVi y el grupo CV comparados con el grupo control. \*:  $p < 0,05$  y \*\*:  $p < 0,01$  en el *test* no paramétrico U de *Mann-Whitney*.

Mediante la detección de marcadores de superficie se determinaron también las frecuencias de las subpoblaciones de células T activadas (HLA-DR+), de memoria (CD45RO+) y efectoras (CD27–CD45RA+ o CD27–CD45RA–).

Dado el efecto supresor de las células Treg sobre la activación o diferenciación de otras poblaciones inmunes, la frecuencia de células activadas o efectoras podría verse especialmente influenciada por los valores de Treg. Los porcentajes de células T CD4 activadas y memoria observados fueron similares entre los grupos de pacientes y frente al grupo control ( $p > 0,05$ ) (Figura 31A, 31B). El porcentaje de células T CD4 memoria-activadas (CD4+CD45RO+HLA-DR+) fue mayor en los dos grupos de pacientes infectados que en el grupo control (CVi:  $p = 0,000$ ; CV:  $p = 0,010$ ), y no se observaron diferencias entre los porcentajes del grupo CV y el grupo CVi ( $p = 0,292$ ), tal y como se observa en la Figura 31C.

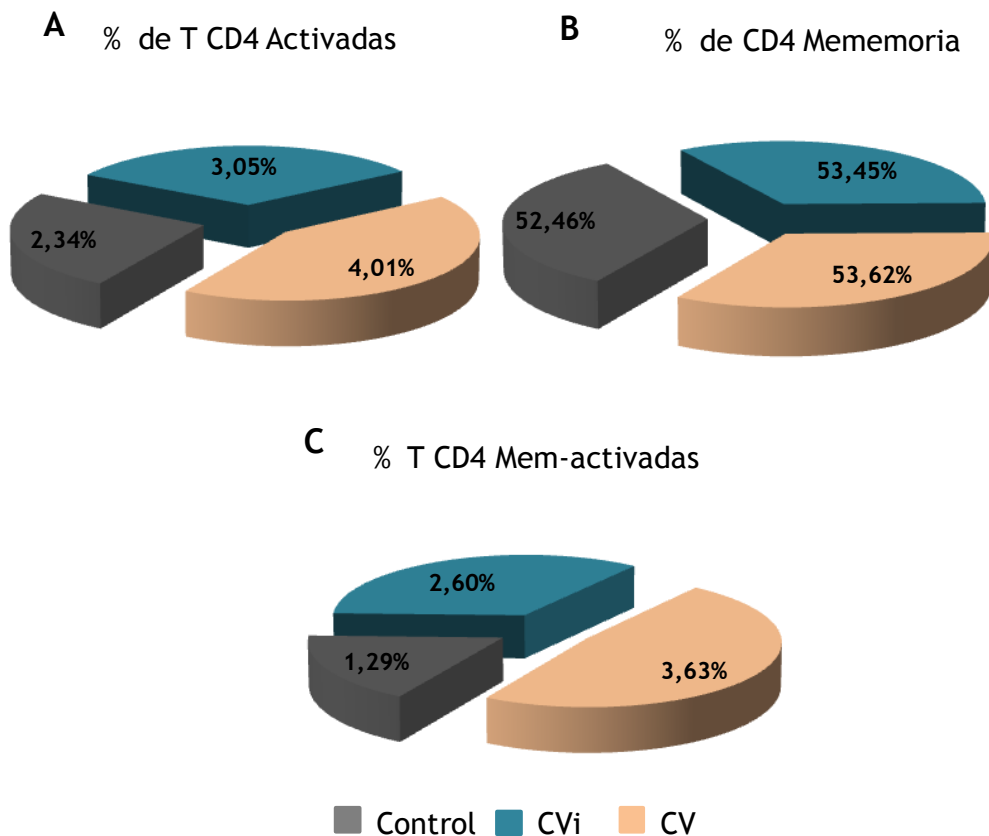
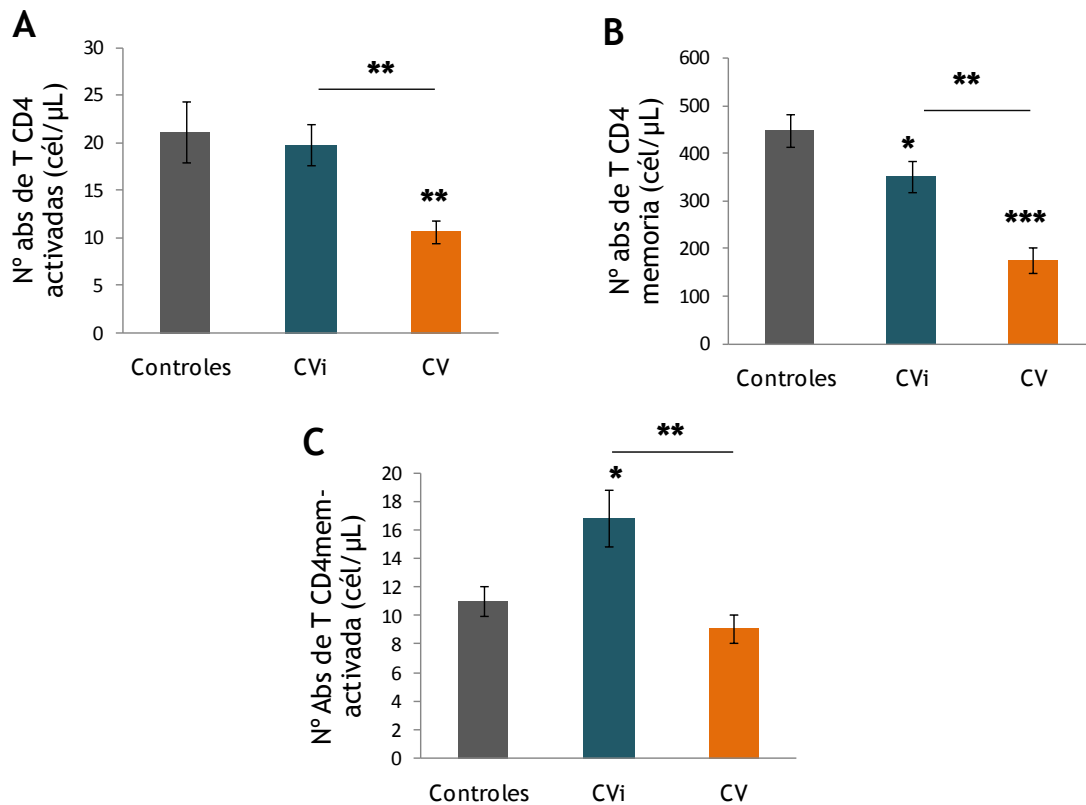


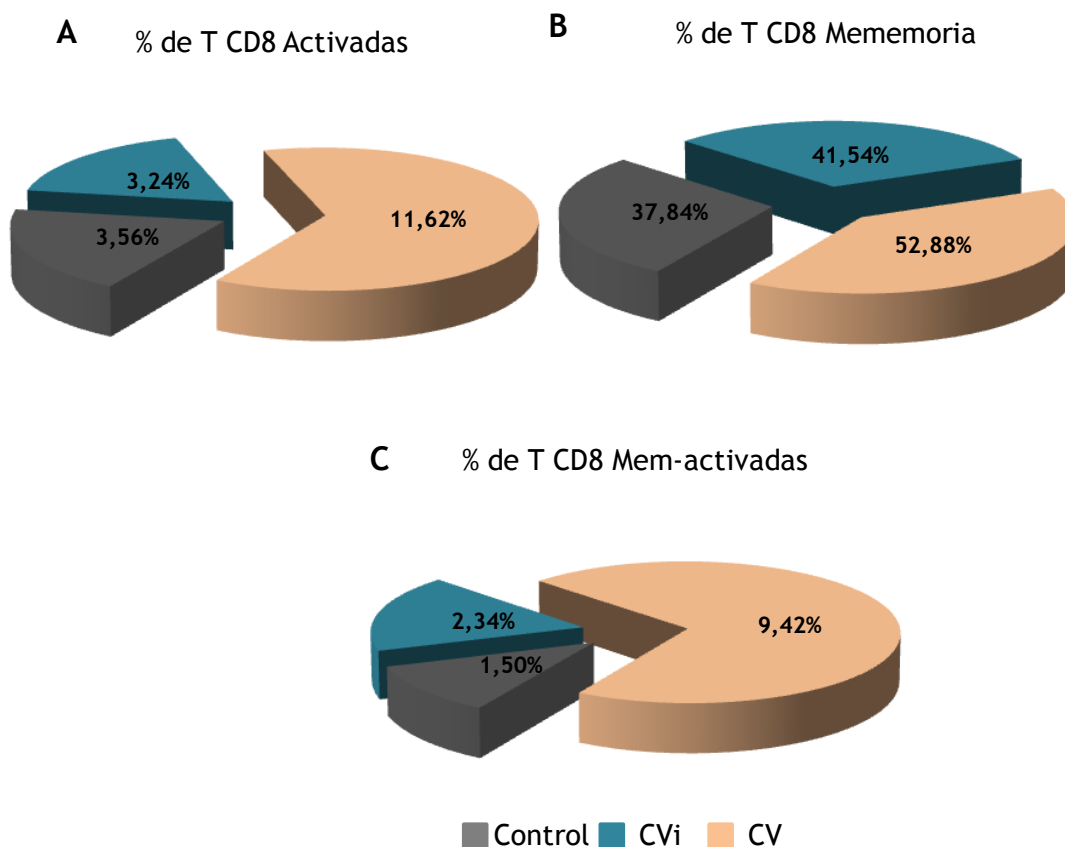
Figura 31. Porcentaje de sub-poblaciones de linfocitos T CD4. Las gráficas muestran los valores medios del porcentaje de T CD4 activadas (A), T CD4 memoria (B) y T CD4 memoria activada (C), en el grupo CVi y el grupo CV comparados con el grupo control.

Al analizar los valores absolutos de estas subpoblaciones se observó que el número absoluto de células T CD4 activadas en el grupo CV fue inferior al observado en el grupo CVi ( $p= 0,004$ ) y en el grupo control ( $p= 0,005$ ) (**Figura 32A**). También, se observaron diferencias en el número absoluto de células CD4 memoria entre el grupo control y los dos grupos de pacientes (CVi:  $p= 0,030$ ; CV:  $p= 0,000$ ) y entre los grupos de pacientes ( $p= 0,001$ ), como se muestra en la **Figura 32B**. El número absoluto de células T CD4 memoria-activadas fue mayor en el grupo CVi que en el grupo control ( $p= 0,049$ ) y que en el grupo CV ( $p= 0,006$ ) (**Figura 32C**).



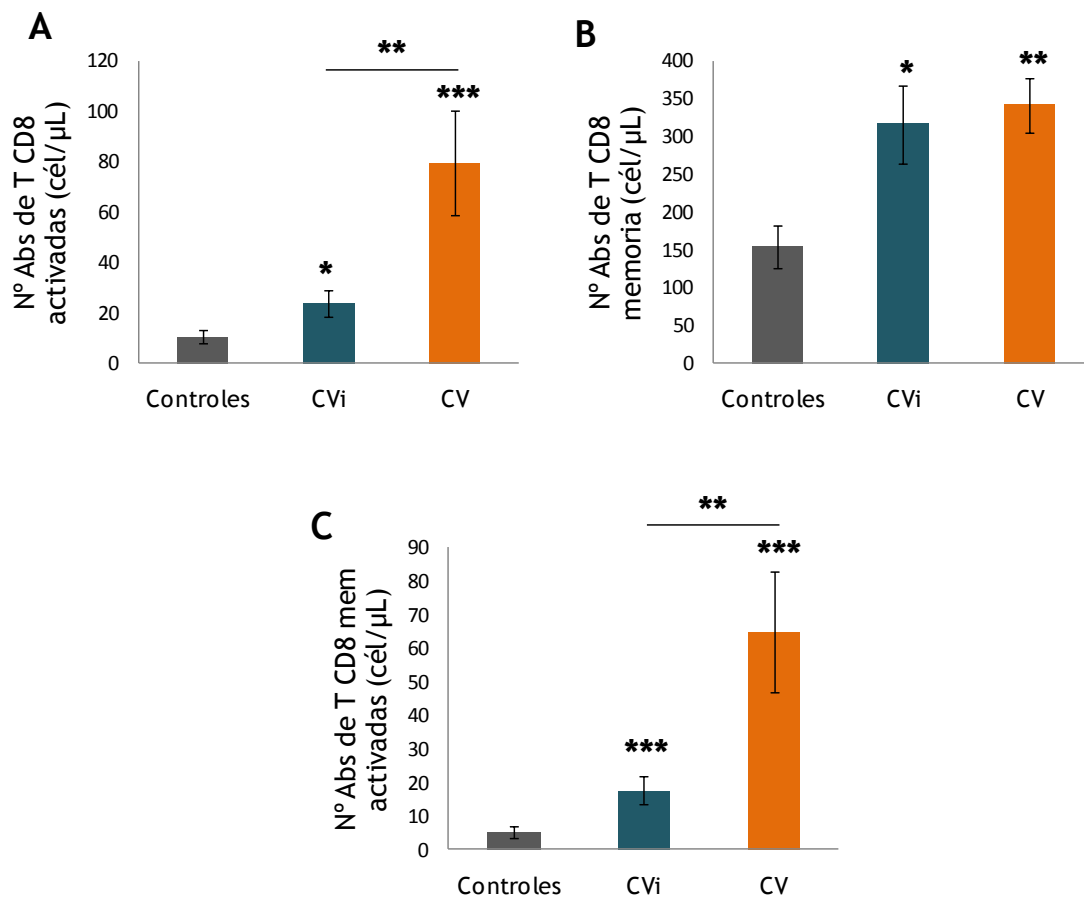
**Figura 32.** Valores absolutos de subpoblaciones de linfocitos T CD4. Las gráficas representan la media±EEM del número absoluto (cél/µL) de linfocitos T Activados (A), T CD4 Memoria (B) y T CD4 Memoria activada (C), en el grupo CVi y el grupo CV comparados con el grupo control. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  en el *test* no paramétrico U de Mann-Whitney.

En cuanto a la población de células T CD8 activadas y memoria, el porcentaje de células T CD8 activadas fue mayor en el grupo con CV que en el grupo control ( $p= 0,003$ ) y que en el grupo CVi ( $p= 0,000$ ) (**Figura 33A**). También fue mayor el porcentaje de células T CD8 memoria en el grupo CV comparado con el grupo control ( $p= 0,003$ ) y el grupo CVi ( $p= 0,039$ ), pero entre el grupo CVi y el grupo control no hubo diferencias significativas (**Figura 33B**). En cuanto al porcentaje de células CD8 memoria activadas, se observó un marcado incremento en el grupo de CV frente al grupo control ( $p= 0,000$ ) y el grupo CVi ( $p= 0,000$ ) (**Figura 33C**).



**Figura 33.** Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T CD8. Las graficas muestran los valores medios del porcentaje de linfocitos T CD8 Activados (A), T CD8 Memoria (B) y T CD8 Memoria-activada (C), en el grupo CVi y el grupo CV comparados frente al grupo control.

En cuanto a los valores absolutos, el número absoluto de células T CD8 activadas fue mayor en ambos grupos de pacientes frente al grupo control (CVi:  $p= 0,015$ ; CV:  $p= 0,000$ ) y también fue mayor en el grupo CV que en el grupo CVi ( $p= 0,002$ ), como se muestra en la **Figura 34A**. El número absoluto de células T CD8 memoria fue mayor en el grupo CV que en el grupo control ( $p= 0,001$ ) (**Figura 34B**). También fue en el grupo CVi que en el grupo control ( $p=0,015$ ). En cuanto al número absoluto de células T CD8 memoria-activadas, los dos grupos de individuos VIH+ presentaron valores más altos que el grupo control (CVi:  $p= 0,000$ ; CV:  $p= 0,000$ ), siendo también mayor el valor observado en el grupo CV que en el grupo CVi ( $p= 0,001$ ) (**Figura 34C**).



**Figura 34.** Número absoluto de sub-poblaciones de linfocitos T CD8. Las gráficas representan la media±EEM del número absoluto (cél/μL) de linfocitos T CD8 Activados (**A**), T CD8 Memoria (**B**) y T CD8 Memoria-activada (**C**) en el grupo CVi y el grupo CV comparados con el grupo control. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  en el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

También se estudió el porcentaje y número absoluto de células T CD4 y T CD8 efectoras. Se observaron diferencias en el porcentaje de células T CD4 pre-efectoras (CD27–CD45RA–) entre el grupo CVi y el grupo control ( $p=0,023$ ), siendo mayor en el grupo CVi (Figura 35A). El número absoluto de estas células fue significativamente menor en el grupo CV frente al grupo CVi ( $p=0,018$ ) y que el grupo control ( $p=0,018$ ) (Figura 35C). En cuanto al porcentaje y número absoluto de células T CD4 efectoras (CD27+CD45RA+) no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos ( $p>0,05$ ) (Figura 35B). Aunque el valor absoluto medio de células T CD4 efectoras en el grupo CVi fue superior al de los otros grupos de estudio, la diferencia no fue estadísticamente significativa (CVi/Control:  $p=0,056$ ; CVi/CV:  $p=0,061$ ) (Figura 35D).

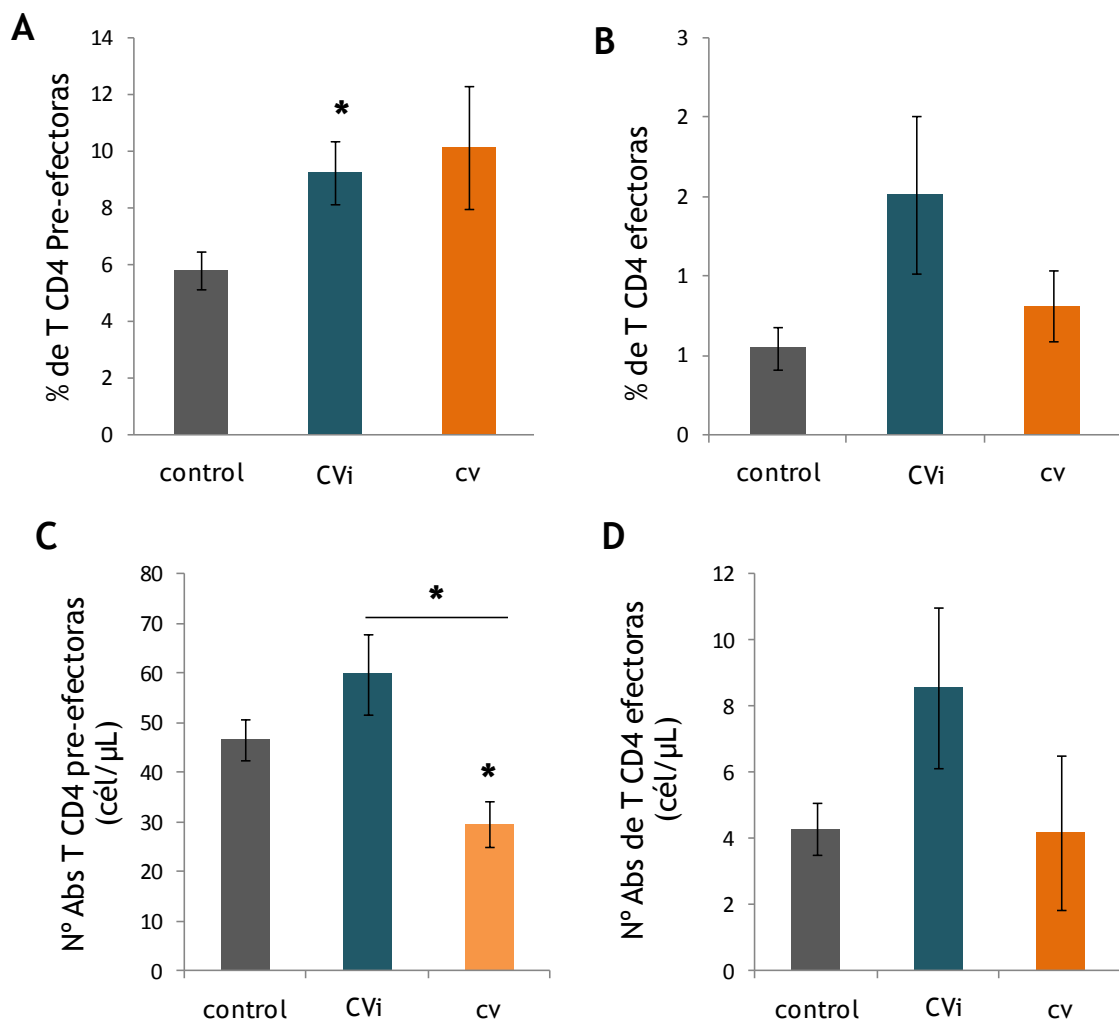
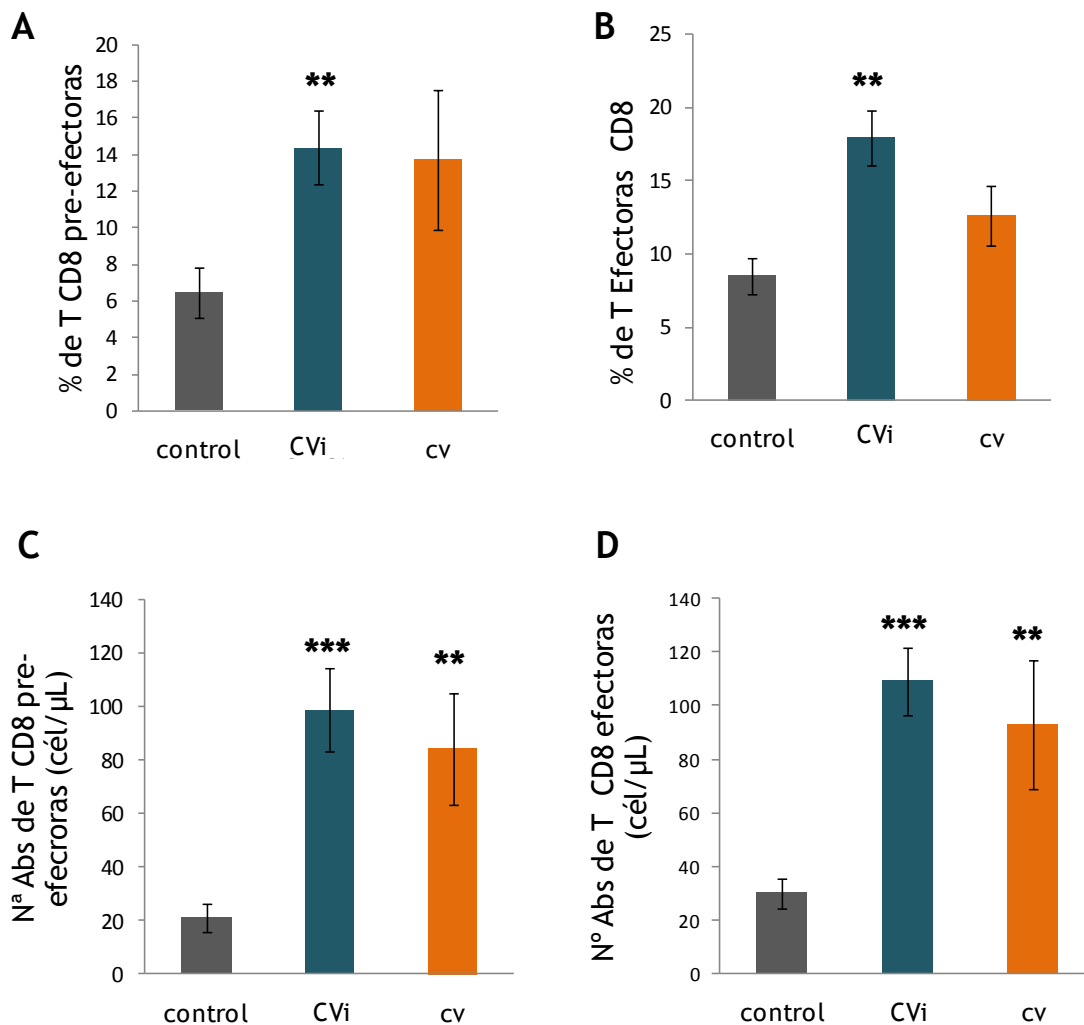


Figura 35. Porcentaje y número absoluto de las células T CD4 pre-efectoras y efectoras presentes en los tres grupos. Las gráficas muestran la media $\pm$ EEM del

porcentaje de células T CD4 pre-efectoras **(A)** y efectoras **(B)** y el número absoluto (cél/ $\mu$ L) de células T CD4 pre-efectoras **(C)** y efectoras **(D)** observados en el grupo CVi, el grupo CV y grupo control. \*:  $p < 0,05$  en el *test* no paramétrico U de *Mann-Whitney*.

En cuanto a los porcentajes de células T CD8 pre-efect y efectora, se observó un mayor porcentaje en el grupo CVi comparado con el grupo control ( $p = 0,004$  y  $p = 0,002$ , respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre CV y grupo control, ni entre los 2 grupos de individuos VIH+ (**Figura 36A, 36B**). El número absoluto de las células T CD8 pre-efectoras fue mayor en los grupos de individuos VIH+ que en el grupo control (CVi:  $p = 0,000$ ; CV:  $p = 0,008$ ), y lo mismo ocurría con el número absoluto de células T CD8 efectoras (CVi:  $p = 0,000$ ; CV:  $p = 0,006$ ) (**Figura 36C, 36D**). No se observaron diferencias entre los grupos CV y el grupo CVi ( $p = 0,302$ ) para esta población (**Figura 36D**).



**Figura 36.** Valores de células T CD8 pre-efectoras y efectoras presentes en los tres grupos. Las gráficas muestran los porcentajes de células T CD8 pre-efectoras (A) y efectoras (B) y el número absoluto (cél/μL) de CD8 pre-efectoras (C) y efectoras (D) observados en el grupo CVi, el grupo CV y grupo control. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  en el *test* no paramétrico U de *Mann-Whitney*.

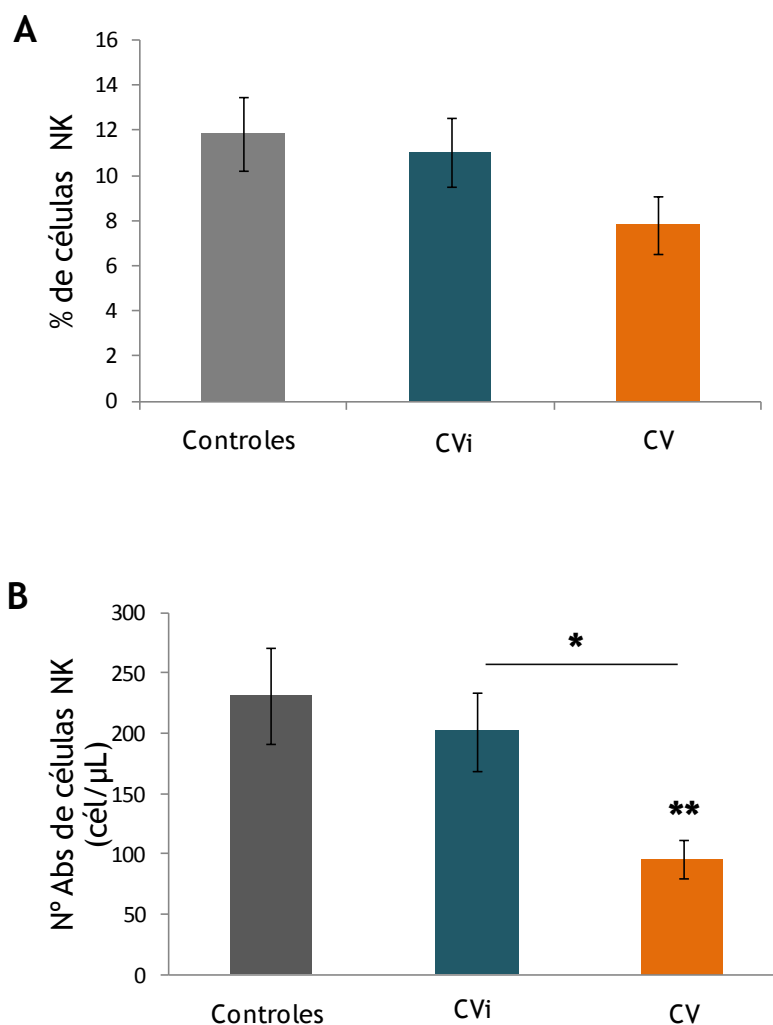
#### 4.2.4 Valores de células Natural Killer en pacientes infectados

Las células NK constituyen el 5-20% del total de CMSP en humanos y juegan un papel importante en la defensa contra infecciones virales [108, 109]. Tradicionalmente, se identifican como células CD3–CD14–CD19– que expresan CD56 (molécula de adhesión celular neural) y NKp46 [110]. Sin embargo, se ha reportado que esta última molécula no se expresa en todos los



humanos [108]. Actualmente, las NK se han clasificado en dos grupos: a) las que expresan CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, que son consideradas como células maduras; b) y las que expresan CD56<sup>++</sup>CD16<sup>+/-</sup> consideradas como células inmaduras y que representan el 10% de las NK circulantes [108, 110].

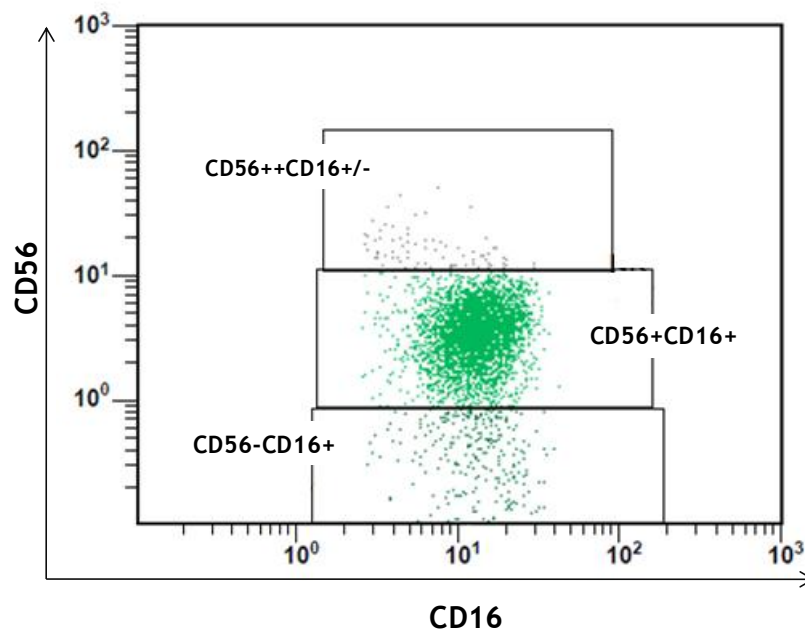
Los porcentajes de células NK totales fueron similares en los tres grupos (**Figura 37A**). Sin embargo, el número absoluto de NK presente en el grupo CV fue mucho menor comparado con el grupo CVi ( $p= 0,010$ ) y que el observado en el grupo control ( $p= 0,006$ ), como se muestra en la **Figura 37B**.



**Figura 37. Porcentaje y número absoluto de células natural killer (NK).** Las gráficas representan la media $\pm$ EEM del porcentaje (**A**) y del número absoluto (cél/ $\mu$ L) (**B**) de células NK, presentes en el grupo CVi y el grupo CV, comparados con el grupo control. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  en el *test* no paramétrico U de *Mann-Whitney*.

#### 4.2.4.1. Distribución de las sub-poblaciones de Natural killer

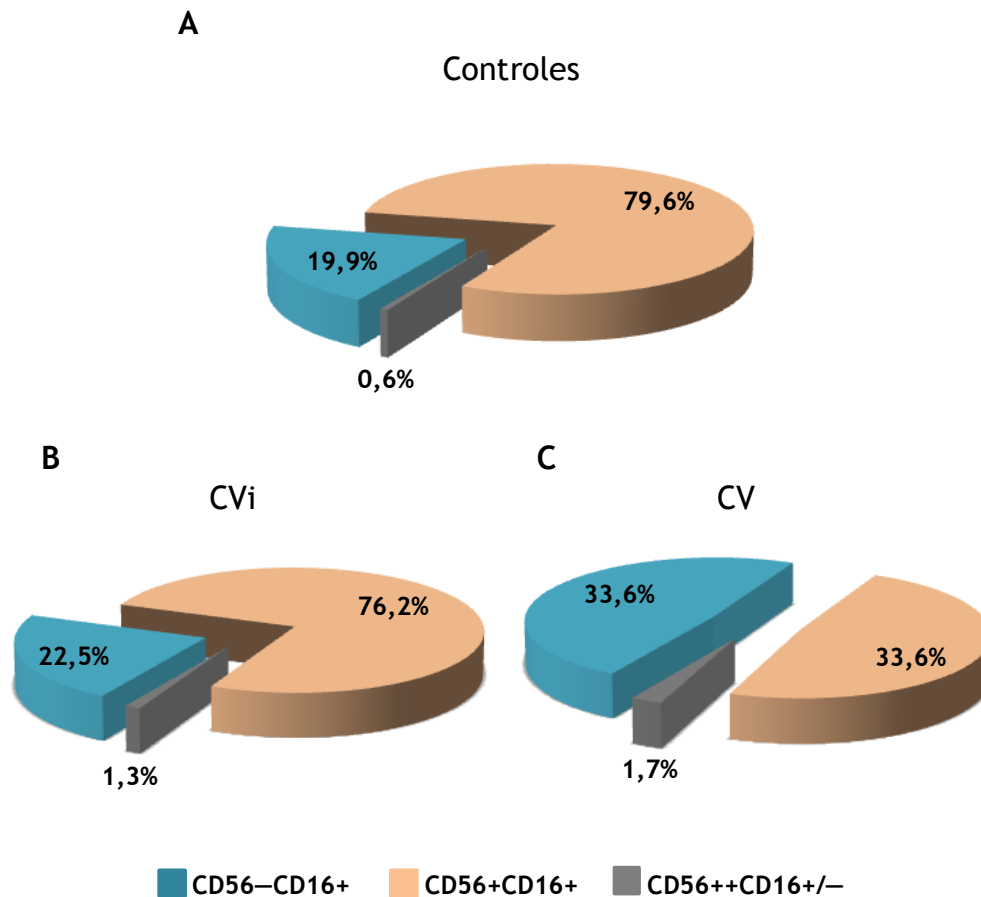
Se analizaron tres sub-poblaciones de NK (CD56<sup>++</sup>CD16<sup>+/-</sup>, CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) que correspondían a subpoblaciones de NK más inmaduras, intermedias y maduras respectivamente. Estas poblaciones se diferencian por la expresión de CD16 y la pérdida de CD56 durante su diferenciación [111, 112] como se muestra en la **Figura 38**.



**Figura 38.** Identificación de las Subpoblaciones de células NK. El *dot plot* muestra tres sub-poblaciones (CD56<sup>++</sup>CD16<sup>+/-</sup>, CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) de células NK (CD3<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>) según la expresión de los marcadores CD56 y CD16.

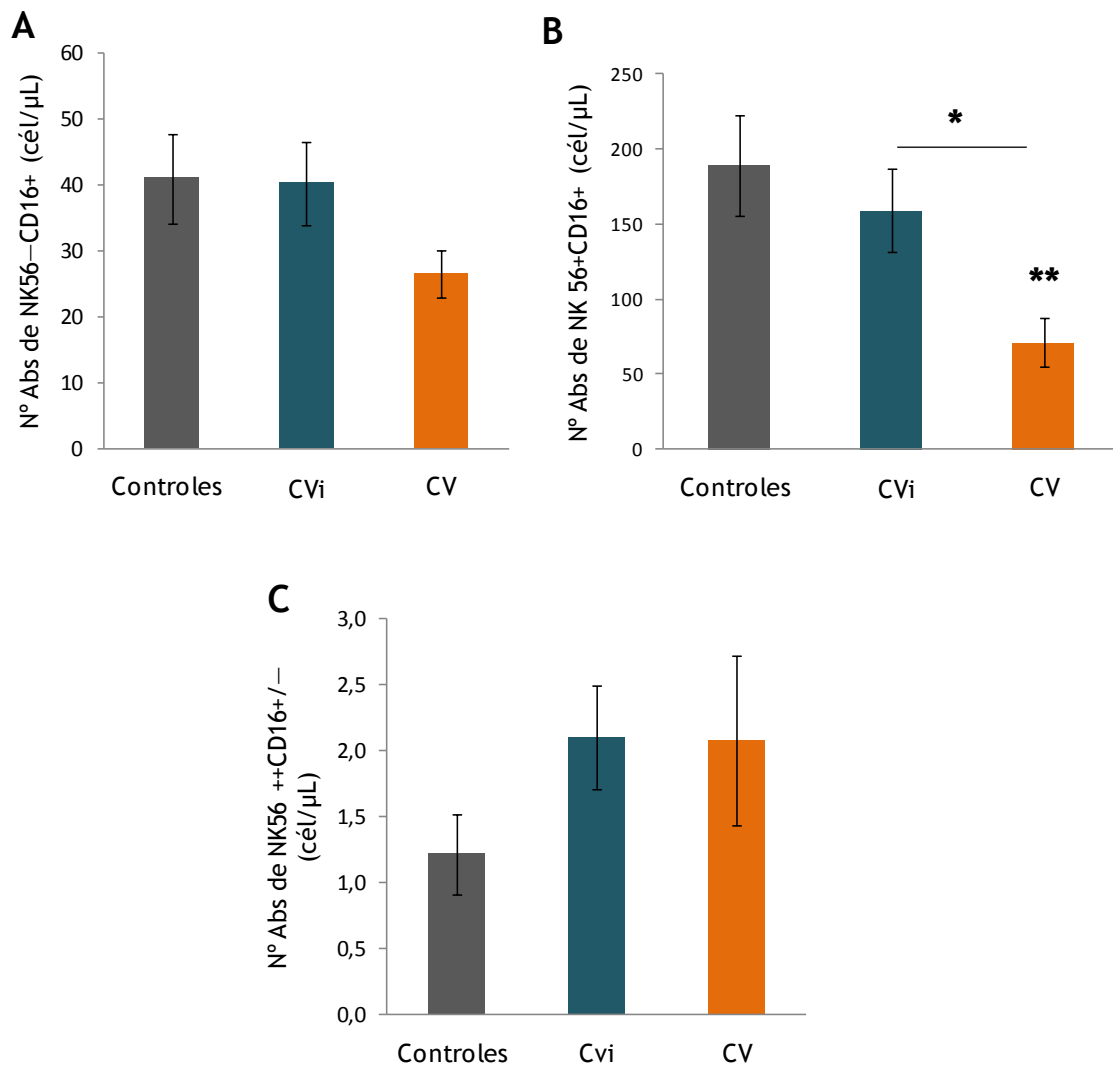
El porcentaje de CD56<sup>++</sup>CD16<sup>+/-</sup> (NK inmaduras) fue significativamente mayor en el grupo CVi comparado con el grupo control ( $p=0,041$ ), no se encontraron diferencias entre el grupo CV y el grupo control ( $p=0,166$ ), ni entre los 2 grupos de individuos VIH+ ( $p=0,428$ ) (**Figura 39B, 39D**). Se observó un menor porcentaje de células CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> en el grupo con CV comparado con el grupo control ( $p=0,010$ ) y con el grupo CVi ( $p=0,055$ ), y no se encontraron diferencias entre el grupo CVi y el grupo control ( $p=0,345$ ). El porcentaje de células CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> (NK maduras) fue mayor en el grupo CV

que en el grupo CVi ( $p= 0,039$ ) y el grupo control ( $p= 0,017$ ), como se observa en las figuras 39B, 39D.



**Figura 39.** Porcentaje de las sub-poblaciones de NK. Las gráficas representan el porcentaje observado de células NK CD56++CD16+/- , CD56+CD16+ y CD56-CD16+ presentes en el grupo control (A), en el grupo CVi (B), y el grupo CV (C).

Por otra parte, cuando se analizó el número absoluto de las sub-poblaciones de células NK no se encontraron diferencias significativas en el número absoluto de la población celular CD56-CD16+ entre los tres grupos ( $p > 0.05$ ). El número absoluto de CD56+CD16+ fue menor en el grupo CV que en el grupo CVi ( $p= 0,015$ ) y que el grupo control ( $p= 0,004$ ) (Figura 40B). En cuanto a la población CD56++CD16+/- , no se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 40A, 40C).

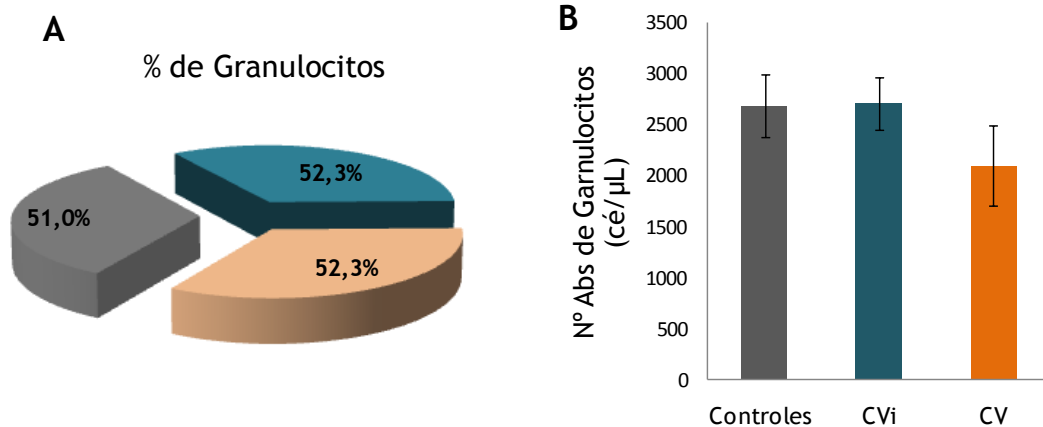


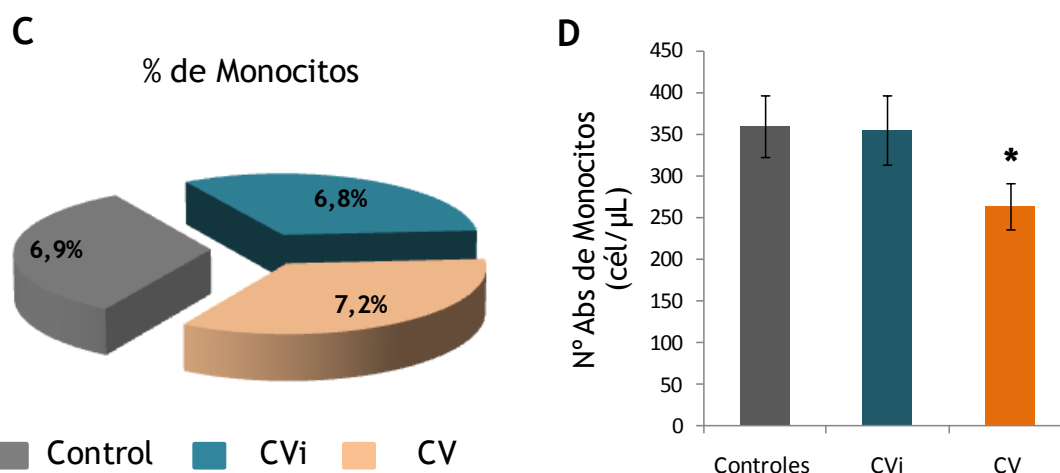
**Figura 40.** Número absoluto de sub-poblaciones NK. Las gráficas representan la media  $\pm$  EEM del número absoluto (cél/ $\mu$ L) de células NK56-CD16+(A), NK56+ CD16+ (B) y NK56++CD16+/- (C) presentes en el grupo CVi, el grupo CV y el grupo control. \*:  $p < 0,05$  y \*\*:  $p < 0,01$  en el *test* U de *Mann-Whitney*.

#### 4.2.5 Valores de granulocitos y monocitos en pacientes infectados

Algunos estudios proponen que los valores de la población de monocitos podrían ser utilizados como marcadores de progresión de la infección por VIH [113]. Por otro lado, también se ha descrito una correlación entre el porcentaje de granulocitos en individuos VIH+ y otros marcadores asociados a una mayor severidad de la infección por el VIH (número absoluto de células T CD4 y carga viral) [114].

En este estudio se determinaron los valores de número absoluto y porcentaje de granulocitos y monocitos presentes en los tres grupos. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias significativas en el número absoluto de monocitos entre el grupo CV y el grupo control, siendo menor en el grupo CV que en el grupo control ( $p= 0,037$ ) (**Figura 41D**). No se observaron diferencias en el porcentaje de monocitos y granulocitos ni en el número absoluto de granulocitos entre los 3 grupos ( $p > 0,05$ ) (**Figura 41A, 41C**).





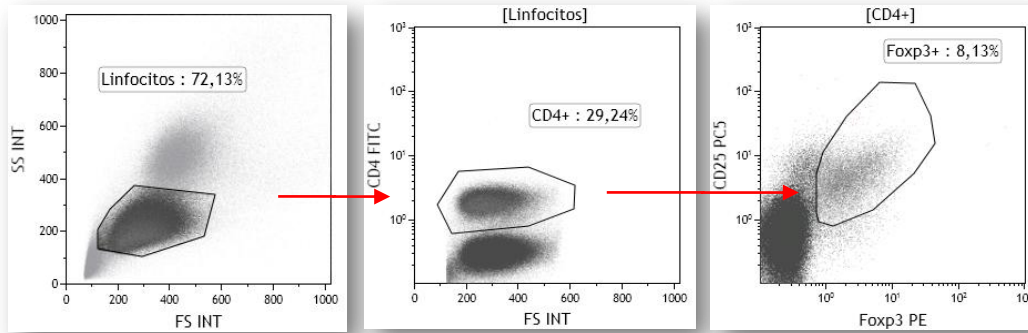
**Figura 41. Valores de granulocitos y monocitos en los tres grupos de estudio.** Las gráficas representan el porcentaje de los granulocitos (A) y monocitos (C) y la Media±EEM del número absoluto (cél/μL) de granulocitos (B) y monocitos (D) en el grupo CVi y el grupo CV, comparados con el grupo control. \*:  $p < 0,05$  en el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

#### 4.2.6. Recuento y fenotipo de células Treg en pacientes infectados

A la vista de los resultados obtenidos *in vitro*, uno de los objetivos de esta Memoria fue investigar el efecto de la infección por el VIH-1 en las células Treg de individuos VIH+. Se compararon las características fenotípicas y funcionales de las células Treg en los dos grupos de pacientes infectados con las características de las células Treg del grupo control.

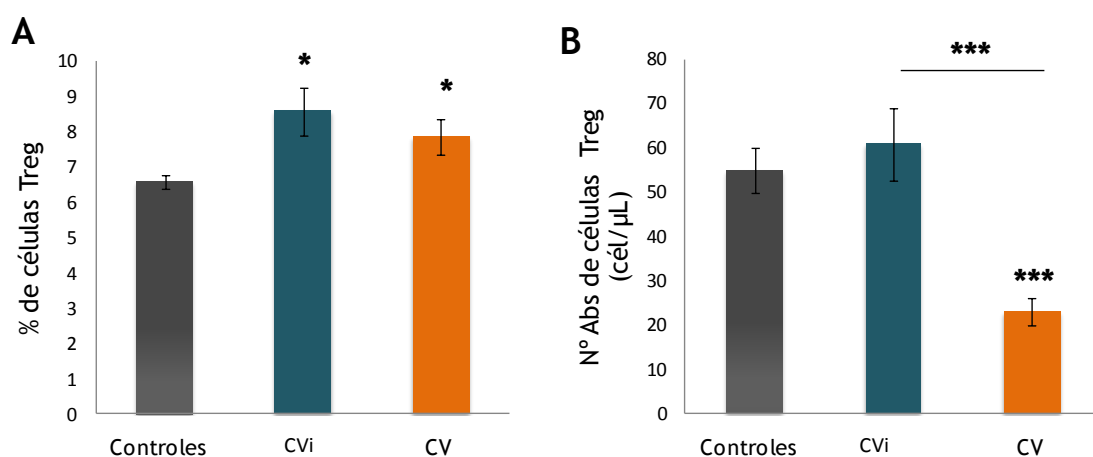
##### 4.2.6.1. Los individuos VIH+ presentan alteraciones en la frecuencia y número absoluto de células Treg.

Primero se identificaron las células Treg por citometría de flujo mediante la expresión de los marcadores CD25 y Foxp3 en la población de células T CD4+ seleccionadas en el total de linfocitos (Figura 42) en los grupos de pacientes infectados por el VIH (CVi:  $n = 13$ ; CV:  $n = 11$ ) y el grupo control ( $n = 12$ ).



**Figura 42. Proceso de identificación de las células Treg.** Los *dot plots* muestran la estrategia de identificación mediante citometría de flujo de las células Treg por la expresión de CD25 y Foxp3 dentro de la población de linfocitos T CD4.

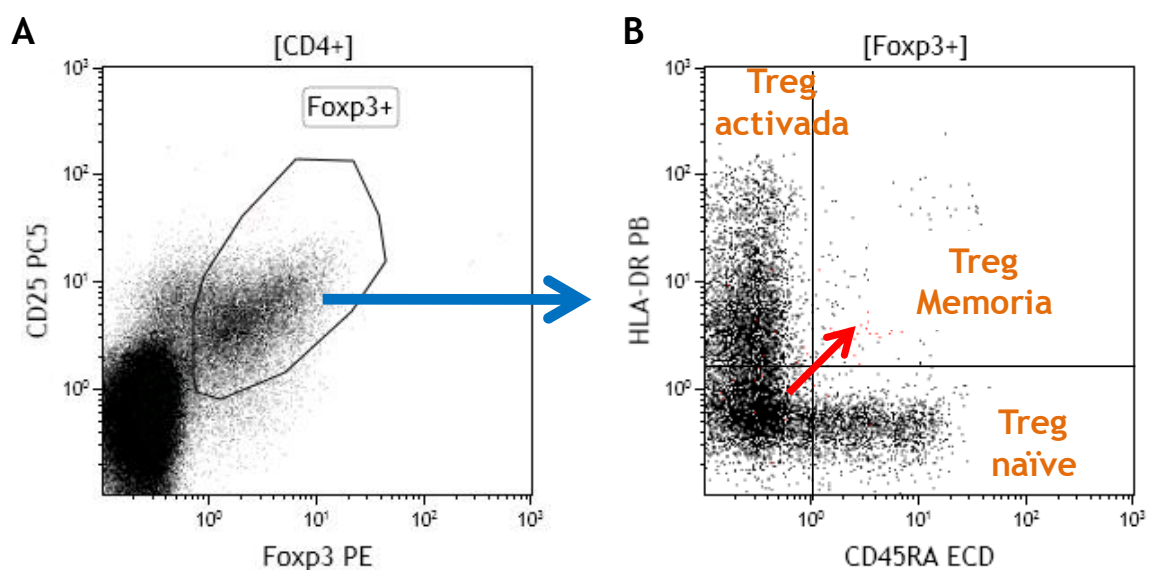
Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo del porcentaje de células Treg Foxp3+CD25+ en los individuos VIH+ con respecto al grupo control (CVi:  $p=0,023$ ; CV:  $p=0,048$ ) (Figura 43A). El número absoluto de células Treg del grupo CVi fue similar al observado en el grupo control ( $p=0,580$ ). Sin embargo, el grupo CV mostró un número absoluto de células Treg muy inferior al grupo control ( $p=0,000$ ) y el grupo CVi ( $p=0,000$ ) (Figura 43B).



**Figura 43. Valores de células Treg en pacientes infectados.** Las gráficas presentan la Media±EEM del porcentaje (B) y el número absoluto (cél/μL) (C) de células Treg Foxp3+CD25+ presentes en el grupo CVi, el grupo CV y el grupo control. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  y \*\*\*:  $p < 0,001$  en el *test* no paramétrico de U Mann-Whitney.

#### 4.2.6.2. La presencia de VIH afecta al fenotipo de las células Treg en individuos VIH+.

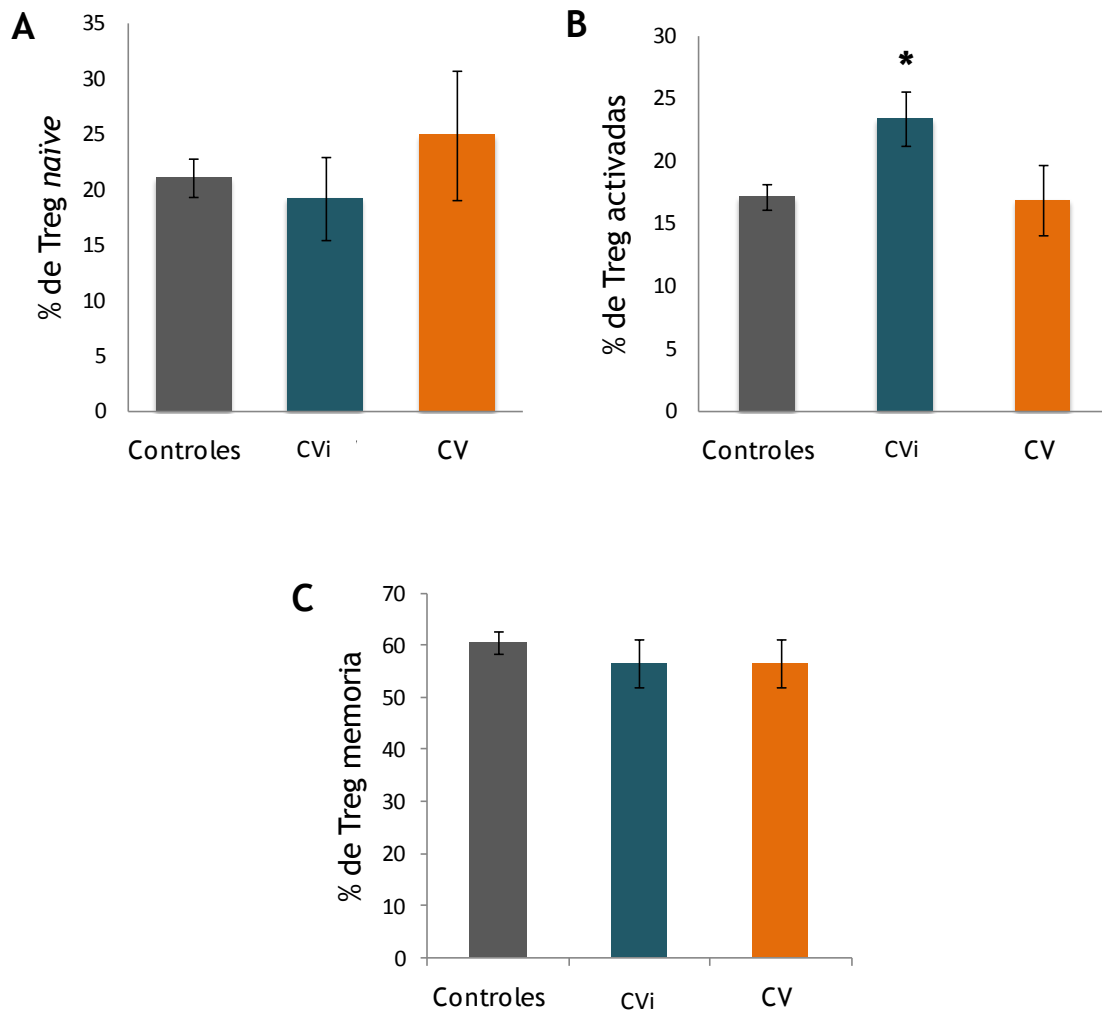
Se identificaron las Treg con fenotipo *naïve* analizando la expresión de CD45RA (Treg *naïve*), y las células con fenotipo activado se identificaron por la expresión de HLA-DR (Treg activadas). Además, se identificó una tercera población de células Treg CD45RA–HLA-DR– (Figura 44). Esta población Treg CD45RA–HLA-DR– tiene menos capacidad supresora que las Treg HLA-DR+ [115] y podría corresponder con un fenotipo memoria (Treg memoria).



**Figura 44.** Estrategia para la identificación de las subpoblaciones de células Treg. Se muestran *dot plots* de un donante representativo. **(A)** identificación de células Treg Fcγ3+CD25+. **(B)** Análisis de células Treg *naïve* (CD45RA+), activadas (HLA-DR+) o memoria (CD45RA–HLA-DR–) dentro de las Treg (Fcγ3+CD25+).

En cuanto a la proporción de las distintas subpoblaciones, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células Treg *naïve* entre los distintos grupos (Figura 45A). El porcentaje de células Treg activadas en el grupo CVi fue significativamente mayor que en el grupo control ( $p= 0,019$ ) (Figura 45B). El porcentaje de células Treg memoria no mostró diferencias entre los 3 grupos estudiados ( $p> 0,05$ ) (Figura 45C).

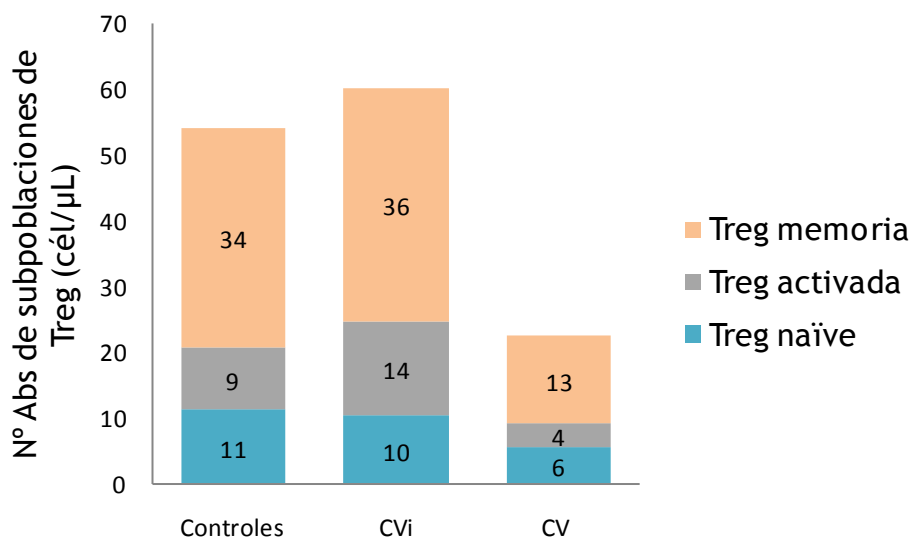




**Figura 45. Porcentaje de las subpoblaciones de células Treg de los tres grupos de estudio.** Las gráficas representan la Media±EEM de los porcentajes de células Treg *naïve* (A), Treg activadas (B) y Treg memoria (C) en el total de Treg, presentes en el grupo CVi, el grupo CV y el grupo control. \*:  $p < 0,05$  en el *test* no paramétrico U de Mann-Whitney.

Sin embargo, al analizar el número absoluto de células Treg observó que en presencia del VIH (grupo CV) todas las subpoblaciones estaban disminuidas de forma marcada ( $p < 0,05$ ). El valor absoluto de Treg *naïve* fue significativamente menor en el grupo CV comparado con el grupo CVi ( $p = 0,041$ ) y el grupo control ( $p = 0,008$ ) (Figura 46). También el número absoluto de células Treg activadas fue significativamente menor en el grupo CV que en el grupo CVi ( $p = 0,000$ ) y el grupo control ( $p = 0,000$ ), al igual que para las

Treg memoria que estaban disminuidas de forma significativa en el grupo CV comparado con el grupo CVi ( $p=0,003$ ) y el grupo control ( $p= 0,001$ ) (Figura 46). No se observaron diferencias significativas entre los grupos CVi y control en los valores absolutos de las distintas subpoblaciones de Treg ( $p>0,05$ ).



**Figura 46.** Números absolutos de subpoblaciones de células Treg en los tres grupos de estudio. La gráfica muestra la Media±EEM del número absoluto (cél/μL) de cada subpoblación de células Treg (*naïve*, activadas, memoria) presentes en el grupo CVi, el grupo CV y el grupo control.

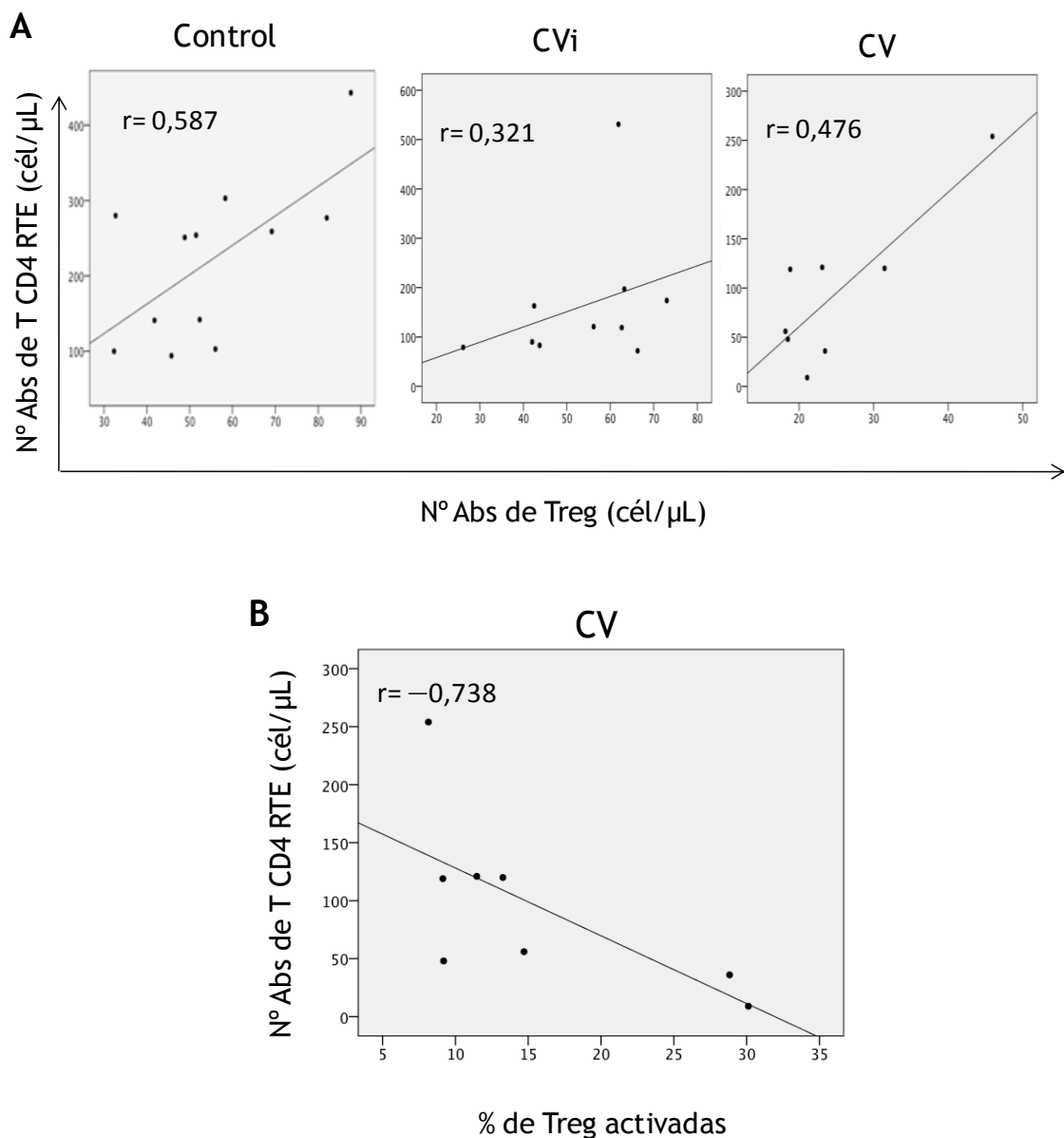
Los resultados indican que la proporción de células Treg es mayor en individuos infectados por el VIH que en controles y que este aumento podría deberse a la mayor depleción de otras subpoblaciones de células CD4 como las células activadas. Sin embargo, en presencia del VIH los individuos con CV alta tienen un número absoluto de células Treg totales bajo (Figura 43C) y también un número absoluto inferior de las distintas subpoblaciones de células Treg comparado con los individuos con CVi indetectable o con el grupo control. La depleción de células Treg en los individuos con CV alta podría explicarse por el efecto observado *in vitro* de la infección directa de las células Treg por el VIH. En cambio, el grupo con CVi tiene unos valores de Treg absolutos comparables a los del grupo control.

#### 4.2.7. Posibles mecanismos involucrados en la deficiencia de células Treg en individuos VIH+

Como sea descrito en el apartado anterior, la presencia de VIH en los individuos VIH+ se asocia con una deficiencia en la cantidad de células Treg. Esta deficiencia se podría deber a alguno de los mecanismos siguientes que no son excluyentes: i) una disminución de la producción tímica de células T que incluiría a las células Treg; ii) a la depleción de células Treg por acción directa del VIH; iii) a deficiencias en los mecanismos de homeostasis responsables de la supervivencia o expansión de Treg en condiciones de activación para compensar el incremento de células activadas.

##### 4.2.7.1. Alteraciones en la producción tímica de células T como posible mecanismo de la deficiencia de Treg

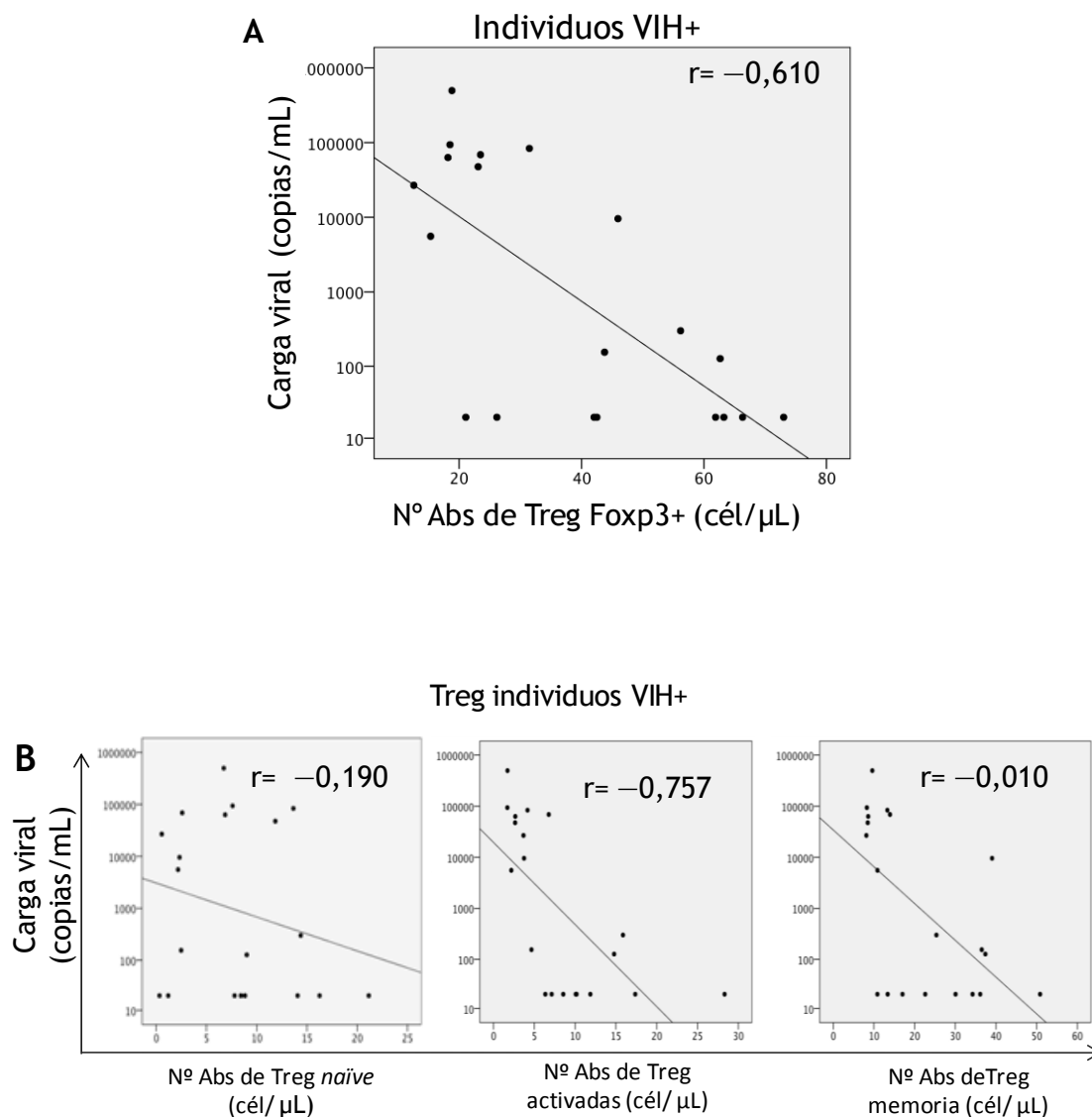
Como se ha mencionado previamente las células T CD4 CD31+ o RTE constituyen un marcador de producción tímica de nuevas células T, que incluye a las Treg. En el grupo control se observó una correlación directa entre el número absoluto de Treg y la cantidad de células T CD4 RTE. Por lo tanto, a mayor producción de células CD4 por parte del timo mayor número de células Treg ( $r= 0,587$ ,  $p= 0,045$ ) (**Figura 47A**). Sin embargo, en ambos grupos de individuos VIH+, e independientemente de la CV, se observó una pérdida de correlación entre células T CD4 RTE y Treg se perdía (CVi:  $r= 0,321$ ,  $p= 0,365$ ; CV:  $r= 0,476$ ,  $p= 0,233$ ) (**Figura 47A**). Estos resultados podrían ser debidos a que en los pacientes infectados por el VIH la producción tímica puede estar disminuida (**Figura 29B**). De hecho, en el grupo con CV, cuanto menor es la producción de células T CD4 RTE (o producción tímica) mayor es el porcentaje de células Treg activadas ( $r= -0,738$ ,  $p= 0,037$ ) (**Figura 47B**). Estos datos podrían reflejar una expansión e inducción periférica de células Treg, para compensar la falta de producción de células por parte del timo.



**Figura 47.** Correlación entre la producción tímica de células T y el número de células Treg. **(A)** Las gráficas muestran la correlación entre el número absoluto (cél/ $\mu$ L) de CD4 RTE y el número absoluto de células Treg en los tres grupos. **(B)** Se muestra la correlación entre el número absoluto de células T CD4 RTE y el porcentaje de células Treg activadas en el grupo CV. La correlación se calculó utilizando el *test* de correlación de *Pearson*.

#### 4.2.7.2. Efecto de la carga viral en el número absoluto de Treg en individuos VIH+

Otro mecanismo que podría estar detrás de la deficiencia de células Treg en individuos VIH+ es el efecto directo de la infección por el VIH en estas células. En los resultados presentados en el **apartado 4.1** de esta Memoria se mostró que la infección *in vitro* de Treg por VIH inducía una pérdida de la expresión de Foxp3, y además esta disminución era proporcional a la concentración de VIH que se añadiera al cultivo celular. Por lo tanto, la cantidad de VIH circulante en los pacientes podría afectar a la cantidad de células Treg, identificadas por la expresión de Foxp3. Se analizó la correlación entre la CV en el momento de obtención de la muestra y el número absoluto de células Treg en el total de individuos VIH+. Los resultados mostraron una correlación negativa entre la CV y el número absoluto de Treg ( $r = -0,610$ ,  $p = 0,004$ ), (**Figura 48A**). También se analizó la correlación entre la CV y las distintas sub-poblaciones de células Treg, y se observó una correlación negativa entre la CV y el valor absoluto de células Treg activadas ( $r = -0,757$ ,  $p = 0,000$ ) y memoria ( $r = -0,560$ ,  $p = 0,010$ ), pero no hubo correlación con las Treg *naïve* ( $r = -0,190$ ,  $p = 0,423$ ) (**Figura 48B**). Posiblemente, este resultado se deba a que el VIH infecta solo a células activadas y no a células *naïve*. Por lo tanto, al igual que un linfocito T CD4 *naïve* no se infecta por el VIH, las células Treg *naïve* serían menos susceptibles a la infección. Siendo por lo tanto, la población de células Treg activadas la que se vería más afectada por la cantidad de VIH circulante.

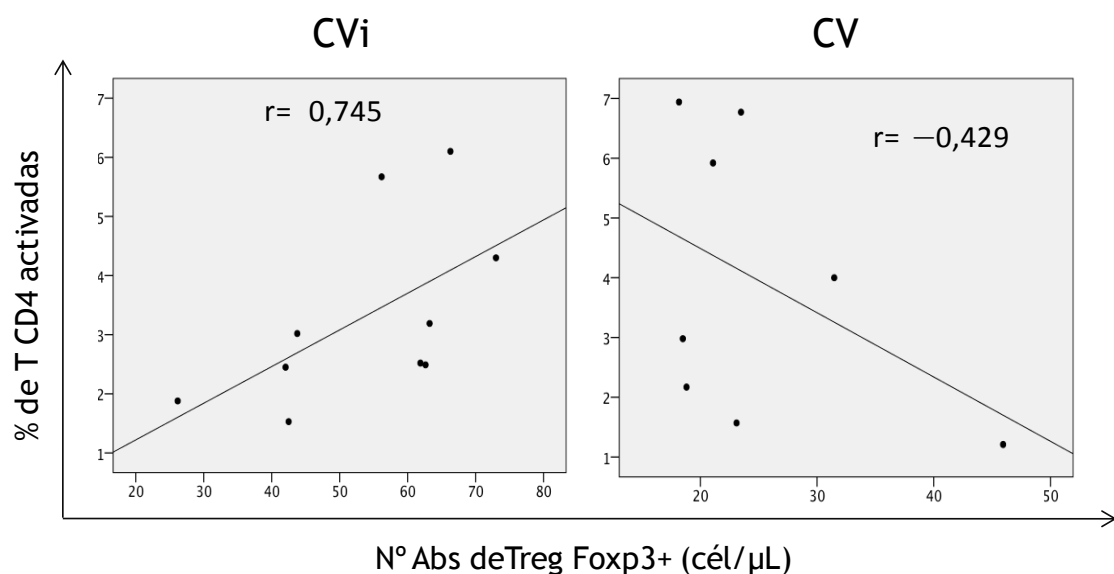


**Figura 48. Correlación entre la carga viral y el número de células Treg.** La CV se correlaciona negativamente con el número absoluto de células Treg Foxp3+ en individuos VIH+ (A). Las gráficas muestran la correlación entre la CV y el valor absoluto (cél/ $\mu$ L) de las distintas subpoblaciones de células Treg en individuos VIH+ (B). La correlación se calculó mediante el *test* de correlación de *Pearson*.

#### 4.2.7.3. Equilibrio entre la cantidad de células Treg y la proporción de células activadas en individuos VIH+

Otro mecanismo que podría contribuir a la expansión de células Treg en los individuos VIH+ es la presencia de células T CD4+ activadas. Normalmente,

cuando hay un aumento en la proporción de células T CD4 activadas se induce en paralelo, un aumento de células Treg con el fin de que las células Treg mantengan bajo control su expansión. En el grupo control, no se observó correlación entre el porcentaje de células T CD4 activadas y el número de células Treg, debido probablemente a que se encuentran en equilibrio inmunológico homeostático. De hecho la proporción de células activadas en los individuos sanos fue inferior a la observada en VIH+. Por el contrario, en el grupo CVi el aumento de células T CD4 activadas por la presencia del VIH induce un aumento en el número de células Treg ( $r= 0,745$ ,  $p= 0,013$ ). Es decir, cuanto mayor fue la proporción de células T CD4 activadas mayor número de células Treg había en circulación. Sin embargo, fue interesante observar que en el grupo con CV alta este equilibrio entre las células T CD4 activadas y las Treg estaba roto ( $r= -0,429$ ,  $p= 0,289$ ) (**Figura 49**). Estos datos indican que en presencia del VIH estos individuos VIH+ no son capaces de aumentar el número de células Treg en respuesta a un aumento de las células T CD4 activadas.



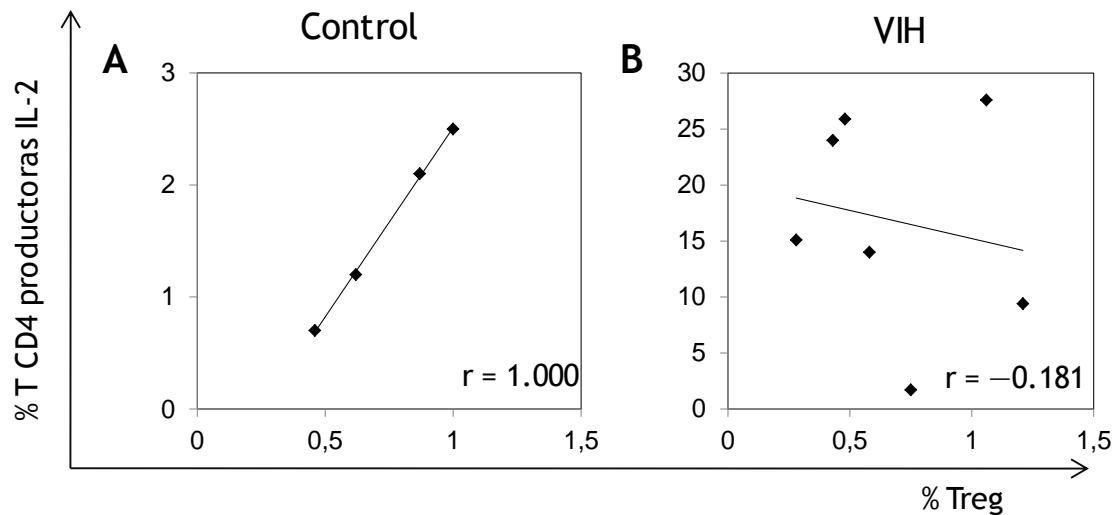
**Figura 49.** Equilibrio entre la proporción de células T CD4 activadas y la cantidad de Treg en individuos VIH+. Las gráficas muestran la correlación entre el número absoluto de células Treg (cél/µL) y el porcentaje de células T CD4 activadas en el

grupo CVi y el grupo CV. La correlación se calculó usando el *test* de correlación de *Pearson*.

#### **4.2.8. Los individuos infectados por el VIH presentan un desequilibrio entre el número de células Treg y el número de células T CD4 productoras de IL-2**

La homeostasis de la población Treg se regula para mantener un equilibrio con la cantidad de células T CD4 a través de la IL-2 que producen estas últimas, y que favorece la supervivencia y expansión de las Treg [31]. Tras observar que el equilibrio entre Treg y células T CD4 estaba roto en pacientes con CV, se estudió el mecanismo por el cual las Treg no son capaces de reaccionar al aumento de células T CD4 activadas en presencia del virus. Para ello se estudió la relación entre células Treg y células T CD4 productoras de IL-2 en un grupo de 7 individuos VIH+ con CV alta. Los 7 individuos de sexo masculino tenían una Media $\pm$ EEM de edad= 26,7 $\pm$ 1,4, y una carga viral= 117486 $\pm$ 40042 copias/mL. En donantes sanos no-VIH se confirmó que había una correlación directa entre la frecuencia de células Treg y la frecuencia de células T CD4 productoras de IL-2 ( $r= 1,000$ ,  $p < 0,001$ ) [31, 106] (**Figura 50A**). Sin embargo, esta correlación no se observó en los individuos con CV alta ( $r= 0,181$ ;  $p= 0,698$ ), (**Figura 50B**). Es decir, frente al aumento en la proporción de células T CD4 productoras de IL-2 las Treg de pacientes con CV son incapaces de aumentar proporcionalmente.





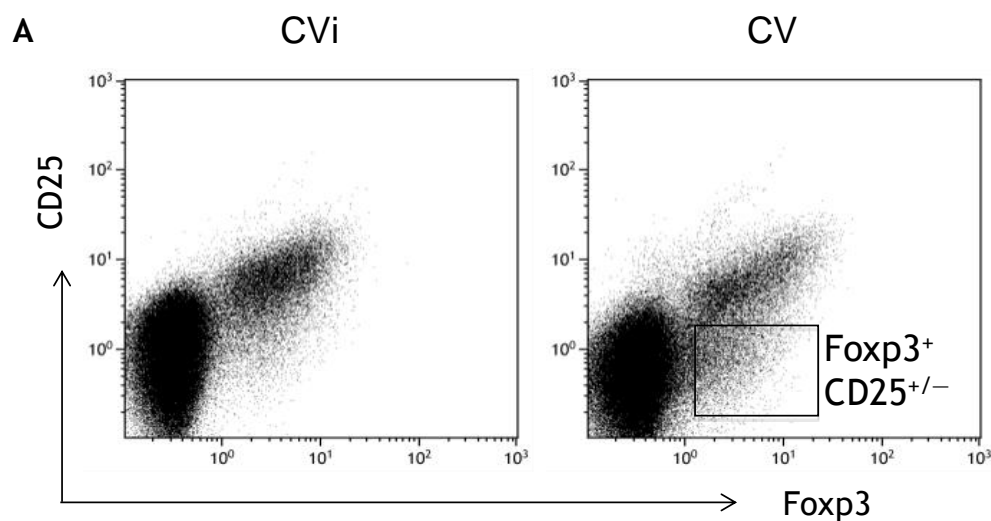
**Figura 50. Equilibrio entre las células Treg y las células T CD4 productoras de IL-2 en pacientes infectados por el VIH.** Se representa la correlación entre la frecuencia de células Treg y la frecuencia linfocitos T CD4 productores de IL-2 en un grupo de individuos sanos ( $n = 4$ ) (A) y un grupo de individuos VIH+ con CV alta ( $n = 7$ ) (B). La correlación se calculó usando el *test* de correlación de *Pearson*.

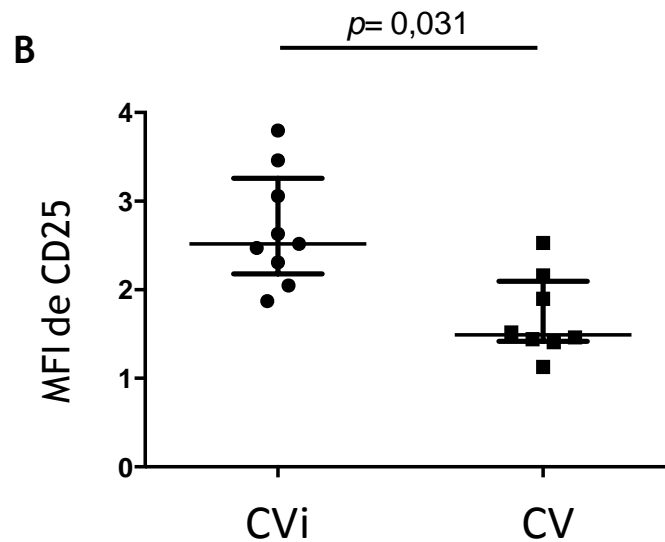
#### 4.2.8.1. Las células Treg de individuos VIH+ presentan una expresión de IL2-R $\alpha$ disminuida.

Se investigó si la falta de respuesta de las células Treg al aumento de células T CD4 productoras de IL-2 podría deberse a una alteración en la expresión del receptor para IL-2 en las células Treg, debido a la infección por el VIH. Para ello, se comparó la expresión del IL2-R $\alpha$  (CD25) en células Treg en presencia y ausencia de CV, estudiando un grupo de 9 individuos VIH+ con CVi y otro grupo de 9 individuos VIH+ con CV alta (Media $\pm$ EEM carga viral = 105325 $\pm$ 57253 copias/mL). No había diferencias entre grupos en cuanto al sexo ( $p = 0,436$ ) y edad (Media $\pm$ EEM: CVi = 44,69 $\pm$ 3,53 años; CV = 34,75 $\pm$ 4,78 años;  $p = 0,136$ ). La mayoría de las células Treg Foxp3+ de los individuos del grupo CVi expresaron CD25 con alta intensidad, similar a lo publicado en donantes sanos [104]. Sin embargo, en individuos VIH+ con alta CV se observó la presencia de una población de células Foxp3+ que expresaban CD25 con una menor intensidad (Foxp3+CD25+/-) (Figura 51A), que no está presente en

individuos del grupo CVi y que no se ha descrito en donantes sanos [104]. De hecho, cuando se determinó la densidad de CD25 en la superficie de las células Treg Fxp3+, mediante el análisis de la MFI, esta fue significativamente menor en el grupo CV que en el grupo CVi ( $p= 0,031$ ), (Figura 51B).

Por tanto, en presencia del virus las Treg de pacientes infectados con CV alta presentan una reducción en la expresión de IL-2-R $\alpha$ , lo cual compromete la capacidad de las células Treg de detectar el aumento de células T activadas a través de IL-2, y de aumentar su número proporcionalmente para mantenerlas bajo control.



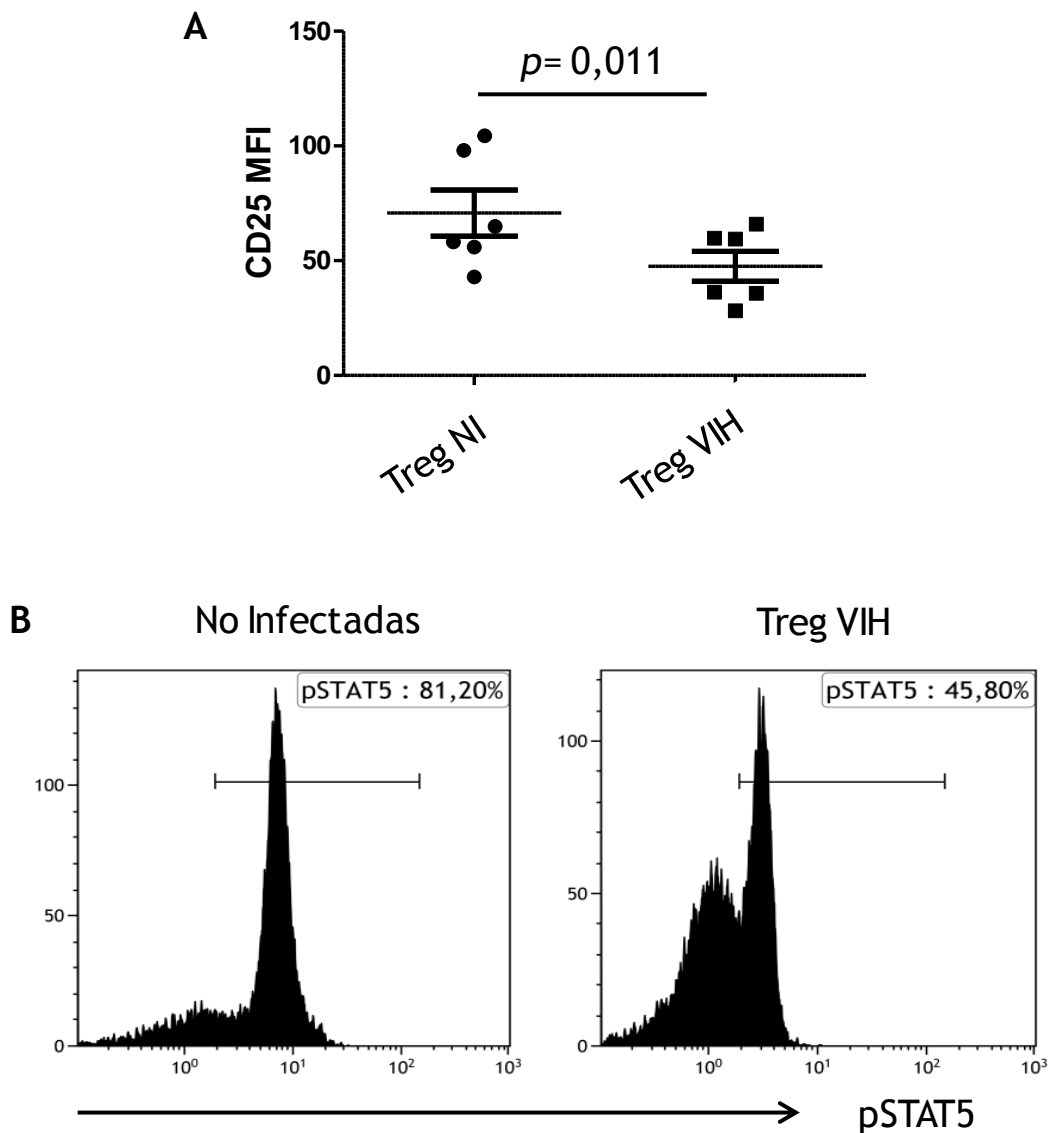


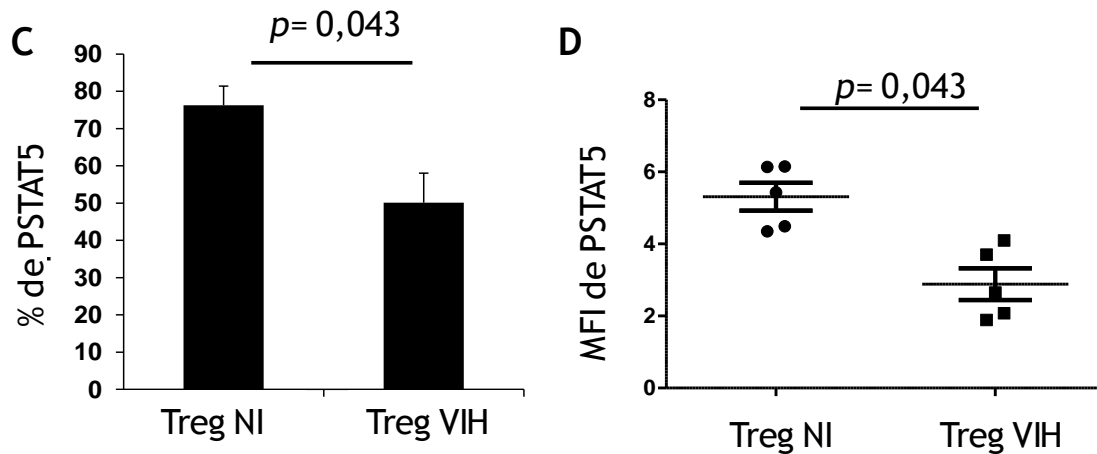
**Figura 51.** Presencia de células Treg Foxp3+CD25+/- en individuos VIH+ con carga viral. **(A)** *Dot plots* de dos pacientes representativos mostrando la presencia de células Treg con baja expresión de CD25 (IL-2-R $\alpha$ ) en el grupo CV que no aparecen en el grupo CVi. **(B)** Se representa la MFI de CD25 en células Treg en el grupo CV y CVi. Las líneas horizontales representan la media $\pm$ EEM de la MFI de CD25. El valor de  $p$  fue obtenido usando el *test* no-paramétrico U de *Mann-Whitney*.

#### 4.2.8.2. La infección *in vitro* de células Treg por el VIH afecta a la expresión de CD25 y la fosforilación de STAT5

Como las células Treg de pacientes con CV alta mostraron una expresión menor de CD25, se estudió si esta disminución se podría deber a un efecto directo del VIH sobre las células Treg. Para determinar si la infección por VIH podría estar modulando la expresión de CD25 en las células Treg, se purificaron células Treg de 6 donantes sanos (Media $\pm$ EEM edad = 33,68 $\pm$ 1,64 años) y se infectaron *in vitro* con el X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> (VIH-X4) (MOI= 0,1). Se confirmó la infección de las Treg midiendo p24gag en el sobrenadante del cultivo. Las células Treg NI y las Treg VIH se cultivaron en presencia de IL-2. Cinco días después de la infección por el VIH se observó una reducción significativa de la densidad de CD25 (MFI) en las células Treg VIH en comparación con la MFI en las células Treg NI ( $p= 0,001$ ) (**Figura 52A**).

La vía de señalización de IL-2 está mediada inicialmente por la activación de JAK1 y JAK3 y la posterior fosforilación de STAT5 [34]. De tal forma que si la alteración en la vía de señalización de IL-2 se debía a una disminución del IL2-R $\alpha$  se debería observar también una disminución en la cantidad de STAT5 fosforilado (pSTAT5) dentro de las Treg. Los resultados confirman que la frecuencia (Figura 52B, 52C) y la densidad (Figura 52D) de pSTAT5 fue significativamente más baja en las células Treg infectadas por el VIH-X4 que en las Treg NI ( $p= 0,043$ ). Estos resultados *in vitro* confirman que la infección directa por VIH sobre las células Treg disminuye la expresión de IL2-R $\alpha$  interfiriendo en la ruta de señalización de la IL-2.



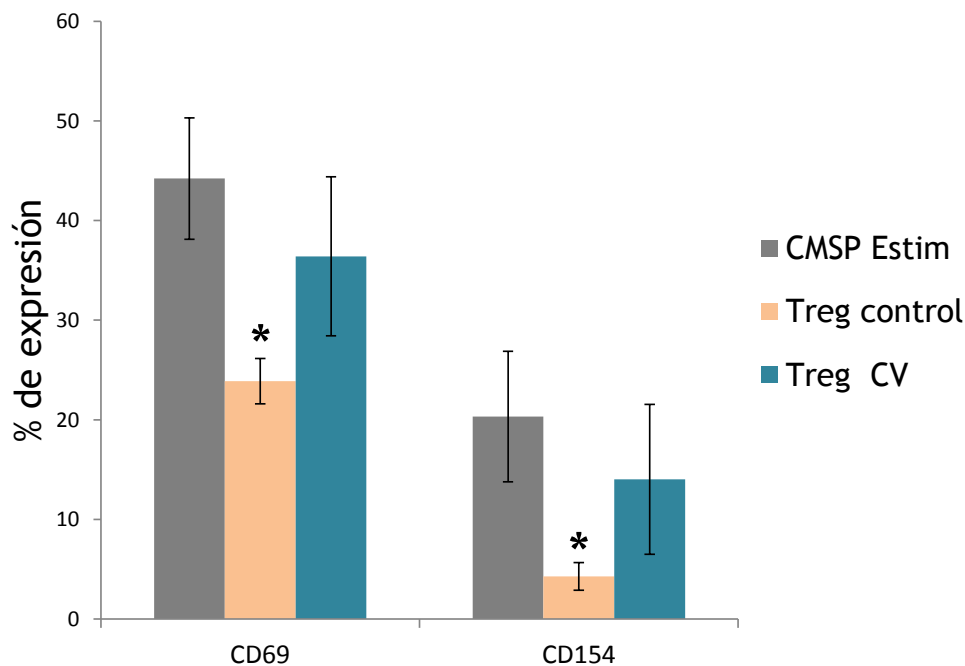


**Figura 52.** La infección por el VIH de células Treg *in vitro* modifica la ruta de señalización de la IL-2. (A) Se muestra la MFI de CD25 en células Treg NI y Treg VIH-X4 a día 5 pos-infección. (B) Histogramas de un donante representativo mostrando la disminución del porcentaje y de la MFI de pSTAT5 en células Treg VIH. Las gráficas representan la frecuencia de expresión (C) y la MFI (D) de pSTAT5 en células Treg NI y Treg VIH. Las líneas horizontales representan la media±EEM. El valor de  $p$  se obtuvo utilizando un *test* no-paramétrico U de *Mann-Whitney*.

#### 4.2.9. Capacidad supresora de las células Treg en pacientes infectados por el VIH.

La funcionalidad de las células Treg depende en gran medida de Foxp3. Dado que los resultados indican que la infección por el VIH afecta a la expresión de esta molécula, es posible que los pacientes infectados por el VIH no sólo tengan una deficiencia en el número de células Treg sino que estas células sean además menos funcionales. Se estudió la capacidad supresora de células Treg purificadas de 4 donantes con CV alta y 3 donantes sanos. Se analizó el grado de activación de las CMSP midiendo la expresión de CD154 y CD69 por citometría de flujo tras 7 h. de cultivo y se determinó como disminuía esta expresión en presencia de las Treg (Figura 53). Los resultados obtenidos muestran que la capacidad supresora de las Treg de individuos VIH+ fue muy inferior a la observada en el grupo control. Las células Treg de individuos sanos inhibieron significativamente la expresión de CD69 ( $p= 0,017$ )

y de CD154 ( $p= 0,017$ ) en las CMSP estimuladas. Sin embargo, las células Treg de los individuos con CV alta no tuvieron ningún efecto significativo sobre la expresión de estos marcadores (CD69:  $p= 0,315$ ; CD154:  $p= 0,230$ ). Esto confirma que las Treg de pacientes infectados tienen una capacidad supresora muy inferior a las Treg de individuos sanos.



**Figura 53. Análisis de la capacidad supresora de las células Treg en pacientes infectados por el VIH.** Las gráficas representan los valores de la media $\pm$ EEM del porcentaje de expresión de los marcadores de activación CD69 y CD154 en CMSP estimuladas solas y en presencia de células Treg de individuos control o individuos VIH+ con CV alta (Treg:CMSP; ratio1:1). \*:  $p < 0,05$  en el *test* no-paramétrico U de Mann-Whitney.

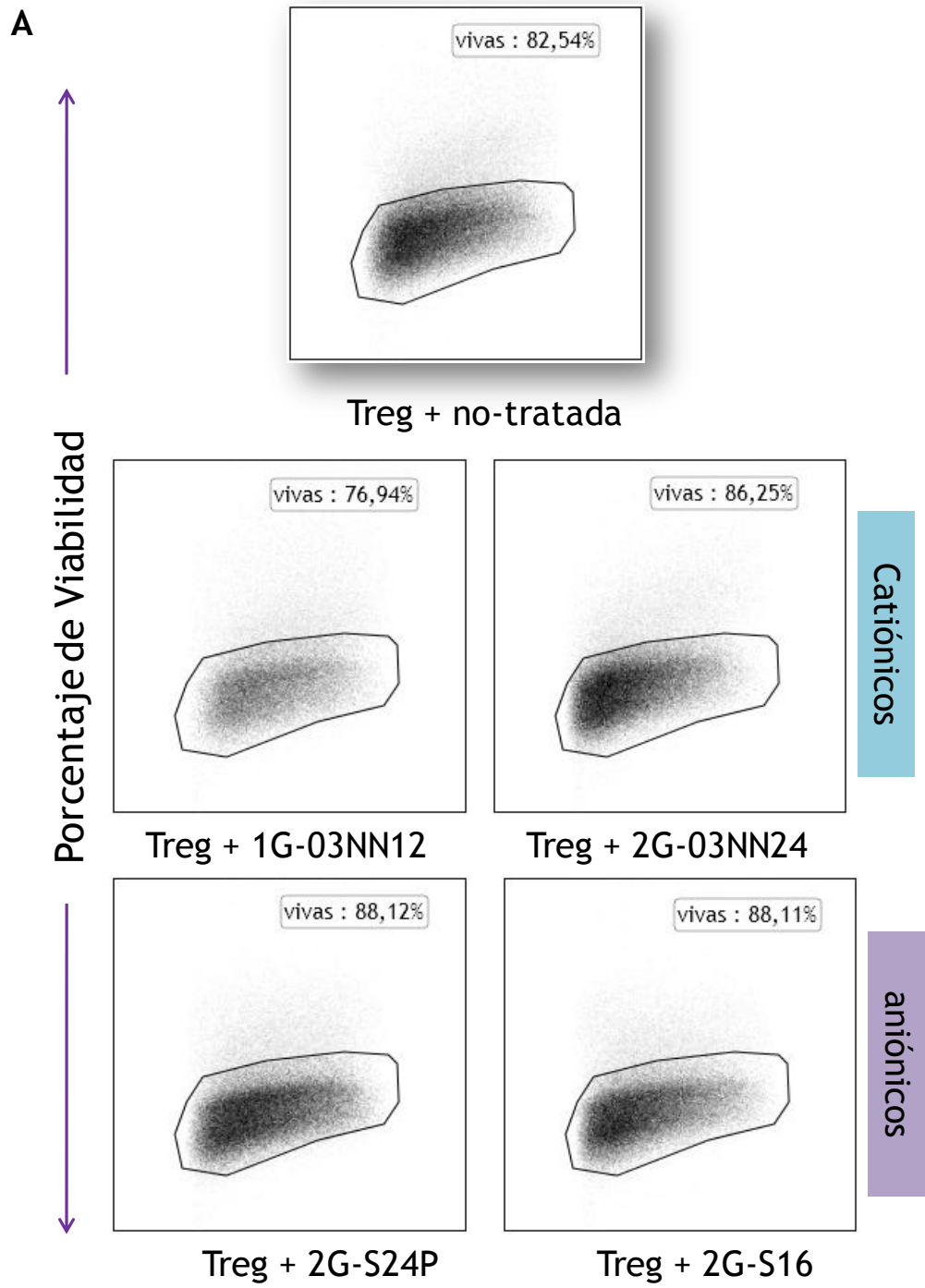
### 4.3. Propiedades antivirales de los dendrímeros carbosilano en células Treg purificadas

En el laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del HGUGM se ha estudiado ampliamente la capacidad de los dendrímeros carbosilano catiónicos como transfectantes, en terapia génica y en vacunas con células

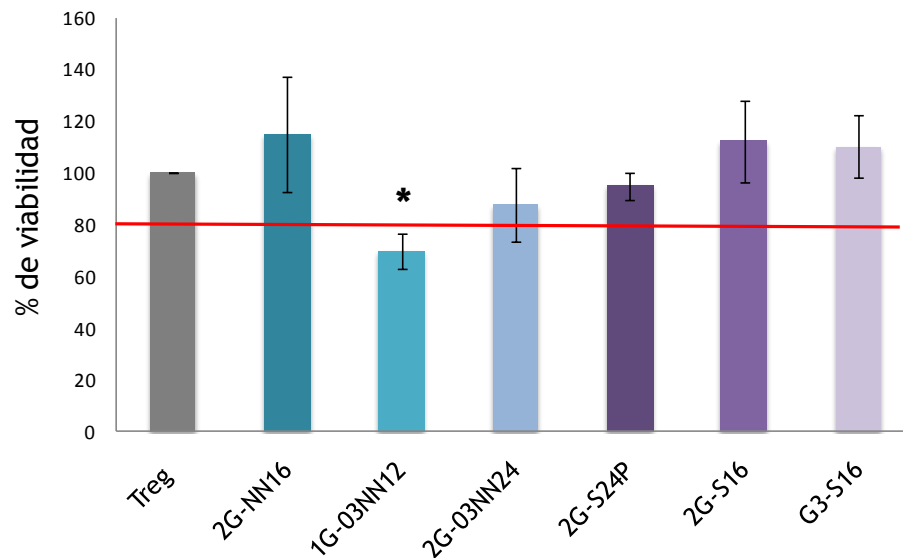
dendríticas [64, 116, 117]. También se ha demostrado la capacidad antiviral de dendrímeros aniónicos en células epiteliales de vagina y se está investigando su uso como microbicidas de uso tópico para la prevención de la infección por el VIH por transmisión sexual [93, 99, 118]. Por otra parte, se ha demostrado que la infección por el VIH afecta al fenotipo y funcionalidad de las células Treg, por lo que se planteó estudiar los dendrímeros carboxilano catiónicos 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 y aniónicos 2G-S24P, 2GS16 y G3-S16 como posibles nanopartículas protectoras frente a la infección por el VIH de las células Treg. En primer lugar se estudió el efecto *per se* de estos dendrímeros sobre la viabilidad, fenotipo y capacidad supresora de las células Treg, y a continuación se analizó si el pretratamiento de las células Treg con dendrímeros aniónicos las protegía de la infección por el VIH y de los efectos que produce sobre su fenotipo y funcionalidad.

#### 4.3.1. Efecto del tratamiento con dendrímeros sobre la viabilidad de las células Treg

Se analizó la viabilidad de las células Treg en presencia de los distintos dendrímeros carboxilano para conocer si el tratamiento con los mismos podría tener un efecto citotóxico. Para ello, se cultivaron durante 48 h células Treg purificadas con dendrímeros carboxilano catiónicos 2G-NN16 (n= 8); 1G-03NN12 (n= 5); 2G-03NN24 (n= 7) a  $5\mu\text{M}$  y los aniónicos 2G-S24P (n= 7); 2G-S16 (n= 5); G3-S16 (n= 4) a  $10\mu\text{M}$ , tras lo cual se analizó la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Los resultados muestran que el porcentaje de células Treg vivas tratadas con los dendrímeros catiónicos 2G-NN16 y 2G-03NN24, y aniónicos 2G-S24P, 2GS16 y G3-S16 eran similares a los observados en las células Treg no-tratadas, siendo la viabilidad  $>80\%$  en todos los casos (**Figura 54A**). Únicamente las células Treg tratadas con el dendrímero 1G-03NN12 presentaron un descenso de viabilidad significativo comparado con las Treg no-tratadas ( $p= 0,043$ ) (**Figura 54B**).







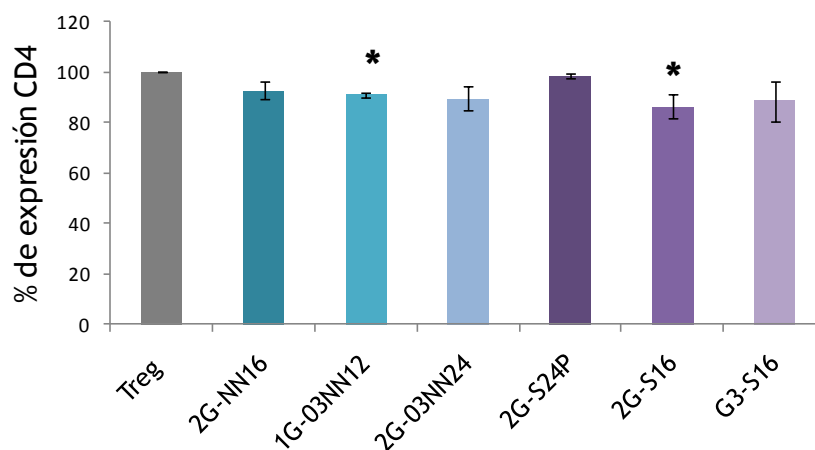
**Figura 54. Viabilidad de las células Treg tratadas con dendrímeros carboxilano catiónicos y aniónicos. (A)** Los *dot plots* son de un donante representativo mostrando el porcentaje de viabilidad de los distintos cultivos de células Treg tratadas con los distintos dendrímeros. **(B)** La gráfica muestra la media±EEM del porcentaje de viabilidad de las células Treg tratadas con los dendrímeros carboxilano catiónicos: 2G-NN16, 1G-03NN1 y 2G-03NN24 a 5µM y con los dendrímeros aniónicos 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16 a 10µM normalizados con el porcentaje de viabilidad de células Treg no tratadas. \*:  $p < 0,05$  en la prueba de *Wilcoxon* para muestras relacionadas.

### 4.3.2. Efecto de los dendrímeros carboxilano sobre el fenotipo de las células Treg

#### 4.3.2.1. Efecto de los dendrímeros carboxilano en la expresión de CD4

Las células Treg son una subpoblación de células T CD4<sup>+</sup> con capacidad supresora. Por lo tanto, se analizó el efecto del tratamiento con dendrímeros carboxilano sobre la expresión de CD4 en la superficie de las células Treg. Se observó una disminución significativa del porcentaje de CD4 expresado en las células Treg tratadas con los dendrímeros 1G03-NN12 y 2G-S16 ( $p = 0,043$ ) en

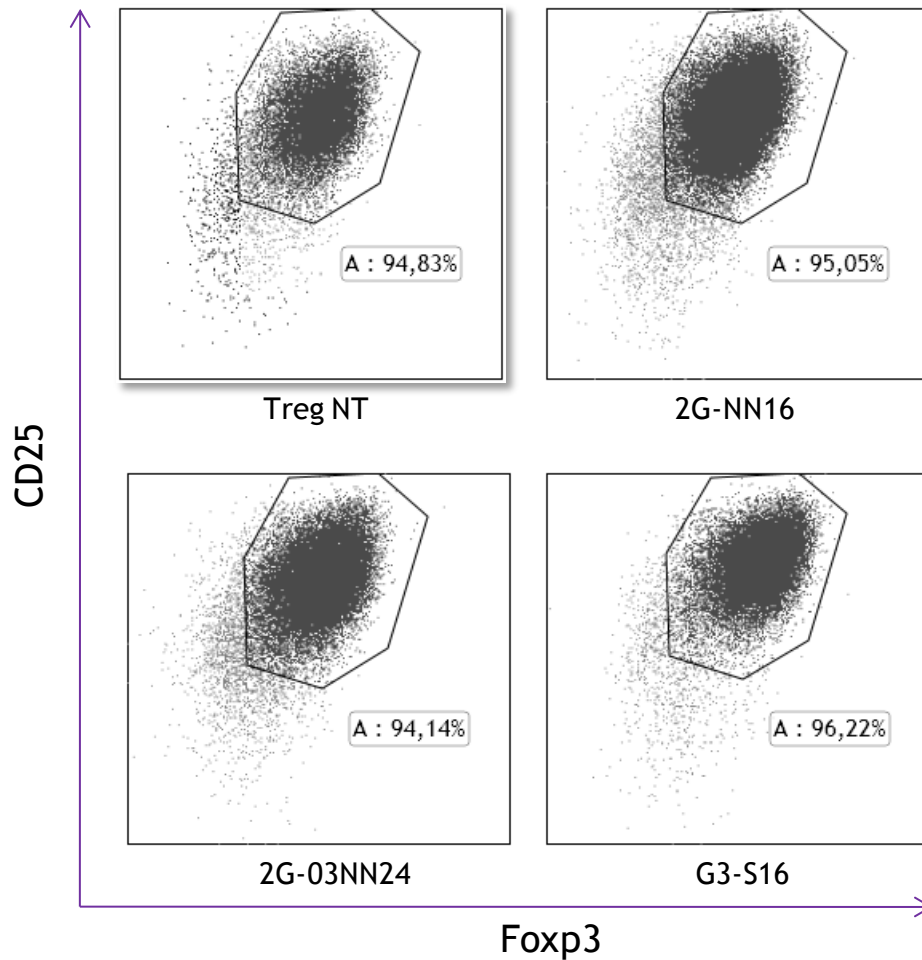
comparación a los resultados obtenidos en las Treg no tratadas. Los demás dendrímeros no tuvieron efecto sobre el porcentaje de CD4 ( $p > 0,05$ ). (Figura 55).



**Figura 55.** Efecto de los dendrímeros carboxilano sobre la expresión de CD4 en células Treg. La gráfica muestra la media±EEM del porcentaje de expresión de CD4 en células Treg tratadas con dendrímeros carboxilano catiónicos 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-03NN24 a  $5\mu\text{M}$  y con dendrímeros aniónicos 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16 a  $10\mu\text{M}$ , normalizados frente a las células Treg no tratadas. \*:  $p < 0,05$  en la prueba de *Wilcoxon* para muestras relacionadas.

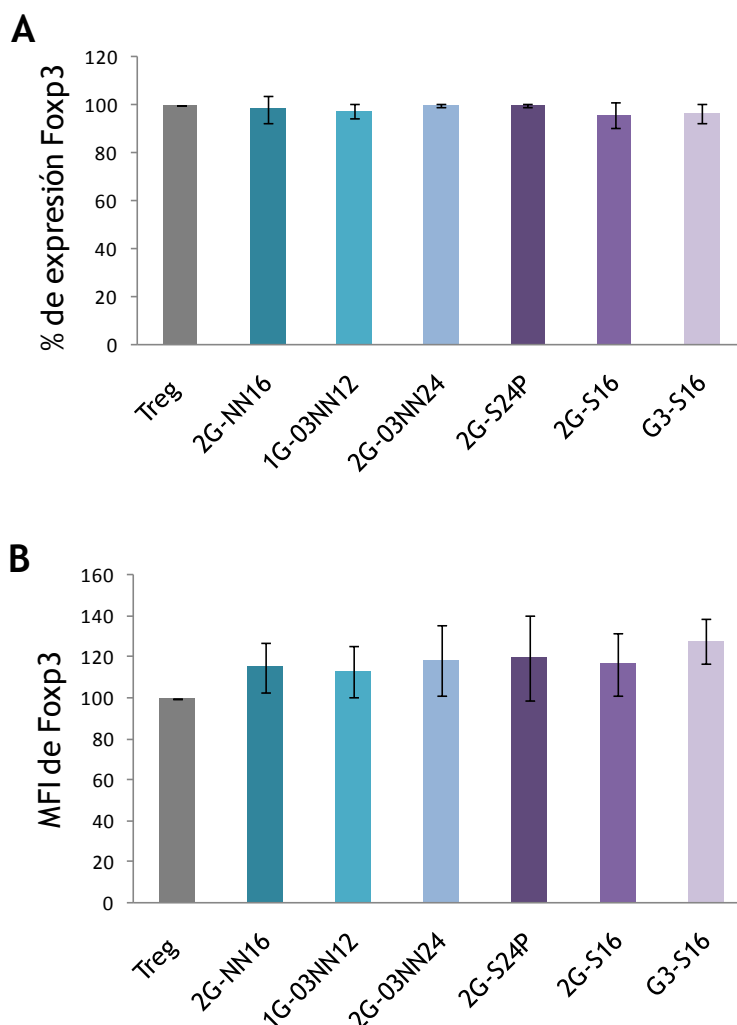
#### 4.3.2.2. Efecto de los dendrímeros carboxilano en la expresión de Foxp3+ en las células Treg

Debido a que la expresión de Foxp3 juega un papel primordial en la funcionalidad de las células Treg [23], se estudió el efecto que podría tener el tratamiento con los dendrímeros carboxilano sobre la expresión de este marcador (Figura 56).



**Figura 56.** Efecto de los dendrímeros carbosilano sobre la expresión de Foxp3 en células Treg. Los *dot plots* muestran el porcentaje de células TregFoxp3+ en los cultivos de células Treg tratadas y no tratadas con los dendrímeros carbosilano catiónicos y aniónicos.

No se encontraron diferencias entre los porcentajes de Foxp3 de células Treg tratadas con los distintos dendrímeros carbosilano y las células Treg no tratadas ( $p > 0,05$ ) (**Figura 57A**). Tampoco se encontraron diferencias en la MFI de Foxp3 entre las células tratadas con los dendrímeros y las células Treg no tratadas ( $p > 0,05$ ) (**Figura 57B**).



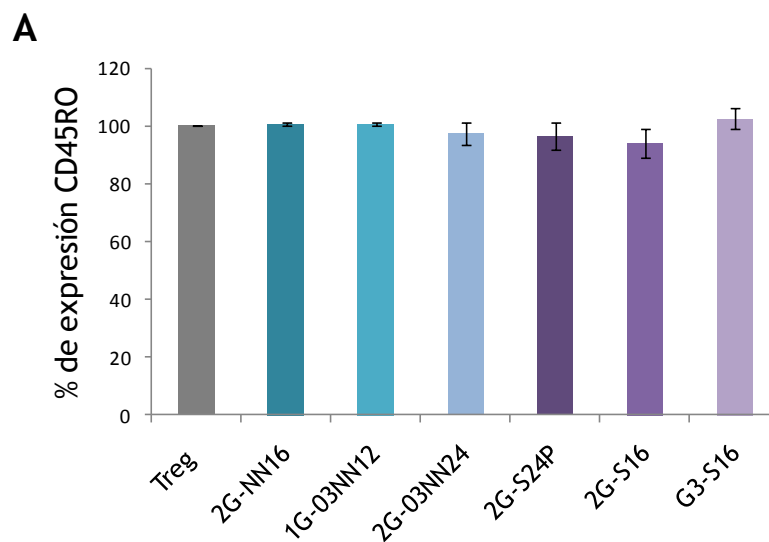
**Figura 57.** Expresión de Foxp3 en células Treg tratadas con dendrímeros carbosilano catiónicos y aniónicos. Las gráficas muestran la media±EEM de los porcentajes de expresión de Foxp3 **(A)** A MFI de Foxp3 **(B)** en las células Treg tratadas con dendrímeros carbosilano catiónicos: 2G-NN16, 1G-03NN24 y 2G-03NN24P y dendrímeros aniónicos: 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16, normalizados frente a células Treg no tratadas. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron utilizando la prueba de *Wilcoxon* para muestras relacionadas.

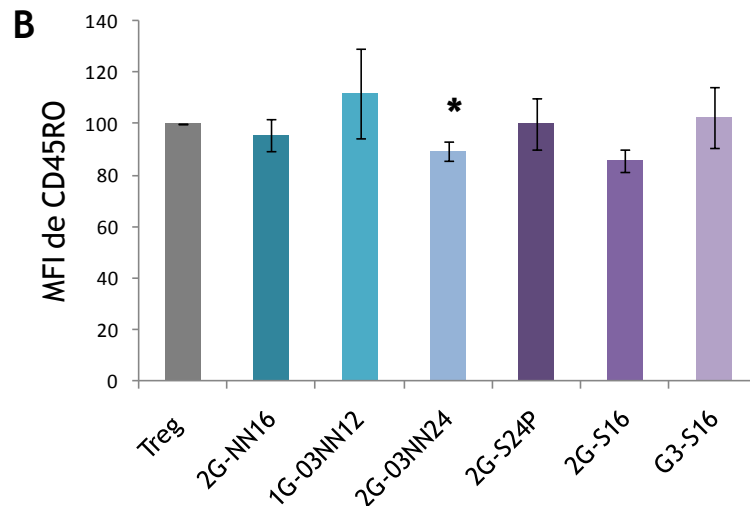
#### 4.3.2.3. Efecto de los dendrímeros carbosilano en la expresión de marcadores de activación y memoria en células Treg

Se analizó el efecto de los dendrímeros carbosilano sobre la expresión de marcadores de activación/memoria (HLA-DR, CD38 y CD45RO) en células Treg, con el objetivo de saber si los dendrímeros carbosilano afectaban a la

capacidad de activación de las células Treg tras la estimulación con anti-CD3/CD28.

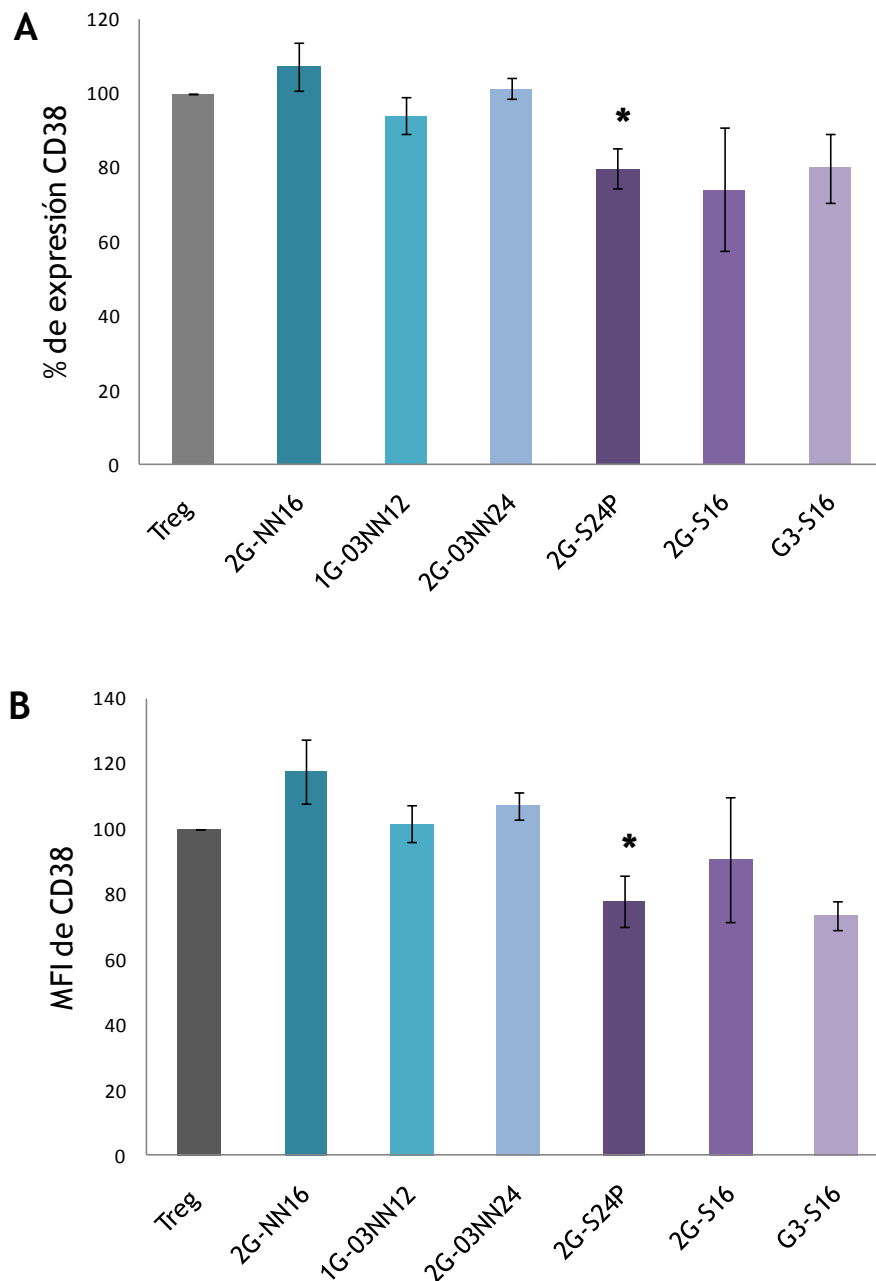
No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de expresión de **CD45RO** de las células Treg tratadas con los dendrímeros 2G-NN16, 1G-03NN12, 2G-03NN24, 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16 comparados con el porcentaje de células Treg no-tratadas ( $p > 0,05$ ) (**Figura 58A**). Sin embargo, las células Treg tratadas con el dendrímero 2G-03NN24 presentaron una disminución significativa en la MFI de CD45RO con respecto a las células Treg no tratadas ( $p = 0,046$ ), que no se observó con el resto de dendrímeros ( $p > 0,05$ ) (**Figura 58B**).





**Figura 58. Expresión de CD45RO en células tratadas con dendrímeros catiónicos y aniónicos.** La gráfica muestra la media±EEM del porcentaje de expresión de CD45RO (A) y MFI de CD45RO (B) de células Treg tratadas con los dendrímeros 2G-NN16, 1G-03NN12, 2G-03NN24, 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16 comparadas con células Treg no tratadas. \*:  $p < 0,05$  en la prueba de *Wilcoxon* para muestras relacionadas.

También se analizaron las diferencias en la **expresión de CD38** en las células Treg tratadas con dendrímeros. Se observó un porcentaje menor significativo ( $p = 0,028$ ) y MFI ( $p = 0,028$ ) de CD38 en las células Treg tratadas con el dendrímero 2G-S24P comparadas con las células Treg no tratadas. Pero no se observó ningún efecto sobre el porcentaje o la MFI de CD38 con los demás dendrímeros ( $p > 0,05$ ) (Figura 59A, 59B).



**Figura 59.** Expresión de CD38 en células tratadas con dendrímeros catiónicos y aniónicos. La gráfica muestra la media±EEM del porcentaje de expresión de CD38 (A) y MFI de CD38 (B) de células Treg tratadas con los dendrímeros 2G-NN16, 1G-03NN12, 2G-03NN24, 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16 normalizo frente a células Treg no tratadas. \*:  $p < 0,05$  en la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas.

El porcentaje de **expresión de HLA-DR** fue similar en la mayoría de las células Treg tratadas con ambos tipos de dendrímeros, catiónicos: 2G-NN16,

1G-03NN12, 2G-03NN24, y aniónicos: 2G-S16 y G3-S16 comparadas con células Treg no tratadas ( $p > 0,05$ ) (Figura 60A). Sólo las células Treg tratadas con el dendrímero aniónico 2G-S24P presentaron un porcentaje de expresión de HLA-DR significativamente mayor comparado con las células Treg no tratadas ( $p = 0,018$ ) (Figura 60A). No se observaron diferencias significativas con ninguno de los dendrímeros carbosilanos en la MFI de HLA-DR entre las células Treg tratadas y no tratadas ( $p > 0,05$ ) (Figura 60B).

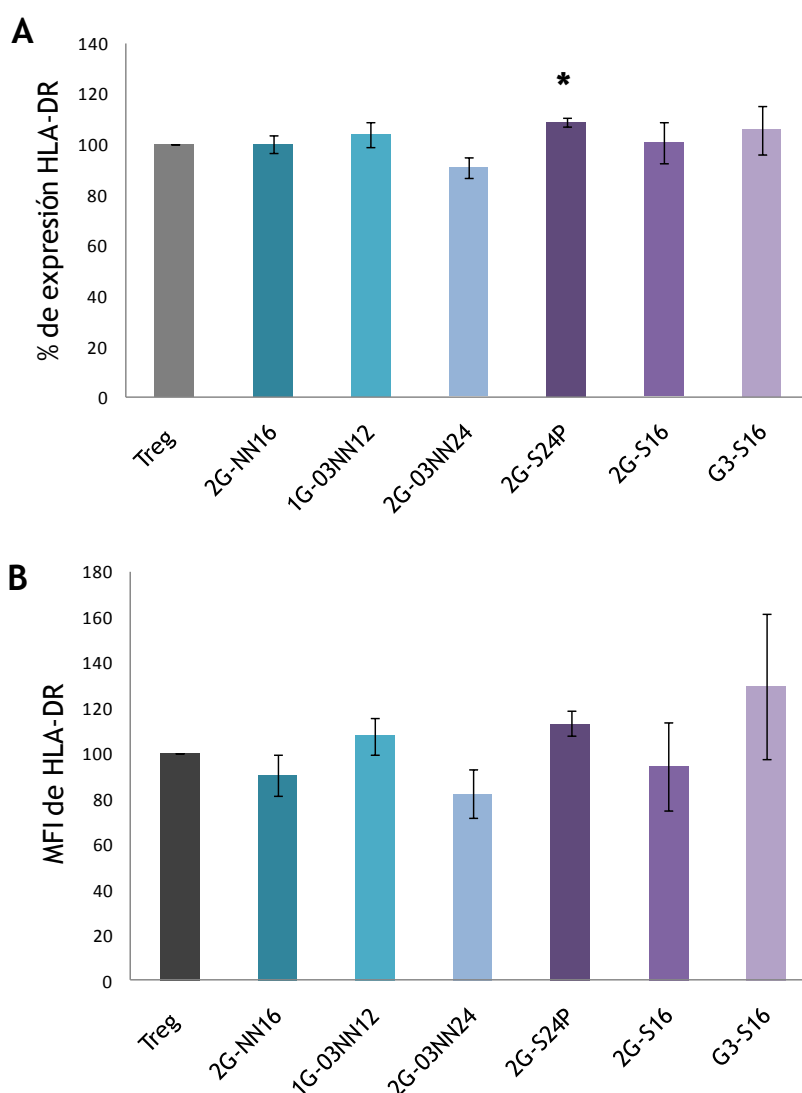


Figura 60. Expresión de HLA-DR en células tratadas con dendrímeros catiónico y aniónicos. La gráfica muestra la media $\pm$ EEM del porcentaje de expresión de HLA-DR (A) y MFI de HLA-DR (B) de células Treg tratadas con los dendrímeros 2G-NN16, 1G-

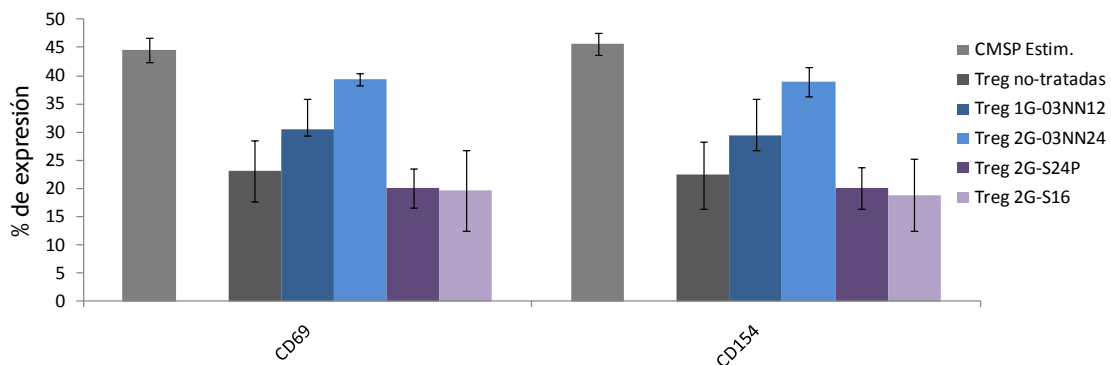


03NN12, 2G-03NN24, 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16 comparadas con células Treg no tratadas. El valor de \*:  $p < 0,05$  en la prueba de *Wilcoxon* para muestras relacionadas.

#### 4.3.2.4 Efecto de los dendrímeros carboxilano sobre la capacidad supresora de las células Treg.

Se estudió si las células Treg conservaban su capacidad supresora en presencia de los dendrímeros. Para ello se trataron células Treg con 2 dendrímeros catiónicos 1G-03NN12 (n= 4) y 2G-03NN24 (n= 3) y 2 dendrímeros aniónicos 2G-S24P (n= 5) y 2G-S16 (n= 3), y se compararon con células Treg no tratadas (n= 5).

La capacidad supresora de las células Treg se analizó midiendo el porcentaje de expresión de los marcadores de activación CD154 y CD69 en CMSP estimuladas cocultivadas con las Treg. No se encontraron diferencias significativas entre la capacidad supresora de Treg tratadas con cada uno de los dendrímeros y la de Treg no tratadas ( $p > 0,05$ ). Se observó una tendencia en la que las células Treg tratadas con los dendrímeros catiónicos 1G-03NN12 y 2G-03NN24 presentaron menos capacidad supresora que las Treg no tratadas. Sin embargo, las células Treg tratadas con los dendrímeros aniónicos 2G-S24P y 2G-S16 presentaron una capacidad de supresión muy similar a la de Treg no tratadas e incluso ligeramente mayor (**Figura 61**).



**Figura 61. Análisis de la capacidad funcional de las células Treg tratadas con diferentes dendrímeros.** La gráfica muestra la capacidad supresora de las células Treg no tratadas y tratadas con distintos dendrímeros carbosilano sobre la activación de las CMSP (ratio, Treg:CMSP = 1:1). Las barras representan la Media±EEM del porcentaje de expresión de CD69 y CD154 en CMSP estimuladas. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron usando la prueba de *Wilcoxon* para muestras relacionadas.

En conclusión, la mayoría de los dendrímeros probados no afectaron a la viabilidad de las células Treg y tampoco al fenotipo, concretamente en cuanto a la expresión de Foxp3 y CD4. Sólo el dendrímero aniónico 2G-S24P mostró un efecto significativo sobre la expresión de CD38 disminuyendo tanto el porcentaje como su MFI, y sobre HLA-DR incrementando su frecuencia. Estos resultados sugieren que los dendrímeros aniónicos, en especial el 2G-S24P podrían modular la capacidad de activación de las células Treg a través de la expresión de CD38 y HLA-DR.

### ***4.3.3. Efecto protector de dendrímeros carbosilano frente a la infección por el VIH en células Treg***

#### ***4.3.3.1. El dendrímero aniónico 2GS16 protege a las células Treg de la infección por el VIH-1***

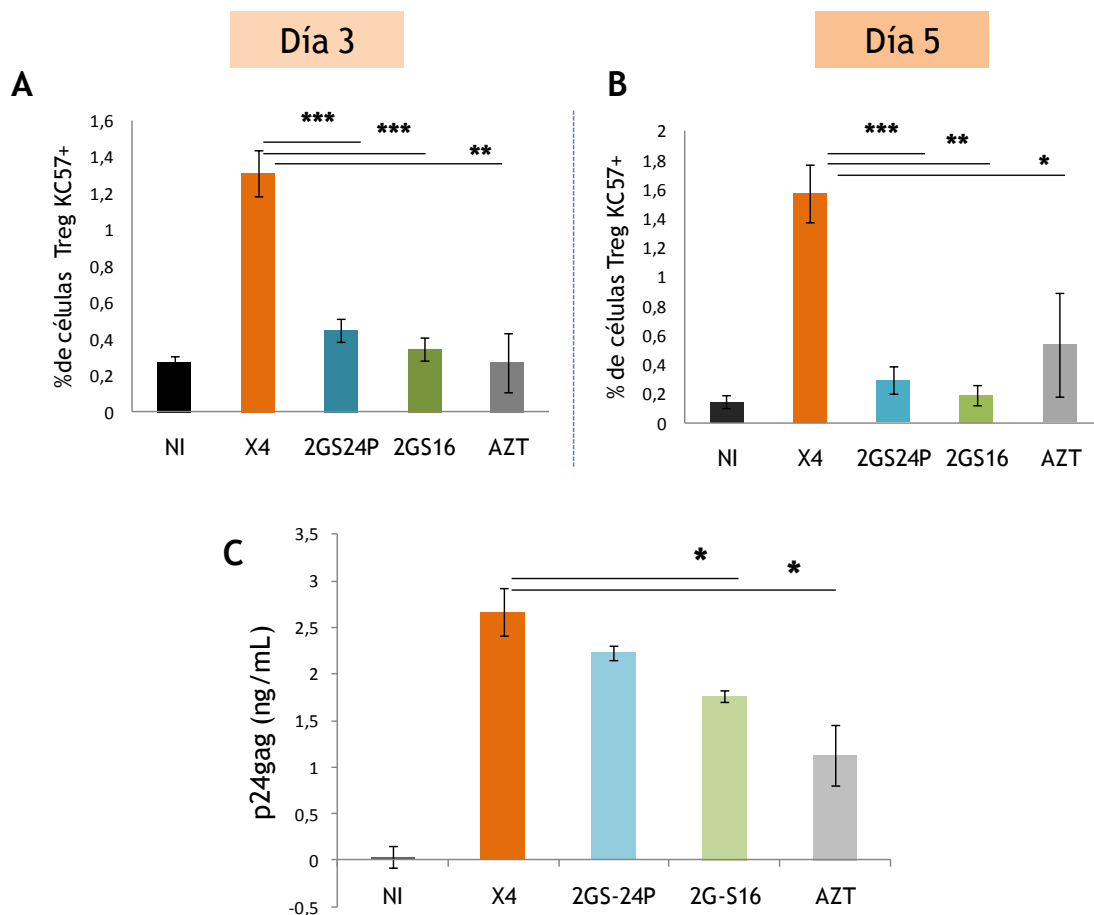
Se estudió si la capacidad antiviral demostrada por ciertos dendrímeros en cultivos de célula epiteliales vaginales y células primarias [64, 83, 99, 118] podría constituir una estrategia para impedir o disminuir los efectos de la infección por VIH sobre el fenotipo y funcionalidad de las Treg. Se seleccionaron los dendrímeros aniónicos 2G-S24P y 2G-S16, ya que han demostrado disminuir significativamente la infección por el VIH [64, 79, 92, 93, 118]. Además, en los ensayos realizados estos dendrímeros no afectaron a la viabilidad, la expresión de Foxp3 o la función de las células Treg. Las células Treg se infectaron con un aislado VIH-1 con tropismo X4 ya que es el

aislado que mostró una mayor capacidad infectiva en las células Treg y un mayor efecto sobre la expresión de Foxp3 y la funcionalidad de estas células.

Las células Treg se pretrataron con los dendrímeros 2G-S24P o 2G-S16 previamente a la infección por el VIH-X4. En paralelo se cultivaron células Treg no tratadas como control del experimento, además de un control de células Treg pretratadas con AZT como inhibidor de la infección por el VIH. Las células Treg se cultivaron durante 24 h con los tratamientos, después se infectaron con el aislado VIH-X4 a una MOI= 0,1 durante 3 h y posteriormente se cultivaron durante 3 y 5 días en presencia de los dendrímeros. La infección por el VIH-X4 y el posible efecto protector de los dendrímeros se analizó mediante la expresión de p24gag.

Las células Treg tratadas con los dendrímeros aniónicos 2G-S24P y 2G-S16 presentaron menor frecuencia de p24gag intracelular comparado con las células Treg infectadas por el VIH-X4 a día 3 (2G-S24P y 2G-S16:  $p= 0,000$ ) y a día 5 (2G-S24P:  $p= 0,000$  y 2G-S16:  $p= 0,008$ ). Estos datos están en concordancia con los obtenidos en el control de células Treg tratadas con AZT que también presentaron de forma significativa menor porcentaje de células Treg KC57+ comparadas con células Treg infectadas por el VIH-X4 (Día 3:  $p= 0,005$  y día 5:  $p=0,039$ , pos-infección) (**Figura 62A, 62B**).

La infección de las células Treg por el VIH se confirmó cuantificando Agp24 mediante ELISA en el sobrenadante de los cultivos. La cantidad de Agp24 (ng/ $\mu$ L) detectada en los sobrenadantes de células Treg tratadas con el dendrímero 2G-S16 fue significativamente menor a la obtenida en células Treg sin tratar e infectadas por el VIH ( $p= 0,026$ ) y como era de esperar similar a los datos obtenidos en las células Treg tratadas con AZT ( $p= 0,125$ ). La presencia de AZT en los cultivos de Treg infectadas disminuyó de forma significativa la cantidad de p24gag comparada con las células Treg infectadas por el X4-VIH ( $p= 0,020$ ). No se encontraron diferencias entre la cantidad de p24gag de los cultivos de células Treg con 2GS24P y los cultivos de células Treg no tratadas ( $p= 0,180$ ) (**Figura 62C**).

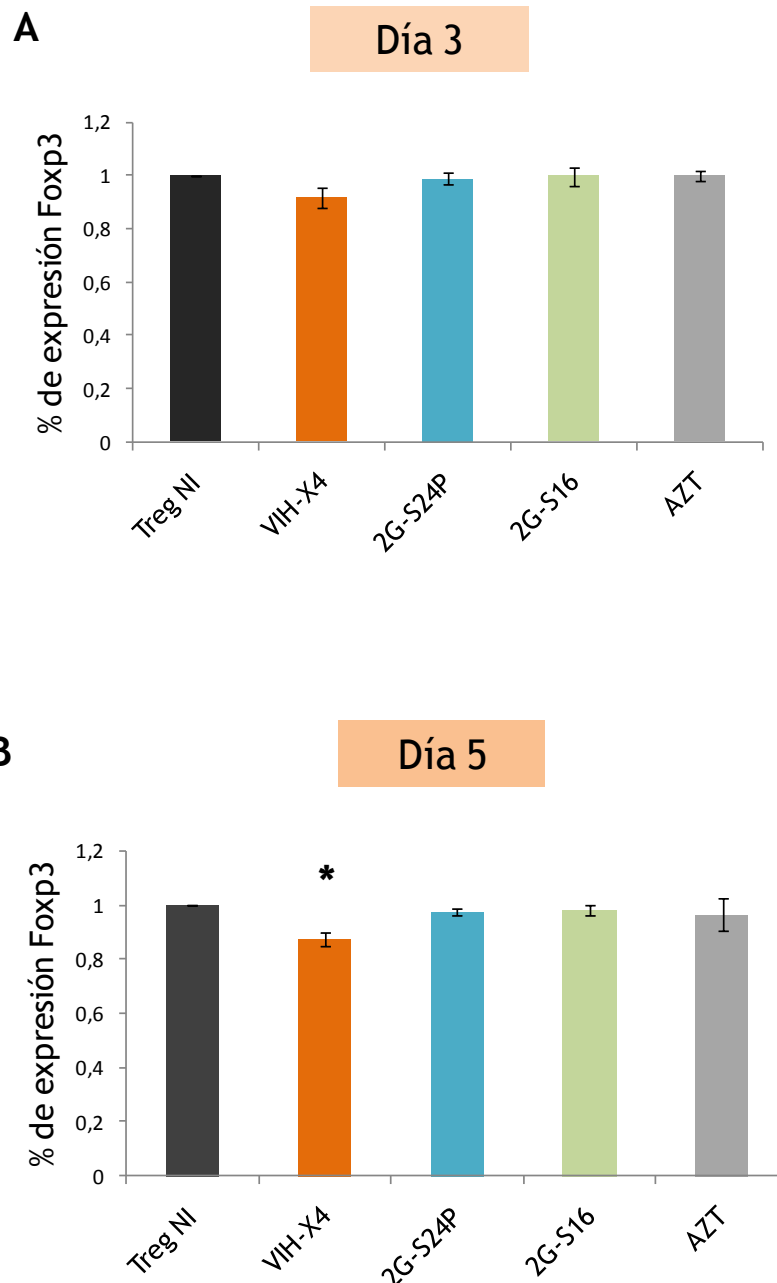


**Figura 62.** Cuantificación de la proteína viral P24gag en células Treg pre-tratadas con dendrímero e intactadas por el VIH. Se muestra la media $\pm$ EEM de la expresión intracelular de p24gag a día 3 (A) y día 5 (B) pos-infección y los valores de Ag p24gag (ng/ml) (C) en el sobrenadante de los cultivos celulares. Se estudiaron células Treg infectadas por el VIH-X4 (MOI: 0.1), células Treg infectadas y pre-tratadas con 2G-S24P, 2G-S16 a 10 $\mu$ M y AZT a 5 $\mu$ M, comparados con Treg NI. Los valores de \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  \*\*\*:  $p < 0,001$  se obtuvieron usando el *test t student*.

#### 4.3.3.2. Los dendrimeros 2G-S16 y 2G-S24P protegen a las células Treg infectadas por el aislado VIH-X4 del efecto sobre la expresión de Foxp3

Se analizó la expresión de Foxp3 en células Treg infectadas tratadas y no tratadas a día 3 (Figura 63A) y día 5 (Figura 63B) pos-infección. Coincidiendo con los resultados previos obtenidos *in vitro*, la infección por el VIH-X4 afectó a la expresión de Foxp3 en las células Treg en comparación a las Treg no infectadas, siendo significativo tras 5 días de infección ( $p = 0,031$ ). Sin embargo, se observó que las células Treg tratadas previamente con los

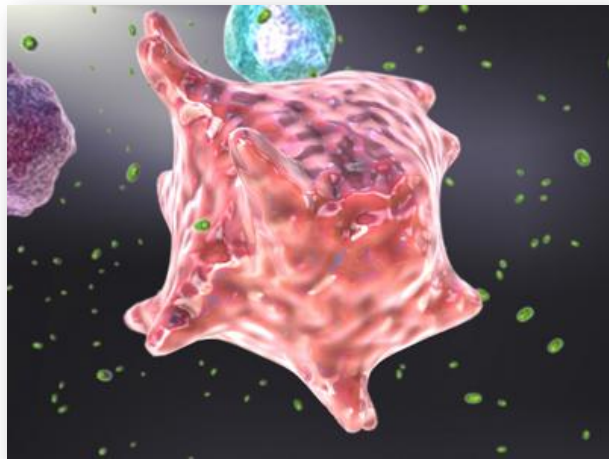
dendrimeros aniónicos 2G-S24P o 2G-S16 conservaron la expresión de Foxp3 obteniéndose resultados similares a los obtenidos en las Treg NI y en las Treg previamente tratadas con AZT (5mM) (Figura 63).



**Figura 63.** Los dendrimeros carboxilano aniónicos 2G-S24P y 2G-S16 protegen a las células Treg del efecto de la infección por VIH sobre la expresión de Foxp3. La gráfica muestra la media $\pm$ EEM del porcentaje de expresión de Foxp3 en células Treg infectadas por el VIH y pretratadas con 2G-S24P, 2G-S16 y AZT, a día 3 (A) y día 5 (B) pos-infección. El valor de \*:  $p < 0,05$  en el test no paramétrico U de *Mann-Whitney*.

En resumen, el pre-tratamiento con el dendrímero aniónico 2G-S16 reduce la infección y/o replicación del VIH-X4 en células Treg. Además, este dendrímero no interfirió en las características de las células Treg en los ensayos de función, fenotipo y viabilidad. Por lo tanto, este dendrímero presentaría la capacidad de impedir o reducir los efectos de la infección por el VIH en el fenotipo y funcionalidad de las células Treg.

## 5. DISCUSIÓN



## 5.1. Estudio *in vitro* del efecto de la infección por el VIH en células Treg

Uno de los objetivos de esta Memoria fue estudiar si las células Treg eran susceptibles de ser infectadas por el VIH, y en tal caso, cómo la infección por el VIH podría afectar al fenotipo y la capacidad supresora de estas células. Primero, se confirmó que efectivamente el VIH era capaz de infectar y replicar eficazmente en las células Treg, como demostraron los valores de Ag p24 analizados a nivel intracelular y en el sobrenadante de los cultivos celulares. Otros grupos de investigación han confirmado recientemente este mismo hallazgo [40, 43], lo que indica claramente que las células Treg también son una diana potencial de la infección por el VIH. Sin embargo, se desconocen los efectos directos del VIH sobre estas células.

El primer efecto que se observó fue que el VIH disminuía la expresión de CD4 en las células Treg infectadas. Se sabe que la infección por el VIH disminuye la expresión de CD4 en las células que infecta [119] y probablemente, al igual que en otras células T CD4+, la disminución de CD4 en Treg infectadas esté mediada por la proteína viral *nef* [119]. No obstante, el principal hallazgo de esta Memoria ha sido que la infección *in vitro* de las células Treg por el **VIH-X4 disminuía la expresión de Foxp3**. También se observó una pérdida parcial de Foxp3 en los cultivos de Treg no infectadas, el cual se podría deber a la estimulación repetida durante tiempos largos de cultivo [120]. Sin embargo, la disminución de Foxp3 en células Treg infectadas por el VIH fue mucho más significativa que en las Treg no infectadas. Por otra parte, cuando las Treg se trataron con AZT o T20 se observó que estos antirretrovirales revertían el efecto producido por la infección del VIH, de tal forma que no se perdía la expresión de Foxp3. Estos resultados sugieren que la desregulación de Foxp3 en las células Treg infectadas por el VIH está asociada a una replicación activa del virus, y la mera exposición al VIH no sería suficiente para afectar el fenotipo y la función de las Treg.

Las Treg también pueden ser infectadas por aislados VIH-R5, pero en este caso no se producen cambios significativos en la expresión de Foxp3. El



menor efecto de estos aislados virales probablemente se deba a la baja replicación de los virus R5, como indicaron los valores de p24 obtenidos intracelularmente o en el sobrenadante de los cultivos con Treg. Estos resultados están en concordancia con otros trabajos, que confirman que las células Treg son menos susceptibles a la infección por el VIH-R5, y que los aislados VIH-X4 inducen una infección mayor en células Treg [43]. Este hecho explicaría que el efecto del VIH-R5 tras 5 días de infección fuera diferente que cuando se infectaban con el VIH-X4. Sin embargo, existe la posibilidad de que los aislados VIH-R5 puedan tener un efecto a tiempos de infección más altos a los que se han utilizado en esta Memoria. Por este motivo, no se puede descartar que puedan tener algún efecto sobre las Treg, y serían necesarios más estudios para resolver definitivamente este aspecto.

A diferencia de otros estudios que muestran un aumento de los porcentajes de células Foxp3+ en los pacientes infectados por el VIH [29, 41], los resultados apuntan a que la infección de las células Treg por el VIH conducen a la pérdida de la expresión de Foxp3 y por tanto a una disminución de la población Treg. Otros estudios sugieren que las frecuencias de las células Treg disminuyen en sangre periférica de los pacientes VIH+ con CV alta pero aumentan en tejido linfoide, donde hay una mayor replicación viral [1]. Sin embargo, en todos estos estudios se analiza el porcentaje y no el número absoluto de estas células, es decir su proporción relativa en el total de linfocitos T CD4 y no la cantidad real de células. Por tanto, el incremento de la proporción de Foxp3 en pacientes infectados por el VIH podría explicarse por: a) una inducción transitoria de Foxp3 en células T no-reguladoras debido a su estado de activación o a la estimulación a través del TCR, tal y como se ha demostrado en pacientes VIH+ [29]; b) o por la depleción de otras subpoblaciones de células T CD4+ mediada por la infección por el VIH, lo cual incrementaría la proporción relativa de células Treg Foxp3+ en la población total [41, 121]. Los resultados de esta Memoria están en la misma línea que los trabajos publicados más recientemente donde demuestran que efectivamente, a diferencia de la frecuencia relativa, el número absoluto de

células Foxp3 está claramente disminuido en los pacientes infectados por el VIH [122, 123].

La desregulación de Foxp3 mediada por la infección por el VIH no se había descrito previamente, y podría constituir la base molecular que explicaría la disminución en el número absoluto de células Foxp3 en individuos VIH+. Estos resultados también explicarían por qué los pacientes virémicos presentan menor frecuencia de células Foxp3+ que los pacientes avirémicos [42], dado que la magnitud de la disminución de Foxp3 se relacionaba directamente con la cantidad de virus.

Para esclarecer a través de qué mecanismos la infección por el VIH era capaz de desregular la expresión de Foxp3, se estudió el perfil de metilación de Foxp3. La regulación epigenética es crucial para el control de la expresión del gen *FOXP3*, de tal manera que el gen debe estar sin metilar para que Foxp3 pueda expresarse correctamente [48]. Por otro lado, la metilación a través de enzimas metilasas es también un mecanismo de defensa celular frente a virus, y que por tanto puede ser alterado por infecciones virales [124]. Por lo tanto, el aumento de metilación o de las enzimas metilasas podría ser uno de los mecanismos por el cual el VIH desregula la expresión de Foxp3 en las células Treg infectadas.

**Las células Treg infectadas por el VIH experimentaron un incremento en la expresión de DNMT3b** alcanzando valores similares a los observados en las células T CD4+ no reguladoras, las cuales presentan un perfil alto de metilación del gen *FOXP3*. Estos resultados se correlacionan claramente con estudios previos, que demuestran que la infección por el VIH incrementa la expresión y actividad de DNMTs en las células T CD4+ [51, 97, 125]. La DNMT3b está especializada en inducir la metilación *de novo* en sitios CpG del ADN, y se han descrito sitios de unión para DNMT1 y DNMT3b en el gen *FOXP3* [103]. Es importante indicar que las otras dos metilasas estudiadas (DNMT1 y DNMT3a) no presentaron cambios significativos en su expresión en células Treg infectadas por el VIH. La DNMT1 se ha relacionado con el mantenimiento de la metilación en células en división y para la DNMT3a no se

han descrito sitios de unión en el gen *FOXP3* [126], por lo que serían metilasas que no tendrían un efecto sobre la expresión de *Foxp3*. Por lo tanto, el aumento de DNMT3b podría producir la metilación de los residuos de los sitios CpG y de este modo, la represión de *Foxp3*. Sin embargo, serían necesarios más estudios para demostrar claramente que es el incremento de DNMT3b la causa principal de la disminución de *Foxp3*.

El incremento de DNMT3b, mediado por la infección por el VIH, estaría relacionado con el aumento de metilación observado en dos de las tres regiones del gen *FOXP3* analizadas. Las células Treg infectadas por el VIH presentaron una mayor metilación en la región del promotor y la región CNS2 del gen *FOXP3*, que poseen sitios de unión para distintos factores de transcripción (entre ellos STAT5), y que promueven la estabilidad y mantenimiento de la expresión de *Foxp3* [104]. Hay que indicar que estas dos regiones estaban parcialmente metiladas en las células Treg no infectadas. Esto se debe posiblemente a que la activación mantenida durante el tiempo de cultivo puede favorecer la metilación, tal y como se ha descrito [49]. Sin embargo, los valores de metilación de células Treg infectadas fueron significativamente más altos en todos los experimentos en comparación con los encontrados en las Treg no infectadas, y similares a los reportados por Miyara *et al.* [104] en las células *Foxp3*<sup>low</sup>CD45RA<sup>-</sup> o células *Foxp3*<sup>-</sup>. Por tanto, los grados de metilación observados en Treg infectadas por el VIH no alcanzaron valores comparables a los observados en células T CD4 *naïve* (no Treg), pero podrían ser lo suficientemente altos como para inhibir la expresión de *Foxp3* y la función de estas células como se ha demostrado previamente [104].

El grado de metilación del ADN del gen *FOXP3* se asocia claramente con la actividad supresora en células Treg [48, 104]. De este modo, la metilación mediada por el VIH podría ser la responsable de la menor capacidad supresora observada en las Treg infectadas por el VIH [35, 104]. Esta hipótesis viene confirmada por el hecho de que la pérdida de la capacidad supresora en Treg infectadas por el VIH fue similar a la observada por Miyara

*et al.* en las células F<sub>oxp3</sub><sup>low</sup> y células F<sub>oxp3</sub><sup>—</sup>, las cuales presentan un perfil de metilación similar a los valores obtenidos en Treg infectadas [104].

Sin embargo, otro estudio indica que las Treg expuestas a VIH presentan una capacidad supresora similar a Treg no infectadas [43]. La divergencia existente con los resultados de esta Memoria se podría explicar por la diferencia en los protocolos experimentales que se han utilizado. Moreno-Fernández *et al.* [43] analizaron la capacidad de supresión después de tres días de infección, y utilizando VIH-R5 trópico. En los experimentos realizados en esta Memoria los virus con tropismo R5 no disminuyeron la expresión de F<sub>oxp3</sub> por lo que no afectarían a la función supresora. Además, la pérdida de función supresora en Treg infectadas por el VIH-X4 se observó a 5 días pos-infección, que también difiere con los tiempos usados por Moreno-Fernández *et al.* Los resultados de esta Memoria también difieren de los datos reportados por Ji *et al.* [127] donde se muestra un aumento de la capacidad supresora de Treg infectadas por el VIH. En este estudio, los investigadores utilizaron células Treg en reposo o *resting cells* en lugar de Treg activadas, por este motivo tanto los aislados VIH-X4 como R5 no replicaron en estas células (los valores de p24 fueron indetectables después de cinco días de infección) [127]. Tal y como demuestran los resultados de esta Memoria, se necesita la infección activa por el VIH en células Treg para afectar a la expresión y a la funcionalidad de F<sub>oxp3</sub>. Dicho efecto no se observa cuando el virus únicamente se expone a las células Treg pero se impide la replicación con AZT.

Por otra parte, la disminución de F<sub>oxp3</sub> ha sido asociada a cambios en el fenotipo de las células Treg. Existen trabajos que demuestran que las Treg pueden transformarse en células T efectoras (no-Treg) y producir citoquinas propias de células Th si la expresión de F<sub>oxp3</sub> está atenuada [128]. Los resultados indican que la infección por el VIH produce cambios en el patrón de secreción de citoquinas de las Treg. La infección en las células Treg disminuye los valores de TGF- $\beta$ , que es una citoquina clave para la inducción de F<sub>oxp3</sub>, diferenciación de las células Treg [45] y para la supervivencia de las células Treg naturales (nTreg) [129]. De tal forma que si la producción de

TGF- $\beta$  disminuye en las Treg infectadas por el VIH, se compromete la supervivencia de la población Treg. Además de la menor producción de TGF- $\beta$ , los resultados obtenidos mostraron un incremento en la producción de IL-4 en las Treg infectadas por el VIH, la cual favorece las respuestas de tipo Th2. Estos resultados, coinciden con los hallazgos moleculares que demuestran que el gen de *IL-4* es suprimido directamente por Foxp3 [130]. Otros estudios también han confirmado la aparición de un patrón de citoquinas Th2 en Treg que han perdido la expresión de Foxp3 [131], lo cual podría contribuir al cambio en el fenotipo de células Th1 a Th2 descrito en los pacientes VIH+ [132]. Cabe indicar que otro estudio más reciente también ha descrito en pacientes VIH+ un aumento en la producción de citoquinas Th2 por parte de células Treg que han perdido su capacidad supresora [133].

En conclusión, los resultados obtenidos *in vitro* demuestran claramente que la infección por el VIH en células Treg produce alteraciones en el fenotipo que define a estas células, así como una disminución de su capacidad supresora. Numerosos factores, tales como la CV y el estado inmunológico entre otros, podrían estar implicados en las alteraciones de las células Treg descritas en los pacientes infectados por el VIH. Sin embargo, los resultados obtenidos proporcionan datos clave para entender mejor la dinámica de las células Treg, y apuntan a que los pacientes infectados por el VIH pueden presentar una deficiencia marcada en los valores de Treg. Para confirmar esta hipótesis se realizó un estudio en células Treg obtenidas directamente de pacientes infectados por el VIH, con el fin de estudiar si la presencia de valores altos de virus circulante o carga viral tenía un efecto sobre el fenotipo y funcionalidad de esta subpoblación celular.

## 5.2. Efecto de la infección por el VIH-1 en el fenotipo y capacidad supresora de las células Treg en individuos VIH+.

Debido a la eficacia de las terapias antirretrovirales actuales es posible, en la mayoría de los casos, controlar la replicación del virus y mantener la carga viral en valores indetectables. Sin embargo, la exposición al VIH y la consiguiente hiperactivación del SI en los pacientes infectados por el VIH puede conducir a la erosión y el agotamiento de la población de células T CD4+, pudiendo comprometer la respuesta inmune específica contra el VIH. Por ello, la hiperactivación inmune se considera uno de los marcadores predictivos más fiables de la progresión a SIDA [38] y su erradicación constituye uno de los desafíos principales en el tratamiento de los individuos VIH+. En este contexto, la función supresora de las células Treg constituye uno de los mecanismos encargados de controlar la expansión y activación de células en estos pacientes. Por tanto, una disfunción de esta población podría favorecer la hiperactivación del SI, como se ha observado en pacientes infectados por VIH con bajas frecuencias de Treg [52].

La infección por el VIH de células Treg conduce a una pérdida de la expresión de Foxp3 y de su capacidad supresora que podría comprometer su papel clave en la homeostasis del SI. En los pacientes infectados por el VIH la hiperactivación inmunológica asociada con la infección puede conducir a la erosión y el agotamiento de la población de células T CD4+, pudiendo comprometer la respuesta inmune específica contra el VIH. Por ello, la hiperactivación inmune se considera uno de los marcadores predictivos más fiables de la progresión a SIDA [38]. En este contexto, la función supresora de las células Treg constituye uno de los mecanismos encargados de controlar la expansión y activación de células, por lo que una disfunción de esta población podría favorecer la hiperactivación del SI, como se ha observado en pacientes infectados por VIH con bajas frecuencias de Treg [52].

Por todo ello, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro*, se analizó tanto el fenotipo como la funcionalidad de las células Treg en dos grupos de pacientes infectados por el VIH, un grupo con CV alta y otro con CVi. La razón de estudiar estos dos grupos de pacientes fue analizar si la cantidad de virus en circulación influía en el estado inmunológico del paciente y en particular en la población de células Treg, ya que los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* demostraron que el efecto de la infección por el VIH en las Treg era dependiente de la concentración.

Al analizar el **estado general del sistema inmune** en estos pacientes, se observó efectivamente que la presencia de virus circulante tenía efectos marcados sobre distintas poblaciones del SI. Los pacientes con CV alta presentaron una mayor depleción de la población T CD4, incluyendo todas sus subpoblaciones (naïve, activadas, memoria), mientras que la frecuencia y número absoluto de células T CD8, sobre todo de sus poblaciones activadas o memoria, fue mucho mayor en este grupo. Estas alteraciones fueron menos marcadas en el grupo de pacientes con CVi en comparación con el grupo control no infectado. La caída de la población T CD4, por ser la diana principal del virus, y el aumento de la población T CD8 en respuesta a la infección son hechos conocidos y que se han descrito en numerosos artículos. También se observó un número absoluto menor de células B en el grupo CV que podría deberse a la desregulación que ha mostrado producir el VIH sobre la población de linfocitos B [134], o bien por la desregulación generalizada del SI de estos pacientes. La desregulación inmune podría ser además la causante de los valores inferiores de células NK o de monocitos observados en el grupo CV en comparación con el grupo control de individuos sanos. Por tanto, se puede concluir que los pacientes con CV alta tienen una marcada **deficiencia en la cantidad de células T CD4**, y una **activación generalizada de su SI**, como indican las frecuencias altas de células con fenotipo activado o memoria-activada, en la población de linfocitos T CD4 y T CD8. En los pacientes con CVi, aunque también presentan alteraciones con respecto a los valores observados en los individuos controles, la magnitud de estas

diferencias es menor y no significativa en comparación con el grupo con CV alta.

Generalmente, en los procesos de infección causados por agentes patógenos las células Treg se activan o expanden para regular las respuestas inmunes generadas frente al patógeno [37]. En la infección por el VIH, en cambio, existe controversia entre si los valores de Treg están disminuidos [39, 40] o aumentados [29, 41]. Los resultados demuestran que el porcentaje de células Treg está aumentado en los pacientes infectados por el VIH. Esta observación coincide con las publicaciones de otros grupos [29, 41]. Sin embargo, **el número absoluto de células Treg en individuos VIH+ está disminuido**, sobre todo en los pacientes con CV alta. Existen varias posibilidades para explicar cómo teniendo valores absolutos inferiores, los pacientes infectados por el VIH muestran un porcentaje o proporción mayor de células Treg que los individuos sanos. Se ha demostrado que en los pacientes infectados por el VIH se puede dar una inducción transitoria de Foxp3 en células T CD4 que no son Treg a causa de la activación o estimulación vía TCR [29]. También, la falta de consenso en la determinación del fenotipo de células Treg puede influir en los resultados. De hecho, en numerosos estudios las células Treg se han identificado como CD4+CD25+CD127-. Sin embargo, se ha demostrado que en pacientes con CV alta el porcentaje de esta población no se correlaciona con el porcentaje de células Foxp3+ [42]. Por otro lado, la depleción de células T CD4+ (efectoras, activadas) a causa de la infección por el VIH aumentaría la proporción relativa de Treg en el total de las células T CD4+, pero no correspondería con un aumento real del número de Treg.

En cuanto a los valores absolutos, existen varios mecanismos que podrían estar detrás de la deficiencia de células Treg en individuos VIH+. En este estudio se demuestra que los valores de Treg en pacientes VIH+ no se correlacionan con el número de células CD4 RTE, que son un indicador de producción tímica [135, 136]. Se observa que en los individuos sanos hay una correlación positiva entre el número de células CD4 RTE y las Treg, que indicaría un origen mayoritariamente tímico de la población Treg. Sin



embargo, en ambos grupos de pacientes infectados por el VIH está correlación no existe. Estos resultados podrían ser debidos a que la infección por el VIH ha demostrado inhibir la producción tímica [137]. De hecho, los resultados mostraron que la cantidad de células T CD4 RTE en ambos grupos de individuos infectados fue inferior a la observada en los controles. La **menor producción tímica de células Treg** podría ser una de las causas de la deficiencia de esta población en pacientes VIH+. Además, la ausencia de correlación entre la cantidad de Treg y la producción tímica podría indicar que en individuos VIH+ la población de Treg es menos dependiente de su producción tímica y se mantiene sobre todo a través de la expansión o inducción periférica [135, 136].

Otro mecanismo que puede estar involucrado en la deficiencia de Treg en los individuos VIH+, es el efecto directo del virus circulante en las células Treg, tal y como se ha demostrado *in vitro*. En los resultados obtenidos, se observó una correlación negativa entre la CV y el número absoluto de células Treg, por lo tanto a mayor presencia de virus menor es el número absoluto de células Treg, lo cual concuerda con la disminución de la expresión de Foxp3 observada *in vitro* que fue concentración dependiente. Cuando se analizó qué subpoblaciones de Treg estaban mayormente afectadas por la carga viral o cantidad de virus circulante se encontró que tanto las Treg activadas como las Treg memoria se correlacionaban negativamente con la CV. Sin embargo, las células Treg *naïve* no presentaban dicha correlación. Esto se debería a que, al igual que ocurre con los demás linfocitos T CD4, es necesario que la célula esté activada para que el VIH pueda infectarla y replicar en ella, mientras que las células *naïve* o *resting* son resistentes a la infección [138, 139]. Todo ello apunta a que la **infección directa de las células Treg por parte de VIH** es uno de los principales mecanismos que explicarían la deficiencia de Treg en pacientes VIH+, especialmente en aquellos con mayor cantidad de virus en circulación.

Como se ha mencionado previamente, los resultados obtenidos al analizar el estado inmunológico de los pacientes indicaron que en general, los valores absolutos de todas las subpoblaciones de células T CD4 estaban

disminuidos. Sin embargo, al analizar las proporciones de las distintas subpoblaciones, se observó que en los pacientes VIH+ la proporción de células con un fenotipo activado o memoria-activada era mucho mayor que en individuos sanos. El aumento en la proporción de células activadas es uno de los mecanismos que inducen la diferenciación y proliferación de células Treg [31, 140]. Este mecanismo parece funcionar correctamente en los pacientes con CVi, donde existe una correlación entre la frecuencia de células CD4 activadas y la cantidad de Treg. Sin embargo en los pacientes con CV alta, a pesar del aumento en la proporción de células activadas, no se produce un aumento en la cantidad de células Treg, por lo que este mecanismo homeostático también podría estar alterado.

Almeida *et al*, [31] han descrito que existe un estrecho equilibrio entre la proporción de células T CD4 activadas y la cantidad de células Treg. Este equilibrio se establece debido a que las células T CD4 activadas producen IL-2 que es captada por el receptor presente en las Treg (CD25), el cual desencadena una vía de señalización que favorece la diferenciación y función supresora de las Treg. Al analizar este mecanismo en pacientes VIH+ se observó que el **balance entre las células Treg y las células T CD4 productoras de IL-2** (que corresponde a células CD4 memoria o activadas [31]) estaba roto en los pacientes con CV alta. Al estudiar las posibles causas por las que las Treg no aumentaban proporcionalmente con las células activadas, se encontró que las Treg de **pacientes con CV alta presentaban una expresión del receptor para la IL-2 baja**. De hecho, se observó que en los pacientes con CV alta aparecía una población de células Foxp3+ que expresaban menos CD25 (IL2-R $\alpha$ ), y esta disminución del receptor IL2-R $\alpha$  no se observaba en pacientes con CVi. La deficiencia de IL2-R $\alpha$  en presencia del virus se confirmó *in vitro*, donde se observó que la infección directa por el VIH-X4 de Treg procedentes de voluntarios sanos producía una disminución en la expresión de IL2-R $\alpha$ . La vía de señalización de IL-2 está mediada inicialmente por la activación de JAK1 y JAK3 y la posterior fosforilación de STAT5 [34]. La disminución en la cantidad de STAT5 fosforilado (pSTAT5) dentro de las Treg infectadas confirmó que efectivamente las Treg infectadas

estaban recibiendo una menor señal procedente del estímulo de la IL-2, a causa de la disminución en la expresión de su receptor. Además, se ha demostrado que la disminución de STAT5 está asociada a una menor expresión de Foxp3 y menor capacidad supresora de las células Treg [141]. Acorde con los resultados obtenidos, Krywpruchko *et al*, demuestran que la envuelta viral de VIH induce una falta de respuesta a la presencia de IL-2 en el total de células T CD4+ [142]. Es importante resaltar que la cascada de señalización mediada por IL-2 es de vital importancia para la homeostasis de las células Treg [31, 34]. Por lo tanto, la disminución del receptor de IL-2 en las células Treg, podría implicar que estas células no sean capaces de responder a la presencia de IL-2 circulante y al incremento de células T activadas en los pacientes infectados por el VIH. Ya que se ha demostrado que el receptor IL-2-R $\alpha$  es esencial para la expansión, inducción y sobre todo para el buen funcionamiento de estas células [31, 34], al disminuir la expresión de IL-2-R $\alpha$  en las células Treg también podría disminuir la capacidad supresora de las células Treg infectadas en los individuos VIH+. De hecho, un estudio realizado por Miyara *et al*, demostró que las células Foxp3+ con baja expresión de CD25 presentan una menor capacidad supresora y son menos capaces de mantener la expresión de Foxp3 [104].

Por último, se estudió si la **función supresora de las células Treg** se veía afectada en los pacientes VIH+. Como se ha comentado previamente, la desregulación de Foxp3 provocada por el VIH; la disminución del receptor de la IL-2 y de pSTAT5 en Treg de pacientes infectados; la pérdida del equilibrio homeostático con las células activadas, son todos factores que se han asociado con una pérdida de la capacidad supresora. Se analizó la capacidad supresora en 4 pacientes con CV alta, y los resultados mostraron claramente que las células Treg de estos pacientes tenían menor capacidad supresora que las Treg de individuos sanos. No existen estudios previos en la literatura sobre la capacidad funcional de las Treg en pacientes VIH+. Estos resultados serían por tanto la primera prueba de que la función supresora de las Treg en individuos VIH+ estaría disminuida. Este hecho, junto con las demás alteraciones observadas en la población Treg, indican que efectivamente,

además de una deficiencia en el número de Treg, los individuos VIH+ presentan una deficiencia en la función supresora que podría afectar a la homeostasis del sistema inmune.

La hiperactivación inmune que presentan los pacientes infectados por el VIH es probablemente un fenómeno multifactorial ocasionado por diversos factores virológicos e inmunológicos. Sin embargo, estudios de otros grupos demuestran que la incapacidad de las células CD4 para detectar IL-2 debido a defectos en la expresión de IL-2R [143] o de señalización de IL-2 [141], puede ocasionar la activación incontrolada de células T CD4 y el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por lo tanto la desregulación de la homeostasis de las células Treg descrita [144] y el deterioro funcional que se describe en las Treg infectadas por el VIH podrían ser un factor determinante en el proceso de hiperactivación inmune de los pacientes infectados por el VIH.

Además, las diferencias observadas entre los dos grupos de individuos VIH+ sugieren que la presencia o no de virus circulante es determinante en los efectos sobre la población de células Treg, recalcando la importancia de mantener la CV a niveles indetectables en los pacientes infectados. Sería interesante discernir en estudios futuros si las alteraciones en la población Treg podrían también contribuir a la hiperactivación residual existente en pacientes infectados y tratados con éxito. Varios autores han reportado que la disminución del número absoluto de células Treg en pacientes infectados por el VIH se correlaciona con el aumento de marcadores de activación inmune [53, 54]. Los resultados presentados en esta Memoria contribuyen a la comprensión de los efectos de la infección por el VIH en células Treg, proporcionando la base molecular de la alteración sufrida por las células Treg en presencia del VIH reportados por otros investigadores.

### 5.3. Efecto de los dendrímeros sobre la viabilidad, fenotipo y la capacidad supresora de las células Treg

A la vista de los resultados, que demuestran una disfunción de las células Treg en presencia del virus, se estudió si el uso de dendrímeros carboxilano podría constituir una herramienta para evitar la infección y/o disminuir los efectos de la misma sobre las Treg. Se ha demostrado que determinados dendrímeros aniónicos bloquean y evitan la infección por el VIH-1 en distintos tipos celulares [64, 92]. Por tanto, uno de los objetivos de esta memoria fue conocer si los dendrímeros *per se* evitaban la infección por el VIH de las células Treg.

En primer lugar se estudió el efecto del tratamiento con dendrímeros catiónicos y aniónicos en la viabilidad, fenotipo y capacidad supresora de las células Treg, ya que si los dendrímeros produjeran cambios en alguno de estos parámetros, estos cambios podrían ser perjudiciales para la correcta homeostasis del sistema inmune [84, 104, 135, 145]. En general, el **análisis de viabilidad celular** realizado en los cultivos de células Treg demostró que a las concentraciones empleadas durante 48 h los dendrímeros catiónicos y aniónicos no producían efectos citotóxicos, siendo la viabilidad de las células Treg superior al 80%. Estos resultados coinciden con los observados en otras células primarias tratadas con estos mismos dendrímeros [64, 79, 84, 89]. En el caso de las células Treg, sólo el dendrímero catiónico de primera generación 1G-03NN12 a la concentración de 5 $\mu$ M produjo un descenso de la viabilidad por debajo del 80%. Los factores que pueden influir en la mayor o menor toxicidad de un dendrímeros son varios, entre ellos está la propia estructura del dendrímero (núcleo, generación, grupos funcionales, flexibilidad, etc) [74, 146]. Por ejemplo, si los grupos funcionales fueran cargas positivas, estas pueden causar desestabilización en la membrana celular, induciendo a lisis celular [147]. En cambio, si los grupos funcionales fueran cargas aniónicas estas podrían presentar mayor afinidad con las cargas negativas presentes en las superficies celulares [64]. Otro factor importante,

son los distintos tipos celulares, líneas establecidas, cultivos primarios, adherentes, etc que sean más o menos sensibles al tratamiento con los dendrímeros [79].

Al estudiar el **efecto de los dendrímeros sobre el fenotipo** de las células Treg, se ha demostrado que los dendrímeros catiónicos y aniónicos no modificaron la expresión del principal marcador que define a esta población celular, el Foxp3. Se observó que los dendrímeros 1G03-NN12 y 2G-S16 disminuían levemente la expresión de CD4. En el caso del 2G-S16, se ha demostrado mediante modelaje computacional que este dendrímero forma complejos estables con el receptor CD4 de la célula diana, y por tanto podría bloquear parte de las moléculas CD4 en la superficie de la célula y reducir la cantidad de anticuerpo que se une. En cualquier caso la disminución de CD4 observada fue pequeña y probablemente no interfiera en la funcionalidad de las Treg. También se analizaron marcadores de diferenciación y de activación en las Treg tratadas con los distintos dendrímeros, ya que son importantes en su funcionalidad. La expresión del marcador CD45RO está asociada a un fenotipo de células Treg efectoras o memoria [148]. Los resultados mostraron que sólo se modificaba la densidad de expresión (MFI) de CD45RO en las células Treg tratadas con el dendrímero 2G-03NN24. Sin embargo, el porcentaje de este marcador fue similar en todos los cultivos de células Treg tratadas y no tratadas, y ninguno de los dendrímeros analizados alteró de forma significativa su expresión. Por otra parte, los marcadores CD38 y HLA-DR se asocian a un fenotipo de activación en células Treg [148]. En este caso, es de destacar que sólo las células Treg tratadas con el dendrímero aniónico 2G-S24P disminuyeron la expresión de CD38 en porcentaje y en MFI. Aunque se observó una tendencia similar en las células Treg tratadas con los dendrímeros catiónicos 2G-S16 y G3-S16 la disminución de la expresión de CD38 fue más leve y no significativa. Por el contrario, las células Treg tratadas con los dendrímeros catiónicos 2G-NN16, 1G-03NN12 y 2G-NN24 presentaron una tendencia leve, no significativa, a expresar un mayor porcentaje y MFI de CD38. La expresión de CD38 en células T se ha asociado a células con función reguladora [149]. En un estudio realizado por Patton *et*

*al.*, demostraron que las células Treg con expresión alta de CD38 (CD38++) tenían mayor capacidad supresora que las células Treg con expresión baja de CD38. Además, las células Treg CD38+ tenían mayor supervivencia que las células Treg CD38– cultivadas *in vitro*. Por lo tanto, el hecho de que los dendrímeros no alteren e incluso puedan aumentar la expresión de CD38 en células Treg podría favorecer su supervivencia y funcionalidad [150]. Por último, las células Treg tratadas con el dendrímero 2G-S24P presentaron un mayor porcentaje de HLA-DR+, sin embargo, no se encontraron diferencias en la MFI de HLA-DR comparado con las células Treg no tratadas. Los demás dendrímeros no afectaron a la expresión de HLA-DR de las células Treg, ni en porcentaje ni en MFI. Se ha demostrado que en individuos sanos, las células Treg con alta expresión de HLA-DR tienen mayor capacidad supresora que las Treg que tienen baja expresión o que no expresan HLA-DR [115]. Además, estudios recientes han revelado la importancia de las células Treg en la inducción a tolerancia después de un trasplante de órganos [151, 152]. De hecho, Schaeir *et al.* han mostrado que los individuos trasplantados que tenían mayor frecuencia de células Treg HLA-DR++ tenían menor riesgo a desarrollar un rechazo al trasplante [115]. En la infección por el VIH, se ha demostrado una asociación entre el incremento de células Treg HLA-DR+, mayor carga viral y mayor depleción de células T CD4+ [153].

Para conocer el **efecto de los dendrímeros sobre la capacidad supresora de las células Treg**, se analizó la capacidad de estas células para suprimir la activación de CMSP. Se seleccionaron los dendrímeros que no habían mostrado ser tóxicos en Treg y que tenían estructuras similares pero diferente número de cargas. El objetivo era doble, ver el efecto en la capacidad supresora de los dendrímeros y estudiar si el número de cargas iónicas podría jugar algún papel. Antes del ensayo de función, las células Treg se pre-trataron 48 h con los dendrímeros catiónicos: 1G-03NN12 (12 cargas+) y 2G-03NN24 (24 cargas+) y los dendrímeros aniónicos: 2G-S16 (16 cargas–) y 2G-S24P (24 cargas –). Las células Treg tratadas con 1G-03NN12 y 2G-03NN24 presentaron una reducción no significativa en la capacidad supresora frente a las células Treg no tratadas. Esta disminución fue más notable en las células

Treg tratadas con 2G-03NN24 que con 1G-NN0312, lo que sugiere que un mayor número de cargas positivas presente en los dendrímeros podría afectar a la función de las células Treg, aunque hay que tener en cuenta que la reducción de la capacidad supresora de las Treg no fue significativa. Sin embargo, las células Treg tratadas con los dendrímeros aniónicos 2G-S24P y 2G-S16 tenían una tendencia a presentar mayor capacidad funcional, aunque no significativa con respecto a las células Treg no tratadas. En este caso no se observaron diferencias según el número de cargas negativas de los dendrímeros. Debido a la complejidad de la técnica y la limitación en la cantidad de Treg purificadas que se obtienen no se ha realizado un número de experimentos para determinar si la carga de los dendrímeros podría modular o no la capacidad supresora de las células Treg.

En resumen, la expresión del marcador Foxp3, que define y determina las características funcionales de las células Treg [33, 148-150], no se vio afectada por la presencia de dendrímeros catiónicos y aniónicos. La expresión de CD4 fue algo menor en las Treg tratadas con el dendrímeros aniónico 1G-03NN12 y el dendrímero catiónico 2G-S16. El dendrímero aniónico 2G-S24P, podría ser un posible modulador de los marcadores CD38 y HLA-DR en las células Treg, pudiendo influir en la función de estas células en los procesos de inmuno-tolerancia y en la infección por el VIH [52, 153, 154]. La utilización de dendrímeros como moduladores de las células Treg se convierte en una alternativa interesante con aplicaciones prácticas en distintas patologías. Diversos trabajos demuestran que la extracción de células Treg, expansión *ex vivo*, y re-infusión en los pacientes constituye una herramienta terapéutica prometedora [155, 156]. La utilización de dendrímeros como moduladores de la respuesta Treg, o formando complejos con otras moléculas o fármacos podría ser de utilidad en el desarrollo de este tipo de terapias frente a enfermedades autoinmunes, rechazo a trasplantes, alergias y cáncer [35, 104, 157, 158]. Además, por ser objeto del presente estudio, cabe destacar su posible uso para evitar la reinfección de las células Treg en cultivos *ex vivo* en el caso de individuos VIH+ [39, 40].



### 5.3.1. Efecto protector de dendrímeros aniónicos en células Treg frente a la infección por el VIH.

Como se ha indicado previamente, la hiperactivación del sistema inmune en los pacientes infectados por el VIH compromete las respuestas inmunes específicas contra el virus, y se considera uno de los marcadores predictivos más fiables de la progresión a SIDA [38]. En este contexto, las células Treg pueden jugar un papel clave en el control de la hiperactivación inmune en individuos VIH+. Sin embargo, las células Treg son susceptibles de ser infectadas por el VIH, y dicha infección conduce a alteraciones en su fenotipo y a una pérdida de funcionalidad. Otros estudios han mostrado que el dendrímero carbosilano aniónico 2G-S16 es capaz de bloquear y evitar *in vitro* la infección por el VIH-1 en células epiteliales y células primarias humanas (linfocitos T CD4, células dendríticas, etc.), por lo que se ha investigado su utilidad como microbicida frente a la infección por el VIH [64, 92]. Además, los dendrímeros aniónicos, y en general los inhibidores aniónicos, se consideran inhibidores de la entrada del VIH-1. Su actividad anti-VIH está asociada con las interacciones electrostáticas entre la glicoproteína de la envuelta gp120 del VIH-1 y diferentes grupos funcionales de estos dendrímeros que previenen la unión del virus a la célula diana [64, 159]. Por todo lo mencionado anteriormente, y teniendo en cuenta la importancia que tendría la protección de las células Treg de la infección por el VIH, se estudió el efecto protector *per se* que podrían tener los dendrímeros carbosilano aniónicos 2G-S24P y 2G-S16 en células Treg contra la infección por el VIH-1. En los estudios de viabilidad, estos dendrímeros mostraron no ser tóxicos a la concentración de 10 $\mu$ M, coincidiendo con los datos de toxicidad obtenidos en otras líneas y células primarias [64, 79, 89, 90, 92]. Además, no modificaron la expresión de Foxp3 ni presentaron efectos adversos sobre la capacidad supresora de las células Treg, por lo que estos dendrímeros presentaban características de bioseguridad y biocompatibilidad que los hacían adecuados para estudiar si tenían un efecto frente a la infección por el VIH en células Treg.

Para analizar el **efecto antiviral de los dendrímeros**, células Treg previamente activadas se pre-trataron durante 24 h con 2G-S16 y 2G-S24P, y se infectaron 2 h con el aislado viral VIH-X4. Como control del experimento de la capacidad antiviral de los dendrímeros, también se infectaron en paralelo células Treg tratadas con AZT. La infección de las células Treg se realizó sólo con virus con tropismo X4 y no R5, ya que los resultados obtenidos *in vitro* indicaban que el VIH-R5 no afectaba al fenotipo de las Treg. Los resultados mostraron que las células Treg tratadas con 2G-S24P y 2G-S16 presentaban menor porcentaje de p24 intracelular (KC57) que las células Treg infectadas sin tratar, y esta disminución en la infección debida a los dendrímeros era comparable a la observada con el AZT. El efecto antiviral de los dendrímeros fue confirmado al medir p24 en los sobrenadantes de cultivo, que indicaban claramente una disminución en la replicación viral siendo mayor el efecto conseguido con el dendrímero 2G-S16.

En cuanto al mecanismo por el cual el dendrímero podría bloquear la infección por el VIH, se ha descrito mediante modelaje computacional que el 2G-S16 forma complejos estables con la proteína gp120 del VIH y en menor medida con el receptor CD4 de la célula diana. De esta manera, el dendrímero es capaz de bloquear, al menos parcialmente, la interacción entre la gp120 viral y CD4 imprescindible para la entrada del virus en la célula. En cambio, cuando se hizo el estudio de modelaje computacional con 2G-S24P este dendrímero presentó una menor interacción con la gp120 y con el CD4 que la mostrada por el 2G-S16. Además, 2G-S16 también se une a los correceptores CXCR4 y CCR5 de la célula diana [64], que son también imprescindibles en el proceso de entrada del virus y que son expresados también por las células Treg [40, 43]. Esto podría explicar el menor efecto antiviral conseguido con el dendrímero SG-S24P en células Treg. Otro mecanismo que podría explicar las diferencias observadas, es el hecho de que el 2G-S16 tiene una estructura más flexible, en cuanto a la naturaleza del núcleo, que el 2G-S24P, aunque este último presente un número mayor de cargas negativas. La flexibilidad de la estructura es un factor importante cuando el dendrímero actúa como agente antiviral, ya que una mayor

flexibilidad significa más eficacia de la superficie dendrítica para interactuar con los dominios importantes de los receptores virales o celulares [64, 98]. Por otra parte, en el análisis del efecto directo de 2G-S24P sobre las células Treg, se observó que los cultivos tratados con 2G-S24P presentaron mayor porcentaje de células Treg HLA-DR<sup>+</sup> que las células tratadas con 2G-S16. Este fenotipo activado en presencia del 2G-S24P puede favorecer la replicación viral, ya que el VIH requiere la activación de la célula diana para infectarla eficazmente. Por tanto, no se puede excluir que los mayores niveles de p24 encontrados en el sobrenadante de Treg tratadas con 2GS-24P se deban a una mayor replicación asociada a la mayor activación, y no a que este dendrímero tenga una menor capacidad antiviral.

En resumen, aunque ambos dendrímeros, 2G-S16 y 2G-S24, presentaron actividad antiviral, se consiguió un mayor bloqueo de la infección por el VIH cuando las células Treg se trataron con el 2G-S16 en comparación con 2G-S24P. A pesar de que ambos dendrímeros presentan estructuras similares e incluso el 2G-S24P tiene mayor número de grupos terminales con cargas negativas, esta característica no fue suficiente para obtener una mayor actividad antiviral. Nuevos estudios empleando concentraciones mayores, o incluso combinando el efecto antiviral de varios dendrímeros podrían ser interesantes para determinar si esta estrategia podría bloquear al 100% la infección de Treg por el VIH.

Uno de los principales efectos de la infección por el VIH en las células Treg es la **disminución en la expresión de Foxp3**, que es el marcador que define a esta población y que es clave en la capacidad funcional de la célula. Coincidiendo con los resultados previos, la expresión de Foxp3 en células Treg infectadas por el VIH-X4, disminuyó a día 3 y sobre todo a día 5 pos-infección aunque la disminución no fue tan marcada como la observada en los experimentos previos. Esto podría deberse a que las células utilizadas estuvieran menos activadas o fueran menos susceptibles a la infección por el VIH. El uso de distinto lotes de virus también podría explicar las diferencias de resultados. En cualquier caso el pre-tratamiento con los dendrímeros aniónicos antes de la infección redujo este efecto sobre la expresión de

Foxp3. Las células Treg tratadas con 2G-S216 y 2G-S24P presentaron un porcentaje de Treg Foxp3+ similar al observado en células Treg no infectadas y en células Treg tratadas con AZT. Estos resultados sugieren que la actividad antiviral *per se* de los dendrímeros frente a VIH no sólo protege a las células Treg de ser infectadas sino que también se consigue evitar la disminución en la expresión de Foxp3 asociada a la infección por el VIH. Dada la limitación en la cantidad de Treg purificadas, no se pudo completar el análisis con estudios de funcionalidad de las Treg infectadas en presencia de los dendrímeros. Sin embargo, a la vista de los resultados de esta Memoria si se consigue reducir la infección por el VIH y mantener la expresión de Foxp3, se puede pensar que la pérdida de la capacidad supresora causada por la infección también será menor en presencia de estos dendrímeros.

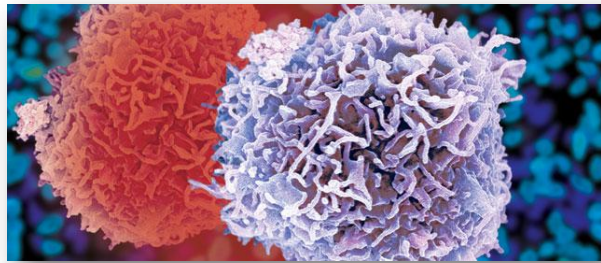
Estos resultados abren una nueva ventana de investigación en el uso de nanopartículas para proteger a las células Treg de la infección por el VIH. De este modo, su uso podría facilitar su expansión y función reguladora, lo cual tendría gran relevancia clínica para el control de hiperactivación inmune asociada a la infección por el VIH. Además, sería interesante el estudio de dendrímeros con actividad anti VIH en células Treg en combinación con otros fármacos o moléculas con actividad específica, que puedan ser utilizados como posible terapia antirretroviral en individuos VIH+.

## 6. CONCLUSIONES



1. Las células Treg son susceptibles de ser infectadas por el VIH-1. La infección con virus con tropismo X4 produjo alteraciones en el fenotipo y la capacidad supresora de las células Treg, que no se observaron en la infección con virus con tropismo R5.
2. La infección por el VIH-X4 en células Treg produjo una disminución en la expresión de Foxp3 mediada por un incremento de la enzima DNMT3b y un aumento en el grado de metilación del gen *FOXP3*.
3. Los pacientes infectados por el VIH-1 presentaron una deficiencia en la población de células Treg, especialmente significativa en aquellos pacientes con carga viral alta. La deficiencia de Treg podría estar relacionada con la activación generalizada del sistema inmunológico observada en estos pacientes.
4. Las principales causas de la deficiencia de Treg que se observó en pacientes infectados por el VIH se postulan como el efecto directo del VIH sobre la población Treg, así como una disminución en la expresión del receptor para la IL-2 por parte de las Treg en presencia del VIH.
5. El tratamiento de las células Treg con los dendrímeros carbosilano aniónicos 2G-NN16, 2G-03NN24 y catiónicos 2G-S24P, 2G-S16 y G3-S16 no mostraron efectos sobre la viabilidad, fenotipo y funcionalidad de estas células.
6. El tratamiento con los dendrímeros aniónicos 2G-S24P y 2G-S16 impidieron en gran medida la infección por el VIH de células Treg. Este efecto antiviral de los dendrímeros fue capaz de bloquear parcialmente los efectos de la infección sobre el fenotipo de las células Treg.

# 7. BIBLIOGRAFÍA



1. Kinter A, McNally J, Riggin L, Jackson R, Roby G, Fauci AS: **Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(9):3390-3395.
2. Robert A. Freitas J: **Current Status of Nanomedicine and Medical Nanorobotics.** *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience* 2005, **2**:1-25.
3. Shin TG, Muter D, Meissner J, Paris O, Findenegg GH: **Structural characterization of surfactant aggregates adsorbed in cylindrical silica nanopores.** *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2011, **27**(9):5252-5263.
4. Alivisatos P: **The use of nanocrystals in biological detection.** *Nature biotechnology* 2004, **22**(1):47-52.
5. Scida K, Stege PW, Haby G, Messina GA, Garcia CD: **Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: critical review.** *Analytica chimica acta* 2011, **691**(1-2):6-17.
6. Turner BG, Summers MF: **Structural biology of HIV.** *J Mol Biol* 1999, **285**(1):1-32.
7. Diskin R, Marcovecchio PM, Bjorkman PJ: **Structure of a clade C HIV-1 gp120 bound to CD4 and CD4-induced antibody reveals anti-CD4 polyreactivity.** *Nat Struct Mol Biol* 2010, **17**(5):608-613.
8. Kedzierska K, Crowe SM, Turville S, Cunningham AL: **The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages.** *Rev Med Virol* 2003, **13**(1):39-56.
9. Popov S, Rexach M, Zybarth G, Reiling N, Lee MA, Ratner L, Lane CM, Moore MS, Blobel G, Bukrinsky M: **Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex.** *EMBO J* 1998, **17**(4):909-917.
10. Pace MJ, Agosto L, Graf EH, O'Doherty U: **HIV reservoirs and latency models.** *Virology* 2011, **411**(2):344-354.
11. Pilcher CD, Eron JJ, Jr., Galvin S, Gay C, Cohen MS: **Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention.** *The Journal of clinical investigation* 2004, **113**(7):937-945.
12. Henderson LE, Bowers MA, Sowder RC, 2nd, Serabyn SA, Johnson DG, Bess JW, Jr., Arthur LO, Bryant DK, Fenselau C: **Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences.** *J Virol* 1992, **66**(4):1856-1865.
13. Clarke JR, Williamson JD, Mitchell DM: **Comparative study of the isolation of human immunodeficiency virus from the lung and peripheral blood of AIDS patients.** *J Med Virol* 1993, **39**(3):196-199.
14. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD: **HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time.** *Science* 1996, **271**(5255):1582-1586.
15. Persidsky Y, Poluektova L: **Immune privilege and HIV-1 persistence in the CNS.** *Immunol Rev* 2006, **213**:180-194.
16. Baltimore D: **RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses.** *Nature* 1970, **226**:1209-1211.



17. Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD: Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol* 1995, **69**(10):6239-6248.
18. Temin H, Mizutani S: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970, **226**:1211-1213.
19. McDougal J, Kennedy M, Slich J, Cort S, Mawle A, Nicholson J: Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 1986, **231**:382-385.
20. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, Hunt P, Martin JN, Kahn JO, Levy J *et al*: Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004, **104**(4):942-947.
21. Powderly WG, Landay A, Lederman MM: Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism? *JAMA* 1998, **280**(1):72-77.
22. Connors M, Kovacs JA, Krevat S, Gea-Banacloche JC, Sneller MC, Flanigan M, Metcalf JA, Walker RE, Falloon J, Baseler M *et al*: HIV infection induces changes in CD4+ T-cell phenotype and depletions within the CD4+ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med* 1997, **3**(5):533-540.
23. Holmes D, Jiang Q, Zhang L, Su L: Foxp3 and Treg cells in HIV-1 infection and immuno-pathogenesis. *Immunologic research* 2008, **41**(3):248-266.
24. Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, Barre-Sinoussi F, Delfraissy JF, Sinet M, Pancino G *et al*: HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(16):6776-6781.
25. Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N: T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* 1996, **9**(2):211-220.
26. Tang Q, Bluestone JA: The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature immunology* 2008, **9**(3):239-244.
27. Cvetanovich GL, Hafler DA: Human regulatory T cells in autoimmune diseases. *Current opinion in immunology* 2010, **22**(6):753-760.
28. Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY: Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 2008, **320**(5880):1220-1224.
29. Suchard MS, Mayne E, Green VA, Shalekoff S, Donninger SL, Stevens WS, Gray CM, Tiemessen CT: FOXP3 expression is upregulated in CD4T cells in progressive HIV-1 infection and is a marker of disease severity. *PloS one* 2010, **5**(7):e11762.
30. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K: The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Adv Immunol* 2010, **105**:99-130.
31. Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA: Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T

- cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol* 2006, **177**(1):192-200.
32. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M: **Regulatory T cells and immune tolerance.** *Cell* 2008, **133**(5):775-787.
  33. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY: **A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells.** *Nature immunology* 2005, **6**(11):1142-1151.
  34. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ *et al*: **IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo.** *Blood* 2006, **108**(5):1571-1579.
  35. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: **Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.** *Nature immunology* 2003, **4**(4):330-336.
  36. Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA: **Competition controls the rate of transition between the peripheral pools of CD4+CD25- and CD4+CD25+ T cells.** *International immunology* 2006, **18**(11):1607-1613.
  37. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsacker F, Thimme R: **T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection.** *Journal of virology* 2005, **79**(12):7860-7867.
  38. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedema F: **Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS.** *AIDS* 2003, **17**(13):1881-1888.
  39. Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, Mugenyi P, Cao H: **Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation.** *J Immunol* 2005, **174**(7):4407-4414.
  40. Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, Leelawong M, Sundrud MS, Haas DW, Unutmaz D: **HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells.** *PLoS biology* 2004, **2**(7):E198.
  41. Bi X, Suzuki Y, Gatanaga H, Oka S: **High frequency and proliferation of CD4+ FOXP3+ Treg in HIV-1-infected patients with low CD4 counts.** *European journal of immunology* 2009, **39**(1):301-309.
  42. Del Pozo-Balado Mdel M, Leal M, Mendez-Lagares G, Pacheco YM: **CD4(+)/CD25(+)/hi/CD127(lo) phenotype does not accurately identify regulatory T cells in all populations of HIV-infected persons.** *The Journal of infectious diseases* 2010, **201**(3):331-335.
  43. Moreno-Fernandez ME, Zapata W, Blackard JT, Franchini G, Chouhnet CA: **Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain.** *Journal of virology* 2009, **83**(24):12925-12933.
  44. Williams LM, Rudensky AY: **Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires**

- continued expression of Foxp3. *Nature immunology* 2007, 8(3):277-284.
45. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 2003, 198(12):1875-1886.
  46. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK: Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International immunology* 2007, 19(4):345-354.
  47. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM: Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007, 110(8):2983-2990.
  48. Huehn J, Polansky JK, Hamann A: Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature reviews Immunology* 2009, 9(2):83-89.
  49. Janson PC, Winerdal ME, Marits P, Thorn M, Ohlsson R, Winqvist O: FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PloS one* 2008, 3(2):e1612.
  50. Kauder SE, Bosque A, Lindqvist A, Planelles V, Verdin E: Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS pathogens* 2009, 5(6):e1000495.
  51. Fang JY, Mikovits JA, Bagni R, Petrow-Sadowski CL, Ruscetti FW: Infection of lymphoid cells by integration-defective human immunodeficiency virus type 1 increases de novo methylation. *Journal of virology* 2001, 75(20):9753-9761.
  52. Hunt PW, Landay AL, Sinclair E, Martinson JA, Hatano H, Emu B, Norris PJ, Busch MP, Martin JN, Brooks C *et al*: A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. *PloS one* 2011, 6(1):e15924.
  53. Jiao Y, Fu J, Xing S, Fu B, Zhang Z, Shi M, Wang X, Zhang J, Jin L, Kang F *et al*: The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8+ T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors. *Immunology* 2009, 128(1 Suppl):e366-375.
  54. Schulze Zur Wiesch J, Thomssen A, Hartjen P, Toth I, Lehmann C, Meyer-Olson D, Colberg K, Frerk S, Babikir D, Schmiedel S *et al*: Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. *Journal of virology* 2011, 85(3):1287-1297.
  55. Douek DC, Picker LJ, Koup RA: T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annual review of immunology* 2003, 21:265-304.
  56. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC: Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2008, 83(5):761-769.

57. Mamo T, Moseman EA, Kolishetti N, Salvador-Morales C, Shi J, Kuritzkes DR, Langer R, von Andrian U, Farokhzad OC: **Emerging nanotechnology approaches for HIV/AIDS treatment and prevention.** *Nanomedicine (Lond)* 2010, **5**(2):269-285.
58. Sprintz M, Benedetti C, Ferrari M: **Applied nanotechnology for the management of breakthrough cancer pain.** *Minerva anestesiologica* 2005, **71**(7-8):419-423.
59. Ferrari M: **Cancer nanotechnology: opportunities and challenges.** *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(3):161-171.
60. Mallipeddi R, Rohan LC: **Progress in antiretroviral drug delivery using nanotechnology.** *International journal of nanomedicine* 2010, **5**:533-547.
61. Rao KS, Ghorpade A, Labhasetwar V: **Targeting anti-HIV drugs to the CNS.** *Expert opinion on drug delivery* 2009, **6**(8):771-784.
62. Galan M, Sanchez-Rodriguez J, Cangiotti M, Garcia-Gallego S, Jimenez JL, Gomez R, Ottaviani MF, Munoz-Fernandez MA, de la Mata FJ: **Antiviral properties against HIV of water soluble copper carboxilane dendrimers and their EPR characterization.** *Current medicinal chemistry* 2012, **19**(29):4984-4994.
63. Boyapalle S, Mohapatra S: **Nanotechnology Applications to HIV Vaccines and Microbicides.** *Journal of global infectious diseases* 2012, **4**(1):62-68.
64. Chonco L, Pion M, Vacas E, Rasines B, Maly M, Serramia MJ, Lopez-Fernandez L, De la Mata J, Alvarez S, Gomez R *et al*: **Carboxilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile.** *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012, **161**(3):949-958.
65. Garcia-Gallego S, Rodriguez JS, Jimenez JL, Cangiotti M, Ottaviani MF, Munoz-Fernandez MA, Gomez R, de la Mata FJ: **Polyanionic N-donor ligands as chelating agents in transition metal complexes: synthesis, structural characterization and antiviral properties against HIV.** *Dalton Trans* 2012, **41**(21):6488-6499.
66. Farokhzad OC, Langer R: **Impact of nanotechnology on drug delivery.** *ACS nano* 2009, **3**(1):16-20.
67. das Neves J, Amiji MM, Bahia MF, Sarmiento B: **Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS.** *Advanced drug delivery reviews* 2010, **62**(4-5):458-477.
68. Kim BY, Rutka JT, Chan WC: **Nanomedicine.** *The New England journal of medicine* 2010, **363**(25):2434-2443.
69. Dykes GM, Brierley LJ, Smith DK, McGrail PT, Seeley GJ: **Supramolecular solubilisation of hydrophilic dyes by using individual dendritic branches.** *Chemistry* 2001, **7**(21):4730-4739.
70. Boas U, Heegaard PM: **Dendrimers in drug research.** *Chemical Society reviews* 2004, **33**(1):43-63.
71. Buhleier E, W. Wehner, and F. VÖGtle: **"Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies.** *Synthesis* 1978, **2**:155,158.
72. van der Made AW, van Leeuwen PWNM: **Silane dendrimers.** *J Chem Soc, Chem Commun* 1992(19):1400-1401.

73. Majoral JP, Caminade AM: **Dendrimers containing heteroatoms (si, p, B, ge, or bi)**. *Chem Rev* 1999, **99**(3):845-880.
74. Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A: **The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers**. *International journal of pharmaceutics* 2003, **252**(1-2):263-266.
75. Roberts JC, Bhalgat MK, Zera RT: **Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers**. *J Biomed Mater Res* 1996, **30**(1):53-65.
76. Nagahori N, Lee RT, Nishimura S, Page D, Roy R, Lee YC: **Inhibition of adhesion of type 1 fimbriated Escherichia coli to highly mannosylated ligands**. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 2002, **3**(9):836-844.
77. Patri AK, Majoros IJ, Baker JR: **Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery**. *Current opinion in chemical biology* 2002, **6**(4):466-471.
78. Jansen JF, de Brabander-van den Berg EM, Meijer EW: **Encapsulation of guest molecules into a dendritic box**. *Science* 1994, **266**(5188):1226-1229.
79. Gonzalo T, Clemente MI, Chonco L, Weber ND, Diaz L, Serramia MJ, Gras R, Ortega P, de la Mata FJ, Gomez R *et al*: **Gene therapy in HIV-infected cells to decrease viral impact by using an alternative delivery method**. *ChemMedChem* 2010, **5**(6):921-929.
80. Jimenez JL, Clemente MI, Weber ND, Sanchez J, Ortega P, de la Mata FJ, Gomez R, Garcia D, Lopez-Fernandez LA, Munoz-Fernandez MA: **Carbosilane dendrimers to transfect human astrocytes with small interfering RNA targeting human immunodeficiency virus**. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2010, **24**(5):331-343.
81. Weber N, Ortega P, Clemente MI, Shcharbin D, Bryszewska M, de la Mata FJ, Gomez R, Munoz-Fernandez MA: **Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes**. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2008, **132**(1):55-64.
82. Briz V, Serramia MJ, Madrid R, Hameau A, Caminade AM, Majoral JP, Munoz-Fernandez MA: **Validation of a generation 4 phosphorus-containing polycationic dendrimer for gene delivery against HIV-1**. *Current medicinal chemistry* 2012, **19**(29):5044-5051.
83. Cordoba EV, Pion M, Rasines B, Filippini D, Komber H, Ionov M, Bryszewska M, Appelhans D, Munoz-Fernandez MA: **Glycodendrimers as new tools in the search for effective anti-HIV DC-based immunotherapies**. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2013, **9**(7):972-984.
84. Pion M, Serramia MJ, Diaz L, Bryszewska M, Gallart T, Garcia F, Gomez R, de la Mata FJ, Munoz-Fernandez MA: **Phenotype and functional analysis of human monocytes-derived dendritic cells loaded with a carbosilane dendrimer**. *Biomaterials* 2010, **31**(33):8749-8758.
85. Supattapone S, Nguyen HO, Cohen FE, Prusiner SB, Scott MR: **Elimination of prions by branched polyamines and implications for**

- therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(25):14529-14534.
86. Klajnert B, Cortijo-Arellano M, Cladera J, Bryszewska M: **Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation.** *Biochemical and biophysical research communications* 2006, **345**(1):21-28.
  87. Klajnert B, Cortijo-Arellano M, Bryszewska M, Cladera J: **Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases.** *Biochemical and biophysical research communications* 2006, **339**(2):577-582.
  88. Ziemba B, Franiak-Pietryga I, Pion M, Appelhans D, Munoz-Fernandez MA, Voit B, Bryszewska M, Klajnert-Maculewicz B: **Toxicity and proapoptotic activity of poly(propylene imine) glycodendrimers in vitro: Considering their contrary potential as biocompatible entity and drug molecule in cancer.** *International journal of pharmaceutics* 2014, **461**(1-2):391-402.
  89. Gras R, Almonacid L, Ortega P, Serramia MJ, Gomez R, de la Mata FJ, Lopez-Fernandez LA, Munoz-Fernandez MA: **Changes in gene expression pattern of human primary macrophages induced by carbosilane dendrimer 2G-NN16.** *Pharmaceutical research* 2009, **26**(3):577-586.
  90. Sánchez-Nieves J P-BAJ, Ortega P, Corbí A.L, Domínguez-Soto A, Muñoz-Fernandez M.A, Gómez R. and de la Mata F.J: **Study of cationic carbosilane dendrimers as potential activating stimuli in macrophages.** *RSC Adv* 2013, **3**:23445-23453.
  91. Gong Y, Matthews B, Cheung D, Tam T, Gadawski I, Leung D, Holan G, Raff J, Sacks S: **Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication.** *Antiviral research* 2002, **55**(2):319-329.
  92. Vacas Cordoba E, Arnaiz E, Relloso M, Sanchez-Torres C, Garcia F, Perez-Alvarez L, Gomez R, de la Mata FJ, Pion M, Munoz-Fernandez MA: **Development of sulphated and naphthylsulphonated carbosilane dendrimers as topical microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission.** *AIDS* 2013, **27**(8):1219-1229.
  93. Cordoba EV, Arnaiz E, De La Mata FJ, Gomez R, Leal M, Pion M, Munoz-Fernandez MA: **Synergistic activity of carbosilane dendrimers in combination with maraviroc against HIV in vitro.** *AIDS* 2013.
  94. Ortega P, Copa-Patino JL, Munoz-Fernandez MA, Soliveri J, Gomez R, de la Mata FJ: **Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies.** *Organic & biomolecular chemistry* 2008, **6**(18):3264-3269.
  95. Razinkov V, Gazumyan A, Nikitenko A, Ellestad G, Krishnamurthy G: **RFI-641 inhibits entry of respiratory syncytial virus via interactions with fusion protein.** *Chemistry & biology* 2001, **8**(7):645-659.
  96. Garcia-Merino I, de Las Cuevas N, Jimenez JL, Gallego J, Gomez C, Prieto C, Serramia MJ, Lorente R, Munoz-Fernandez MA: **The Spanish HIV BioBank: a model of cooperative HIV research.** *Retrovirology* 2009, **6**:27.

97. Mikovits JA, Young HA, Vertino P, Issa JP, Pitha PM, Turcoski-Corrales S, Taub DD, Petrow CL, Baylin SB, Ruscetti FW: Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production. *Molecular and cellular biology* 1998, **18**(9):5166-5177.
98. Bermejo JF, Ortega P, Chonco L, Eritja R, Samaniego R, Mullner M, de Jesus E, de la Mata FJ, Flores JC, Gomez R *et al*: Water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chemistry* 2007, **13**(2):483-495.
99. Cordoba EV, Arnaiz E, Relloso M, Sanchez-Torres C, Garcia F, Perez-Alvarez L, Gomez R, de la Mata FJ, Pion M, Munoz-Fernandez MA: Development of sulphated and naphthylsulfonated carbosilane dendrimers as topical microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission. *AIDS* 2013.
100. van Maurik A, Herber M, Wood KJ, Jones ND: Cutting edge: CD4+CD25+ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8+ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J Immunol* 2002, **169**(10):5401-5404.
101. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S: Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999, **163**(10):5211-5218.
102. Dittmer U, He H, Messer RJ, Schimmer S, Olbrich AR, Ohlen C, Greenberg PD, Stromnes IM, Iwashiro M, Sakaguchi S *et al*: Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity* 2004, **20**(3):293-303.
103. Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, Reid SP, Levy DE, Bromberg JS: Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol* 2009, **182**(1):259-273.
104. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D *et al*: Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009, **30**(6):899-911.
105. Josefowicz SZ, Rudensky A: Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009, **30**(5):616-625.
106. Mendez-Lagares G, Pozo-Balado MM, Genebat M, Garcia Perganeda A, Leal M, Pacheco YM: Severe immune dysregulation affects CD4(+)CD25(hi)FoxP3(+) regulatory T cells in HIV-infected patients with low-level CD4 T-cell repopulation despite suppressive highly active antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases* 2012, **205**(10):1501-1509.
107. Kohler A, Schmithorst V, Filippi MD, Ryan MA, Daria D, Gunzer M, Geiger H: Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. *Blood* 2009, **114**(2):290-298.
108. Caligiuri MA: Human natural killer cells. *Blood* 2008, **112**(3):461-469.

109. Lanier LL: **Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition.** *Nature immunology* 2008, **9**(5):495-502.
110. Walzer T, Blery M, Chaix J, Fusser N, Chasson L, Robbins SH, Jaeger S, Andre P, Gauthier L, Daniel L *et al*: **Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(9):3384-3389.
111. Wendt K, Wilk E, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R: **Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets.** *Immunology* 2007, **122**(4):486-495.
112. Zimmer J, Andres E, Hentges F: **NK cells and Treg cells: a fascinating dance cheek to cheek.** *European journal of immunology* 2008, **38**(11):2942-2945.
113. Li Q, Lu F, Wang K: **Modeling of HIV-1 infection: insights to the role of monocytes/macrophages, latently infected T4 cells, and HAART regimes.** *PloS one* 2012, **7**(9):e46026.
114. Cloke T, Munder M, Taylor G, Muller I, Kropf P: **Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection.** *PloS one* 2012, **7**(11):e48939.
115. Schaier M, Seissler N, Schmitt E, Meuer S, Hug F, Zeier M, Steinborn A: **DR(high+)CD45RA(-)-Tregs potentially affect the suppressive activity of the total Treg pool in renal transplant patients.** *PloS one* 2012, **7**(3):e34208.
116. Cordoba EV, Bastida H, Pion M, Hameau A, Ionov M, Bryszewska M, Caminade AM, Majoral JP, Munoz-Fernandez MA: **HIV-Antigens Charged on Phosphorus Dendrimers as Tools for Tolerogenic Dendritic Cells-Based Immunotherapy.** *Current medicinal chemistry* 2013.
117. Cordoba EV, Arnaiz E, De La Mata FJ, Gomez R, Leal M, Pion M, Munoz-Fernandez MA: **Synergistic activity of carbosilane dendrimers in combination with maraviroc against HIV in vitro.** *AIDS* 2013, **27**(13):2053-2058.
118. Sepulveda-Crespo D, Lorente R, Leal M, Gomez R, De la Mata FJ, Jimenez JL, Munoz-Fernandez MA: **Synergistic activity profile of carbosilane dendrimer G2-STE16 in combination with other dendrimers and antiretrovirals as topical anti-HIV-1 microbicide.** *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2013.
119. Garcia JV, Miller AD: **Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef.** *Nature* 1991, **350**(6318):508-511.
120. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wiczorek G, Olek S, Dietmaier W, Andreesen R, Edinger M: **Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation.** *European journal of immunology* 2009, **39**(4):1088-1097.
121. Foxall RB, Albuquerque AS, Soares RS, Baptista AP, Cavaleiro R, Tendeiro R, Gomes P, Victorino RM, Sousa AE: **Memory and naive-like regulatory CD4+ T cells expand during HIV-2 infection in direct association with CD4+ T-cell depletion irrespectively of viremia.** *AIDS* 2011, **25**(16):1961-1970.



122. Card CM, Keynan Y, Lajoie J, Bell CP, Dawood M, Becker M, Kasper K, Fowke KR: HIV controllers are distinguished by chemokine expression profile and HIV-specific T-cell proliferative potential. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012, **59**(5):427-437.
123. Presicce P, Orsborn K, King E, Pratt J, Fichtenbaum CJ, Chougnet CA: Frequency of circulating regulatory T cells increases during chronic HIV infection and is largely controlled by highly active antiretroviral therapy. *PloS one* 2011, **6**(12):e28118.
124. Waterhouse PM, Wang MB, Lough T: Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001, **411**(6839):834-842.
125. Youngblood B, Reich NO: The early expressed HIV-1 genes regulate DNMT1 expression. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2008, **3**(3):149-156.
126. Lal G, Bromberg JS: Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 2009, **114**(18):3727-3735.
127. Ji J, Cloyd MW: HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. *International immunology* 2009, **21**(3):283-294.
128. Wan YY, Flavell RA: Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007, **445**(7129):766-770.
129. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO: Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 2010, **32**(5):642-653.
130. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, Sakaguchi S: Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *International immunology* 2006, **18**(8):1197-1209.
131. Veldman C, Pahl A, Beissert S, Hansen W, Buer J, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M: Inhibition of the transcription factor Foxp3 converts desmoglein 3-specific type 1 regulatory T cells into Th2-like cells. *J Immunol* 2006, **176**(5):3215-3222.
132. Buonaguro L, Tornesello ML, Gallo RC, Marincola FM, Lewis GK, Buonaguro FM: Th2 polarization in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects, as activated by HIV virus-like particles. *Journal of virology* 2009, **83**(1):304-313.
133. Arruvito L, Sabatte J, Pandolfi J, Baz P, Billordo LA, Lasala MB, Salomon H, Geffner J, Fainboim L: Analysis of suppressor and non-suppressor FOXP3+ T cells in HIV-1-infected patients. *PloS one* 2012, **7**(12):e52580.
134. Nicholas KJ, Zern EK, Barnett L, Smith RM, Lorey SL, Copeland CA, Sadagopal S, Kalams SA: B Cell Responses to HIV Antigen Are a Potent Correlate of Viremia in HIV-1 Infection and Improve with PD-1 Blockade. *PloS one* 2013, **8**(12):e84185.
135. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S: Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell

- subpopulation. *The Journal of experimental medicine* 1996, 184(2):387-396.
136. Tellier J, van Meerwijk JP, Romagnoli P: An MHC-linked locus modulates thymic differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *International immunology* 2006, 18(11):1509-1519.
  137. Correa R, Munoz-Fernandez MA: Viral phenotype affects the thymic production of new T cells in HIV-1-infected children. *AIDS* 2001, 15(15):1959-1963.
  138. Plesa G, Dai J, Baytop C, Riley JL, June CH, O'Doherty U: Addition of deoxynucleosides enhances human immunodeficiency virus type 1 integration and 2LTR formation in resting CD4+ T cells. *Journal of virology* 2007, 81(24):13938-13942.
  139. Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Klomp LW, Wijmenga C, Duckett CS, Nabel GJ: The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature* 2003, 426(6968):853-857.
  140. Weiss L, Piketty C, Assoumou L, Didier C, Caccavelli L, Donkova-Petrini V, Levy Y, Girard PM, Burgard M, Viard JP *et al*: Relationship between regulatory T cells and immune activation in human immunodeficiency virus-infected patients interrupting antiretroviral therapy. *PloS one* 2010, 5(7):e11659.
  141. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA: IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007, 178(1):280-290.
  142. Kryworuchko M, Pasquier V, Theze J: Human immunodeficiency virus-1 envelope glycoproteins and anti-CD4 antibodies inhibit interleukin-2-induced Jak/STAT signalling in human CD4 T lymphocytes. *Clinical and experimental immunology* 2003, 131(3):422-427.
  143. Malek TR, Porter BO, Codias EK, Scibelli P, Yu A: Normal lymphoid homeostasis and lack of lethal autoimmunity in mice containing mature T cells with severely impaired IL-2 receptors. *J Immunol* 2000, 164(6):2905-2914.
  144. Pion M, Jaramillo-Ruiz D, Martinez A, Munoz-Fernandez MA, Correa-Rocha R: HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene. *AIDS* 2013, 27(13):2019-2029.
  145. Sakaguchi S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* 2005, 6(4):345-352.
  146. El-Sayed M, Ginski M, Rhodes C, Ghandehari H: Transepithelial transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2002, 81(3):355-365.
  147. Rittner K, Benavente A, Bompard-Sorlet A, Heitz F, Divita G, Brasseur R, Jacobs E: New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2002, 5(2):104-114.

148. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA: **FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system.** *Nature reviews Immunology* 2010, **10**(7):490-500.
149. Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F: **CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro.** *European journal of immunology* 1998, **28**(11):3435-3447.
150. Patton DT, Wilson MD, Rowan WC, Soond DR, Okkenhaug K: **The PI3K p110delta regulates expression of CD38 on regulatory T cells.** *PLoS One* 2011, **6**(3):e17359.
151. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP: **Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes.** *Nature medicine* 2008, **14**(1):88-92.
152. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, Aiello S, Cassis L, Gotti E, Gaspari F *et al*: **Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2007, **18**(3):1007-1018.
153. Xiao J, Qian KL, Cao QH, Qiu CL, Qiu C, Xue YL, Zhang XY, Zhong P, Xu JQ, Li MY *et al*: **HLA-DR expression on regulatory T cells is closely associated with the global immune activation in HIV-1 infected subjects naive to antiretroviral therapy.** *Chin Med J (Engl)* 2011, **124**(15):2340-2346.
154. Schaier M, Seissler N, Becker LE, Schaefer SM, Schmitt E, Meuer S, Hug F, Sommerer C, Waldherr R, Zeier M *et al*: **The extent of HLA-DR expression on HLA-DR(+) Tregs allows the identification of patients with clinically relevant borderline rejection.** *Transpl Int* 2013, **26**(3):290-299.
155. Trzonkowski P, Szarynska M, Mysliwska J, Mysliwski A: **Ex vivo expansion of CD4(+)CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy.** *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2009, **75**(3):175-188.
156. Tran DQ, Shevach EM: **Therapeutic potential of FOXP3(+) regulatory T cells and their interactions with dendritic cells.** *Human immunology* 2009, **70**(5):294-299.
157. Hori S, Sakaguchi S: **Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells.** *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2004, **6**(8):745-751.
158. Miyara M, Wing K, Sakaguchi S: **Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2009, **123**(4):749-755; quiz 756-747.
159. Scordi-Bello IA, Mosoian A, He C, Chen Y, Cheng Y, Jarvis GA, Keller MJ, Hogarty K, Waller DP, Profy AT *et al*: **Candidate sulfonated and sulfated topical microbicides: comparison of anti-human immunodeficiency virus activities and mechanisms of action.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005, **49**(9):3607-3615.