



## Variabilidad en genes de respuesta inmune: papel en la infección por VIH-1 y envejecimiento natural

Marina Laplana Lafaja

Dipòsit Legal: L. 976-2012  
<http://hdl.handle.net/10803/101203>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

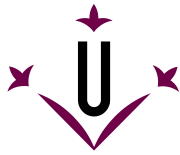
Variabilidad en genes de  
respuesta inmune:  
papel en la infección por VIH-1  
y envejecimiento natural



Marina Laplana Lafaja

Tesis Doctoral - Julio 2012





**Universitat de Lleida**  
Departament de Ciències  
Mèdiques Bàsiques



**Institut de Recerca  
Biomèdica de Lleida**

# Variabilidad en genes de respuesta inmune: papel en la infección por VIH-1 y envejecimiento natural

Memoria presentada por:  
**Marina Laplana Lafaja**

Para optar al grado de:  
**Doctora por la Universitat de Lleida**

Director:  
**Dr. Joan Fibla Palazón**  
Lleida, Julio de 2012

Diseño de la portada:  
Miquel Castro

*A mis padres  
A mis abuelos  
A mi hermana  
A Miquel*



*“La vida precede a la reproducción.  
Hay moléculas de ADN que pueden reproducirse  
y no tienen nada de vida.  
La vida es mucho más que eso.”*

*Lynn Margulis*





# ***AGRADECIMIENTOS***

---

Escribiendo estas palabras me doy cuenta de que un capítulo muy importante en mi vida llega a su fin. Estos últimos cuatro años de formación predoctoral han estado llenos de buenos momentos, compartidos con gente excepcional que han logrado que siempre vaya a recordar esta etapa. Por ello, quisiera agradecer sin olvidar a nadie, todo el soporte y ánimos que he recibido de manera incondicional durante este tiempo.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi tutor, el Dr. Joan Fibla, por acogerme en el Grupo de Genética de Enfermedades Complejas. Gràcies pel teu esforç i ajuda durant aquests 4 anys, moltíssimes gràcies per haver-me ensenyat que és això de la recerca i tantes altres coses. Sense tu, no hauria acabat mai aquesta tesi. Espero que mantinguem la nostra relació durant molts anys, mereixerà la pena.

En segundo lugar quiero mencionar a las entidades que con su contribución económica han hecho posible la realización de los estudios incluidos en estas páginas. Gracias al soporte de la Universitat de Lleida por su beca de investigadora en formación y por todas las ayudas complementarias para congresos y estancias. Gracias al Ministerio de Ciencia e Innovación, al Fondo de Investigación Sanitaria y a la “Fundació Marató de TV3” porque la financiación de sus proyectos ha permitido realizar los estudios incluidos en esta tesis (CGL 2207-62875; FIS, PI051778; y ref 020730, respectivamente).

Gracias a los miembros del tribunal por su participación desinteresada. Gracias al apoyo administrativo de la sección de doctorado, gestión de ayudas, secretaria del departamento, etc., gracias por hacer tan bien vuestro trabajo y facilitarnos tanto el nuestro.

Asimismo, debo agradecer a todas las personas que participaron de forma voluntaria en estos estudios, así como a sus familias, la contribución altruista a la ciencia y la donación de muestras. Sin ellos nunca habría podido realizar esta tesis. Además, quiero dar las gracias a los facultativos por la tarea de recogida de muestras y de recopilación de información.

Quiero dar las gracias a las personas que me iniciaron en el mundo de la ciencia. A los 14 años decidí que me quería dedicar a la genética. Más tarde, mi profesor de ciencias Jordi Sanfeliu me introdujo en la ciencia y juntos conseguimos un

Cirit. Gràcies Jordi per mostrar tant interès en la ciència i per intentar que els joves la visquin com tu.

Más tarde, estudié biología en la Universitat de Barcelona. En esos 4 años conocí personas estupendas que siempre me acompañarán. Entre ellos, el Dr. Francesc Mestres que me brindó la oportunidad de entrar en el primer laboratorio de investigación en genética. Francesc, gràcies per la oportunitat que em vas donar, per confiar en mi i per encoratjar-me a continuar en el món de la recerca. Gràcies per mantenir el contacte després de tant de temps i per ser una cara amiga als congressos.

Finalmente, tras hacer prácticas en el CSIC, el IRBI de Tours y el IRTA de Lleida, terminé haciendo la tesis en el Grup de Genètica de Malalties Complexes del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida.

Quiero dar las gracias al Dr. Antonio Caruz. Gracias por haberme abierto las puertas de tu laboratorio, por haberme enseñado técnicas nuevas y a “cuidar de las celulitas”. Gracias a todos los compañeros de Jaén, Mamen, M<sup>a</sup> Carmen, Ana Isabel, Anabel, Jaime... Gracias por ayudarme y hacer mi estancia tan divertida.

Quisiera agradecer a una persona toda la ayuda que me ha brindado estos años. Gràcies Rosa, per escoltar-me, per entendre'm i donar-me consells tant professionals com personals durant aquests últims 4 anys, m'has acompanyat en aquest camí donant-me la mà perquè no caigués. D'aquí surt una amistat que espero no vull perdre mai.

Gracias a todos los compañeros de laboratorio. Neus, gràcies pels bons moments i el teu suport, vas aparèixer tard però sempre hi seràs. Inma, gracias por hacerme reír en los malos momentos y por tu apoyo técnico estos años. Manu, gracias por estar siempre dispuesto a ayudar y por apoyarme este tiempo, no cambies nunca. Gràcies Laura, viatges i xerrades sempre acompanyats d'un somriure capaç d'alegrar el dia. D'aquí ha sortit una bona amistat. Hugo, gracias por dar tu toque distintivo a todo, haces sentir bien a la gente en cualquier momento y siempre se puede contar contigo para echarse unas risas.

Mai oblidaré els bons moments a la xocolatera. Gràcies Èlia, Núria V, M<sup>a</sup> José, Stef, Myriam, Ana, Mari Alba, Jordi, Elisa, Quim, Isu, Esther V, Montse, Armando, Roser... Gràcies per les converses ultraràpides entre neveres i congeladors del passadís. Gràcies Dani, David dL, Siba, Irene, Núria B, Anna C, Meri, Esther, Maria, Judit, Alejandra, Bupesh, Hiren, Joaquim E... Tots vosaltres m'heu acompanyat i donat suport en aquest camí. Gràcies David A per saber on està tot, ets el manetes

de la casa, ens fas la feina més fàcil! Gràcies Judit R per les nostres converses, ens hem trobat tard però ha estat genial.  
Espero no haberme dejado a nadie!

Quiero dar las gracias a TODA mi familia. Gracias por apoyarme, Concha, Chon, Chente, Toño, Cristina C, Álvaro, Agustín, Nieves, Javier, Cristina G... Gràcies Josep i Carmen per haver-me acollit com un més de la família i cuidar-me tant.

Gracias a mis abuelos, por ser un ejemplo a seguir y apoyarme en todo. De mayor quiero ser como vosotros.

Gracias a mi hermana. Adela, gracias por ser como eres, por estar siempre ahí. Gracias por no necesitar palabras ni explicaciones para entenderme. Cuando uno se mira en tus ojos se ve capaz de cualquier cosa.

Gracias a Miquel, perquè només necessites un gest, una mirada per tornar el meu dia lluminós. Gràcies per aguantar els rotllos sobre la tesi i el laboratori, sense tu hagués patit una crisi d'ansietat. Gràcies pel temps passat fent-me tapes, parlant de PCRs i per tota la resta. Gràcies per estar al meu costat. Viure la vida amb tu és un plaer.

Por último quiero dar las gracias a las personas responsables de que haya llegado hasta aquí, mis padres. Gracias por animarme a cumplir mis sueños y esforzaros al máximo para que lo consiguiera, me lo habéis dado todo. Me habéis educado, me habéis inculcado unos valores y me habéis dejado volar, todo en su justa medida. Poder dedicarte a lo que te gusta y te apasiona es un lujo que no mucha gente puede permitirse. Nunca os lo podré agradecer lo suficiente.

¡! GRACIAS ¡!



## RESUMEN

---

La modulación inadecuada o el mantenimiento de forma crónica de la respuesta inmune puede provocar efectos adversos en sistemas y órganos y dar lugar a la manifestación de patologías. Por ello, los mecanismos de regulación de la respuesta inmune son un elemento clave para el mantenimiento de un estado de salud óptimo y un envejecimiento saludable. La capacidad de organizar una respuesta inmune contra agentes patógenos o células tumorales está en parte determinada por la fondo genético de cada individuo. Los estudios de asociación genética han resultado de utilidad para identificar variantes de genes de respuesta inmune implicadas en patologías que van desde el cáncer o las enfermedades cardiovasculares a infecciones como la tuberculosis o el VIH-1.

En la presente tesis se ha estudiado la variabilidad de genes de respuesta inmune y su papel en dos modelos distintos: la infección por VIH-1 y el proceso de envejecimiento natural. En el primer modelo se ha estudiado la variabilidad del gen *BST-2*, factor de restricción en la infección por VIH-1, y de los genes *CYP27B1*, *GC* y *VDR*, implicados en la síntesis, transporte y acción genómica de la vitamina D, hormona implicada en la modulación de la respuesta inmune. Asimismo, en el segundo modelo, se ha evaluado el efecto de la variabilidad del gen *VDR* y de los genes *RANTES* y *CCR5*, implicados en la mediación de la respuesta inflamatoria.

En el modelo de infección por VIH-1, se han identificado 2 variantes del gen *BST-2* asociadas con progresión, una que captura la variabilidad de la región genómica y otra con potencial efecto funcional. En el estudio de variantes de los genes *VDR*, *CYP27B1* y *GC* con el ritmo de progresión de la infección se ha confirmado y ampliado el número de marcadores del gen *VDR* que muestran asociación con progresión. Las combinaciones haplotípicas del gen *VDR* que se asocian con progresión son aquellas que optimizan la respuesta a la vitamina D. Estos resultados pueden interpretarse en función del papel dual de la vitamina D en la modulación de la respuesta inmune. La asociación con progresión de las variantes identificadas incrementa su significación en los pacientes reclutados en el periodo pre-TARGA (anterior a 1997).

En el modelo de envejecimiento natural, variantes del gen *VDR* muestran asociación con envejecimiento saludable en hombres. Las variantes asociadas son aquellas que confieren una capacidad de respuesta intermedia a la vitamina D. Ello revela el papel de la vitamina D en envejecimiento y enfatiza la importancia del fondo genético al establecer los niveles óptimos de vitamina D para un envejecimiento saludable. En relación a los polimorfismos de los genes *CCR5* y *RANTES* no se ha encontrado asociación significativa para el *locus CCR5*, aunque los resultados muestran una mayor prevalencia de la variante no funcional, y por lo tanto peor mediadora de la respuesta inflamatoria, en individuos longevos. En cuanto a las variantes del gen *RANTES*, los resultados indican una asociación específica de sexo que sugiere la existencia de un determinante genético de *RANTES* que predispone a un fenotipo proinflamatorio en los varones y a un fenotipo anti-inflamatorio en las mujeres.



## RESUM

---

La modulació inadequada o el manteniment de forma crònica de la resposta immune poden provocar efectes adversos a sistemes i òrgans i donar lloc a la manifestació de patologies. En aquest context, els mecanismes de regulació de la resposta immune són un element clau per mantenir un estat òptim de salut i un envelliment saludable. La capacitat d'organitzar una resposta immune contra agents patògens o cèl·lules tumorals està en part determinada pel fons genètic de cada individu. Els estudis d'associació genètica han resultat d'utilitat per identificar variants de gens de resposta immune implicades en patologies que van des del càncer o les malalties cardiovasculars a infeccions com la tuberculosi o el VIH-1.

En la present tesi s'ha estudiat la variabilitat de gens de resposta immune i el seu paper en dos models diferents: la infecció per VIH-1 i el procés d'envelliment natural. En el primer model s'ha estudiat la variabilitat del gen *BST-2*, factor de restricció en la infecció per VIH-1, i dels gens *CYP27B1*, *GC* i *VDR*, implicats en la síntesi, transport i acció genòmica de la vitamina D, hormona implicada en la modulació de la resposta immune. Així mateix, al segon model s'ha avaluat l'efecte de la variabilitat del gen *VDR* i dels gens *RANTES* i *CCR5*, implicats en la mediació de la resposta inflamatòria.

En el model d'infecció per VIH-1 s'han identificat 2 variants del gen *BST-2* associades amb progressió, una captura la variabilitat de la regió genòmica i l'altra amb potencial efecte funcional. En l'estudi de la relació de variants dels gens *VDR*, *CYP27B1* i *GC* amb el ritme de progressió de la infecció s'han confirmat i ampliat el nombre de marcadors del gen *VDR* que mostren associació amb progressió. Les combinacions haplotípiques del gen *VDR* que s'associen amb progressió són aquelles que optimitzen la resposta a la vitamina D. Aquests resultats poden interpretar-se en funció del paper dual de la vitamina D en la modulació de la resposta immune. L'associació amb progressió de les variants identificades és més significativa en els pacients reclutats en el període pre-TARGA (anterior a 1997).

En el model d'envelliment natural, variants del gen *VDR* mostren associació amb envelliment saludable en homes. Les variants associades són aquelles que confereixen una capacitat de resposta intermèdia a la vitamina D. Això emfatitza el paper de la vitamina D en envelliment i posa de manifest la importància del fons genètic a l'hora d'establir els nivells òptims de vitamina D per a un envelliment saludable. En relació als polimorfismes dels gens *CCR5* i *RANTES* no s'ha trobat associació significativa pel *locus CCR5*, encara que els resultats mostren una major prevalença de la variant no funcional, i per tant pitjor medidora de la resposta inflamatòria, en individus longeus. Quant a les variants del gen *RANTES*, els resultats indiquen una associació específica de sexe que suggereix l'existència d'un determinant genètic de *RANTES* que predisposa a un fenotip proinflamatori en homes i a un fenotip antiinflamatori en dones.





## ABSTRACT

---

The improper balance or the maintenance of a chronic immune response can produce adverse effects on organs and systems and prone to diseases. Therefore, the regulatory mechanisms of the immune response are key factors to maintain an optimal health status and to follow a healthy aging. The capacity to produce an immune response against pathogens or tumour cells is partially determined by the genetic background of the individual. Genetic association studies have been useful to identify variants of immune response genes involved in diseases ranging from cancer or cardiovascular disease to infections such as tuberculosis or HIV-1.

In this thesis we have studied the variability of immune response genes and their role in two models: the HIV-1 infection and the natural aging process. In the first model it has been studied the variability of *BST-2* gene, which is an HIV restriction factor, and *CYP27B1*, *GC* and *VDR* genes, that are involved in the synthesis, transport and genomic action of vitamin D, hormone that modulates the immune response. In the second model, we have also evaluated the effect of *VDR* gene variability as well as *RANTES* and *CCR5* gene variants, both involved in mediating the inflammatory response.

In the model of the HIV-1 infection we have identified two variants of *BST-2* gene associated with progression, one that captures the variability of the genomic region and the other with potential functional effect. In the study of *VDR*, *CYP27B1* and *GC* gene variants related to progression rates we have confirmed and extended the number of *VDR* gene markers showing association with progression. The *VDR* gene haplotype combinations that are associated with progression are those that optimize the response to vitamin D. These results should be interpreted as a con to the dual role of vitamin D in the modulation of the immune response. The association with progression of the identified variants is significantly increased in patients enrolled in the pre-HAART (before 1997).

In the model of aging, *VDR* gene variants were most associated with healthy aging in men. The associated variants are those that confer an intermediate responsiveness to vitamin D. This reveals the role of vitamin D in aging and emphasizes the role of genetic background in determining optimal levels of vitamin D for healthy aging. In relation to polymorphisms of *CCR5* and *RANTES* genes we do not found significant association for the *CCR5* locus, although the results show a higher prevalence of non-functional variant, and thus a poorer mediator of the inflammatory response, in long-lived individuals. In relation to *RANTES* gene variants, the results indicate a sex-specific association suggesting the existence of a genetic determinant of *RANTES* that predisposes to a proinflammatory phenotype in males and an anti-inflammatory phenotype in females.



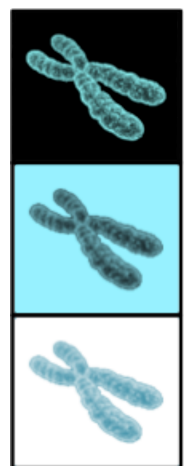
## ABREVIATURAS

---

ACE	Enzima convertidora de angiotensina I
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
ADNc	Ácido DesoxirriboNucleico complemenatrio
ADVP	Adictos a Droga por Vía Parenteral
AMP	<i>AntiMicrobial Peptide</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
APOBEC3G	<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G</i>
APOE	Apolipoproteína E
ARN	Ácido RiboNucleico
ARNm	Ácido RiboNucleico Mensajero
AVIP	Cohorte ADVP, VIH+, Progresión
BCSF	Factor de crecimiento de linfocitos B
BST-2	<i>Bone Marrow Stromal Antigen 2</i>
CCL	Ligando de quimiocina CC
CCR	Receptor-CC de quimiocinas
CDC	Centro para el control de enfermedades
CEU	<i>Utah residents with ancestry from northern and western Europe</i>
Célula NK	Célula <i>natural killer</i>
CHAK	Células asesinas activadas por quimiocinas-CC
CPA	Células presentadoras de antígenos
CXCR4	Receptor-CXC de citocinas 4
CYP24A1	Enzima 1,25-dihidroxitamina D3 24-hidroxilasa
CYP27A1	Enzima citocromo P450 esteroles 27-hidroxilasa
CYP27B1	Enzima citocromo P450 25-hidroxitamina D3 1 $\alpha$ -hidroxilasa
DBP	<i>vitamin D Binding Protein</i>
DC	Células dendríticas
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENI	Expuestos No Infectados
fMLP	<i>Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine</i>
GC	<i>Group-specific Component</i>
GM-CSF	Factor de crecimiento de macrófagos y granulocitos
Gp	Glucoproteína
GPI	Glucosil-fosfatidilinositol
HLA	Antígeno leucocitario humano
Hsp	<i>Heat Shock Protein</i>
IFN	InterFerón
Ig	InmunoGlobulina
IGF-1R	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IL	InterLeucina
Kb	Kilobases
KDa	KiloDalton
LD	Desequilibrio de Ligamiento
LTNP	<i>Long Term Non Progressors</i>

LTR	Repetición terminal larga
LUC	Luciferasa
MAC	Macrófago
MARS	proteínas de Mitocondrias, Aberrantes, Radicales libres y Scavenger
MASP	<i>Mannose-Associated Serine Protease</i>
Mb	Megabases
MBP	Proteína de unión a manosa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor <math>\kappa</math>B</i>
Ns	No Significativo
PABP	<i>Poly A Binding Protein</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3KCB	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RGA	Riesgo Genético Acumulado
SAMHD1	<i>SAM domain and HD domain-containing protein 1</i>
SC	Sin cambios
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de la InmunoDeficiencia Adquirida
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNPSpD	<i>SNP Spectral Decomposition</i>
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena sencilla
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TARGA	Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad
Tc	Linfocito T citotóxico
TCGF	Factor de crecimiento de linfocitos T
TCR	Receptor del linfocito T
Th	Linfocito T colaborador
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	Linfocito T regulador
TRIM5 $\alpha$	<i>TRIPartite Motif-containing protein 5 <math>\alpha</math></i>
UTR	<i>UnTranslated Region</i>
UV	UltraVioleta
VDR	Receptor de vitamin D
VHC	Virus de la Hepatitis C
Vif	<i>Viral Infectivity Factor</i>
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
VIH+	Individuo infectado por el VIH-1
Vpu	<i>Viral Protein U</i>

# ÍNDICES





# ÍNDICE

---

<b>1.- SISTEMA INMUNE INNATO.....</b>	<b>3</b>
1.1.- EL SISTEMA HLA .....	4
1.2.- RESPUESTA CELULAR INNATA.....	5
1.3.- RESPUESTA HUMORAL O QUÍMICA.....	7
1.3.1.- <i>Citocinas</i> .....	8
1.3.2.- <i>Respuesta inflamatoria</i> .....	10
1.4.- RESPUESTA MEDIADA POR LA CASCADA DEL COMPLEMENTO .....	11
1.5.- RESPUESTA MEDIADA POR FACTORES AMBIENTALES.....	13
1.6.- FACTORES DE RESTRICCIÓN DEL HUÉSPED .....	14
<b>2.- SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO.....</b>	<b>16</b>
<b>3.- RESPUESTA INMUNE E INFECCIÓN POR VIH-1 .....</b>	<b>18</b>
3.1.- ESTRUCTURA DEL VIH-1 .....	18
3.2.- MATERIAL GENÉTICO DEL VIH-1.....	19
3.3.- CICLO VITAL DEL VIH-1.....	21
3.4.- HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y PROGRESIÓN A SIDA .....	24
3.5.- MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DEL VIH-1.....	27
3.6.- CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR VIH-1 .....	28
3.7.- CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN SU RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR VIH-1 .....	30
3.8.- RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VIH-1 .....	32
3.9.- FACTORES GENÉTICOS DEL HUÉSPED FRENTE AL VIH-1.....	33
<b>4.- SISTEMA INMUNE Y ENVEJECIMIENTO .....</b>	<b>35</b>
4.1.- TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO .....	37
4.2.- PERSPECTIVA EPIDEMIOLÓGICO-EVOLUTIVA DEL ENVEJECIMIENTO.....	38
4.3.- RESPUESTA INMUNE Y ENVEJECIMIENTO .....	40
4.3.1.- <i>Inflamación y envejecimiento: Inflamm-aging</i> .....	40
4.3.2.- <i>Efectos del envejecimiento en las células del sistema inmune innato</i> ....	42
4.3.3.- <i>Factores genéticos implicados en el proceso de envejecimiento</i> .....	44
4.3.4.- <i>Factores ambientales implicados en el proceso de envejecimiento</i> .....	45
<b>5.- VITAMINA D: RUTA METABÓLICA Y GENES IMPLICADOS .....</b>	<b>47</b>
5.1.- SÍNTESIS DE VITAMINA D .....	48
5.2.- PAPEL DE LA VITAMINA D EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE .....	49
5.2.1.- <i>Regulación del sistema endocrino de la vitamina D en las células inmunes</i> .....	50
5.2.2.- <i>Acción de la vitamina D sobre la respuesta inmune innata</i> .....	51
5.2.3.- <i>Acción de la vitamina D en la polarización de los linfocitos T</i> .....	52
5.2.4.- <i>Efecto de la vitamina D en la inmunidad contra los patógenos intracelulares mediada por Th1</i> .....	53
5.3.- GENES DE LA RUTA DE LA VITAMINA D .....	54
5.3.1.- <i>Gen VDR</i> .....	54
5.3.2.- <i>Gen CYP27B1</i> .....	56



5.3.3.- <i>Gen GC</i> .....	57
<b>6.- QUIMIOCINA RANTES Y RECEPTOR CCR5 .....</b>	<b>59</b>
6.1.- GEN <i>RANTES</i> .....	59
6.2.- GEN <i>CCR5</i> .....	60
<b>7.- EL FACTOR DE RESTRICCIÓN <i>BST-2</i> .....</b>	<b>61</b>
7.1.- ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA <i>BST-2</i> .....	61
7.2.- MECANISMO DE ACCIÓN DE <i>BST-2</i> .....	62
7.3.- EL GEN <i>BST-2</i> .....	63
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
<b>1.- DESCRIPCIÓN DE LAS COHORTES .....</b>	<b>71</b>
1.1.- COHORTE DE CONTROLES SANOS.....	71
1.2.- COHORTE DE INDIVIDUOS LONGEVOS .....	71
1.3.- COHORTE DE INDIVIDUOS VIH+ .....	72
1.4.- COHORTE ENI (INDIVIDUOS EXPUESTOS NO INFECTADOS) .....	74
1.4.- TEST DE SEROPOSITIVIDAD PARA VIH-1 Y VHC Y DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL.....	75
<b>2.- ANÁLISIS GENÉTICO .....</b>	<b>76</b>
2.1.- OBTENCIÓN DE ADN .....	76
2.2.- GENOTIPADO .....	76
<b>3.- ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL PROMOTOR DE <i>BST-2</i>.....</b>	<b>83</b>
3.1.- CLONACIÓN .....	83
3.2.- TRANSFECCIÓN Y ENSAYO DE LUCIFERASA .....	84
<b>4.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>85</b>
4.1.- ANÁLISIS DEL EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.....	85
4.2.- ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	85
4.3.- TEST NO PARAMÉTRICOS.....	85
4.4.- ESTUDIO DE ASOCIACIÓN.....	86
4.5.- ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA.....	87
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>89</b>
<b>VARIABILIDAD DE GENES DE RESPUESTA INMUNE EN SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA .....</b>	<b>91</b>
1.- PAPEL DE LA VARIABILIDAD DE <i>BST-2</i> EN SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA .....	93
1.1.- Selección de las variantes polimórficas de <i>BST-2</i> .....	93
1.2.- Estudio de las variantes de <i>BST-2</i> en susceptibilidad a la infección por VIH-1 y ritmo de progresión a sida.....	94
1.3.- Análisis de haplotipos y diplotipos.....	97
1.4.- Estudio de expresión del promotor de <i>BST-2</i> .....	101
1.5.- Discusión .....	104
2.- VARIABILIDAD DE GENES DE LA RUTA DE LA VITAMINA D Y RITMO DE PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN .....	107

2.1.- Distribución de alelos y genotipos en los pacientes agrupados según el estado de progresión .....	108
2.2.- Distribución de haplotipos y diplotipos en los pacientes agrupados según el estado de progresión .....	110
2.3.- Ritmo de progresión de la infección y riesgo genético acumulado para el locus VDR.....	111
2.4.- Ritmo de progresión de la infección en pacientes agrupados según periodo de reclutamiento .....	115
2.4.- Discusión.....	117
<b>VARIABILIDAD DE GENES DE RESPUESTA INMUNE Y ENVEJECIMIENTO</b>	
<b>NATURAL .....</b>	<b>121</b>
3.- VARIABILIDAD DEL GEN VDR Y ENVEJECIMIENTO NATURAL .....	123
3.1.- Distribución de genotipos y haplotipos.....	123
3.2.- Desequilibrio de ligamiento de la región.....	123
3.3.- Distribución de haplotipos.....	125
3.4.- Discusión.....	127
4.- VARIABILIDAD DE LOS GENES RANTES Y CCR5 Y ENVEJECIMIENTO NATURAL .....	130
4.1.- Distribución de alelos y genotipos.....	130
4.2.- Distribución de haplotipos del locus RANTES .....	131
4.3.- Discusión.....	133
<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>137</b>
Limitaciones del estudio .....	142
Perspectivas de los estudios de envejecimiento .....	145
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>153</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>173</b>
ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS .....	173

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Fagocitosis como mecanismo de defensa del sistema innato contra patógenos.....	6
<b>Figura 2.</b> Estructura esquemática de los 4 grupos de quimiocinas.....	10
<b>Figura 3.</b> Vía clásica de activación del complemento.....	12
<b>Figura 4.</b> Vía alternativa de activación del complemento.....	13
<b>Figura 5.</b> Diferenciación de linfocitos T hacia Th1 y Th2.....	17
<b>Figura 6.</b> Estructura de la partícula infectiva del VIH-1.....	19
<b>Figura 7.</b> Estructura del genoma del VIH-1.....	19
<b>Figura 8.</b> Ciclo vital del VIH-1.....	22
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de entrada del VIH-1 en la célula.....	23
<b>Figura 10.</b> Historia natural de la infección por VIH-1.....	25
<b>Figura 11.</b> Clasificación de los pacientes VIH-1 positivos según el ritmo de progresión a sida.....	31
<b>Figura 12.</b> Competición de RANTES con el VIH por la unión a CCR5.....	33
<b>Figura 13.</b> Esperanza de vida potencial de distintas especies.....	35
<b>Figura 14.</b> Distribución geográfica de la esperanza de vida poblacional.....	35
<b>Figura 15.</b> Cambios en la esperanza de vida poblacional en distintos periodos históricos.....	36
<b>Figura 16.</b> Umbrales individuales de <i>Inflamm-aging</i> .....	41
<b>Figura 17.</b> Estructura química de las distintas formas de la vitamina D.....	47
<b>Figura 18.</b> Síntesis y degradación de la vitamina D.....	49
<b>Figura 19.</b> Regulación de la síntesis del VDR y de la CYP27B1 durante la maduración de las células presentadoras de antígenos.....	50
<b>Figura 20.</b> Papel de la vitamina D en las respuestas innata y adquirida.....	51
<b>Figura 21.</b> Estructura del gen <i>VDR</i> y localización de los 5 polimorfismos seleccionados.....	54
<b>Figura 22.</b> Estructura del gen <i>CYP27B1</i> y localización de los 3 polimorfismos seleccionados.....	56
<b>Figura 23.</b> Estructura del gen <i>GC</i> y localización de los 2 polimorfismos seleccionados.....	57
<b>Figura 24.</b> Haplotipos definidos por los polimorfismos rs7041 ( <i>Glu416Asp</i> ) y rs4588 ( <i>Thr420Lys</i> ) del locus <i>GC</i> .....	58
<b>Figura 25.</b> Estructura del gen <i>RANTES</i> y localización de los 2 polimorfismos seleccionados.....	60
<b>Figura 26.</b> Estructura del gen <i>CCR5</i> y localización del polimorfismo rs333.....	60
<b>Figura 27.</b> Estructura de la proteína BST-2.....	61
<b>Figura 28.</b> Mecanismo de acción de BST-2.....	62
<b>Figura 29.</b> Estructura del gen <i>BST-2</i> .....	63
<b>Figura 30.</b> Región promotora del gen <i>BST-2</i> .....	64
<b>Figura 31.</b> Protocolo de obtención de los plásmidos reporteros P- $\Delta$ 19-LUC y P-i19-LUC.....	83
<b>Figura 32.</b> Esquema de trabajo utilizado en el ensayo de luciferasa.....	84
<b>Figura 33.</b> Estructura del gen <i>BST-2</i> y localización de los polimorfismos seleccionados.....	94

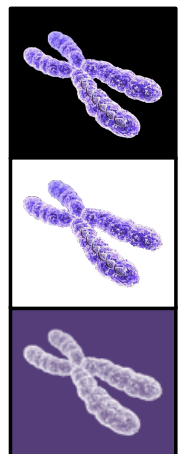
<b>Figura 34.</b> Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de los pacientes agrupados según el genotipo del <i>locus BST-2</i> . .....	96
<b>Figura 35.</b> Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de los pacientes agrupados según el diplotipo formado por los polimorfismos rs3217318 y rs10415893. ....	100
<b>Figura 36.</b> Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de los pacientes agrupados según el diplotipo formado por los polimorfismos rs3217318 y rs10415893 según el año de reclutamiento. ....	101
<b>Figura 37.</b> Región promotora de <i>BST-2</i> y localización de los polimorfismos analizados. ....	102
<b>Figura 38.</b> Localización de los polimorfismos identificados en el <i>locus BST-2</i> . 103	
<b>Figura 39.</b> Ensayo de luciferasa. ....	103
<b>Figura 40.</b> Prevalencia de los diplotipos de los genes <i>CYP27B1</i> , <i>GC</i> y <i>VDR</i> en los pacientes agrupados según el criterio de progresión. ....	110
<b>Figura 41.</b> Recuento inferior de linfocitos CD4+. ....	112
<b>Figura 42.</b> Distribución de progresores y no progresores en los grupos de Riesgo Genético Acumulado para el <i>locus VDR</i> . Prevalencia absoluta (A) y prevalencia relativa (B). Criterio de progresión: primer descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200 $\mu$ L. ....	114
<b>Figura 43.</b> Análisis de supervivencia Kaplan-Meier para los pacientes agrupados según el grupo de Riesgo Genético Acumulado del <i>locus VDR</i> . ....	115
<b>Figura 44.</b> Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de los pacientes agrupados según el diplotipo del <i>locus GC</i> en función del año de reclutamiento. ....	116
<b>Figura 45.</b> Análisis de supervivencia Kaplan-Meier para los pacientes agrupados según su puntuación de Riesgo Genético Acumulado para el <i>locus VDR</i> , en función del año de reclutamiento. ....	117
<b>Figura 46.</b> Patrón de desequilibrio de ligamiento del gen <i>VDR</i> en controles y longevos. ....	125
<b>Figura 47.</b> Prevalencia de los haplotipos del extremo 3'UTR del gen <i>VDR</i> en controles y longevos. ....	126
<b>Figura 48.</b> Prevalencia de los haplotipos extendidos con los 5 marcadores en controles y longevos. ....	127
<b>Figura 49.</b> Prevalencia de portadores de los haplotipos <i>-403G_Int1.1C (GC)</i> y <i>-403A_Int1.1T (AT)</i> del gen <i>RANTES</i> en controles y longevos. ....	133
<b>Figura 50.</b> Disfunciones en la modulación de la respuesta inmune y efecto en el estado de salud. ....	139
<b>Figura 51.</b> Variaciones en la concentración local y sistémica de vitamina D y efecto en el estado de salud. ....	141
<b>Figura 52.</b> Tasas de mortalidad de las cohortes de nacimiento de 1915 (línea azul) y 1955 (línea roja) en la población española. ....	143
<b>Figura 53.</b> Modelo del envejecimiento prematuro en la infección por VIH-1. ....	146

# ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Organización del genoma del VIH-1.....	20
Tabla 2. Clasificación clínica de los pacientes infectados por VIH-1 según CDC 1993.....	30
Tabla 3. Efectos del envejecimiento en células del sistema inmune.....	43
Tabla 4. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes de la cohorte AVIP.....	73
Tabla 5. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes de la cohorte ENI.....	74
Tabla 6. Métodos de genotipado y <i>primers</i> utilizados.....	78
Tabla 7. Distribución de genotipos, alelos y haplotipos de las variantes polimórficas del gen <i>BST-2</i> , rs3217318 y rs10415893, en todas las cohortes.....	95
Tabla 8. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes VIH+ agrupados según el diplotipo de <i>BST-2</i> (rs3217318_rs10415893).....	99
Tabla 9. Genes de la ruta fisiológica de la vitamina D y polimorfismos analizados.....	107
Tabla 10. Distribución de frecuencias alélicas de los polimorfismos de genes de la ruta fisiológica de la vitamina D en pacientes agrupados según criterio de progresión.....	108
Tabla 11. Distribución de frecuencias genotípicas de los polimorfismos de genes de la ruta fisiológica de la vitamina D en pacientes agrupados según criterio de progresión.....	109
Tabla 12. Esquema de la asignación de puntuaciones de riesgo/protección a cada genotipo/diplotipo del <i>locus VDR</i> .....	111
Tabla 13. Características clínicas y epidemiológicas de los individuos agrupados según la puntuación genotípica acumulada para el <i>VDR</i> .....	113
Tabla 14. Distribución de alelos y genotipos del gen <i>VDR</i> en controles y longevos.....	124
Tabla 15. Distribución de portadores de al menos una copia de los haplotipos seleccionados en controles y en longevos.....	126
Tabla 16. Distribución de alelos, genotipos y haplotipos de los polimorfismos <i>CCR5Δ32</i> , <i>RANTES -403G/A</i> y <i>RANTES Int1.1T/C</i> en controles y longevos.....	132

# INTRODUCCIÓN





**E**l sistema inmune es el conjunto de estructuras y procesos biológicos del organismo cuya función es identificar y eliminar agentes patógenos y células tumorales. El sistema inmune se encarga de proteger a los organismos mediante varias líneas de defensa de especificidad creciente.

La línea de defensa menos específica son las barreras físicas. Su función es evitar la entrada de patógenos como bacterias o virus en el organismo. Las barreras físicas pueden dividirse en tres tipos: mecánicas, químicas y biológicas. Las barreras de tipo mecánico expulsan mecánicamente patógenos y agentes irritantes fuera del organismo como es el caso de la tos, las lágrimas o la orina, o bien, atrapan los cuerpos extraños como es el caso de las secreciones mucosas del sistema respiratorio. Las barreras químicas tienen como principal función eliminar o destruir los microorganismos ingeridos. Estas barreras químicas pueden ser péptidos antimicrobianos, como las defensinas- $\beta$  expresadas constitutivamente por las células epiteliales en la piel y el tracto respiratorio; enzimas, como la lisozima o la fosfolipasa A presente en la saliva o la peptidasa del estómago; y condiciones físico-químicas extremas como el ácido gástrico. Por último, están las barreras de tipo biológico, que se encuentran en la piel y en los tractos genitourinario y gastrointestinal, compuestas por la microbiota comensal que compete con las bacterias potencialmente patógenas por alimento y espacio.

Si el patógeno logra superar estas barreras físicas, se enfrenta con el sistema inmune innato, que ofrece una respuesta inmediata y generalizada, y con el sistema inmune adaptativo, que, aunque requiere de mayor tiempo, desarrolla una respuesta específica contra el patógeno.

## **1.- SISTEMA INMUNE INNATO**

El sistema inmune innato proporciona una defensa inmediata y generalizada gracias a la acción de células y mecanismos que protegen al huésped de la infección. Las principales funciones de dicho sistema en vertebrados se resumen a continuación: reclutamiento de células inmunes hacia los sitios de infección y de inflamación; activación de la cascada del sistema del complemento; identificación y eliminación de sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos,



sangre y linfa; y activación del sistema inmune adaptativo mediante un proceso conocido como presentación de antígenos.

El sistema inmune innato lleva a cabo sus funciones a través de distintos mecanismos y componentes formados por el Sistema HLA, la respuesta celular y humoral, la respuesta mediada por el sistema del complemento, factores ambientales inmunomoduladores y factores de restricción del huésped. Las características más significativas de dichos componentes se detallan a continuación.

## 1.1.- El Sistema HLA

El complejo principal de histocompatibilidad o MHC (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*) resulta fundamental en la defensa inmunológica del organismo frente a los patógenos, es el mecanismo de identidad celular por excelencia y constituye la principal barrera al trasplante de órganos y células madre. El MHC está formado por una familia de 140 genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, flanqueados por los marcadores genéticos *MOG* y *COL11A2* que se extiende 3,6 Mb, y cuyos productos codifican para proteínas de membrana implicadas en la presentación de antígenos a los linfocitos T. En humanos, los genes del MHC forman el denominado sistema HLA (del inglés, *Human Leukocyte Antigen*), ya que estas proteínas se descubrieron como antígenos leucocitarios.

Los genes del MHC se dividen en 3 grupos en función de las proteínas codificadas. Los genes del grupo MHC-I se expresan en todas las células humanas, excepto en glóbulos rojos, células germinales, células de los embriones pre-implantacionales y el sincitiotrofoblasto. Dichos genes codifican glicoproteínas con estructura de inmunoglobulina, con una cadena pesada tipo  $\alpha$  que se subdivide en 3 regiones expuestas al espacio extracelular y unidas a la membrana de la célula mediante una región transmembrana. La cadena  $\alpha$  está siempre asociada a una molécula de microglobulina  $\beta_2$  codificada por un *locus* independiente localizado en el cromosoma 15. Su principal función es la presentación de péptidos antigénicos intracelulares a los linfocitos T citotóxicos (Tc) CD8+. El péptido antigénico es fragmentado por la célula y un fragmento de entre 8 y 11 aminoácidos se aloja en una hendidura que se forma entre las regiones  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de la cadena pesada de la proteína del MHC-I. El linfocito Tc reconoce la estructura del MHC-I a través de la cadena  $\alpha_3$ . Los genes MHC-I se dividen en “clásicos”, que presentan antígenos a linfocitos Tc CD8+ (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y en “no clásicos” o MHC-IB con funciones especializadas de unión a receptores inhibidores de células asesinas naturales o NK (del inglés, *Natural Killer*) (HLA-E, HLA-F, HLA-G).

Los genes MHC-II también codifican glicoproteínas con estructura de inmunoglobulina pero estas están formadas por dos cadenas enfrentadas en el exterior celular, una  $\alpha$  y una  $\beta$  (cada una de ellas con dos dominios,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ). Cada una de las cadenas está unida a la membrana por una región transmembrana. Estas proteínas se expresan sobre todo en las células presentadoras de antígeno, donde median la presentación de péptidos antigénicos extracelulares a los linfocitos T colaboradores o helper (Th) CD4+. El péptido antigénico de entre 12 y 16 aminoácidos, se aloja en una hendidura formada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , mientras el reconocimiento del MHC-II por parte del linfocito Th se hace en la cadena  $\beta 2$ . Dichas moléculas presentan 5-6 isotipos, y se agrupan en “clásicas” (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) que presentan péptidos a los linfocitos Th CD4+ y en “no clásicas” (HLA-DM y HLA-DO) con acción intracelular (no expuestas en la membrana celular, sino en membranas internas de los lisosomas), cuya función consiste en cargar los péptidos antigénicos sobre las moléculas MHC-II “clásicas”.

Los genes del grupo MHC-III codifican componentes del sistema del complemento (como C2, C4 y factor B), moléculas relacionadas con la inflamación (citocinas como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  o TNF- $\alpha$  (del inglés, *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) y leucotrienos A y B) o proteínas de choque térmico o hsp (del inglés, *Heat Shock Proteins*), factores importantes en la respuesta inmunológica pero no relacionados con el proceso de presentación de antígenos.

El Sistema HLA constituye uno de los complejos génicos con mayor variabilidad genética. Cada *locus* del MHC presenta un número elevado de alelos. Se han descrito más de mil alelos para MHC-I y más de 500 para MHC-II. Cada molécula de HLA puede presentar una selección de péptidos, por tanto a mayor variabilidad en estos *loci* más posibilidad de presentar péptidos diferentes. Se ha demostrado la ventaja del heterocigoto para el MHC tanto en individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) que presentan una progresión lenta al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida) (Carrington et al. 1999) como en individuos infectados por el virus de la hepatitis B que presentan una mayor eficacia en el aclaramiento de la hepatitis B (Thursz et al. 1997).

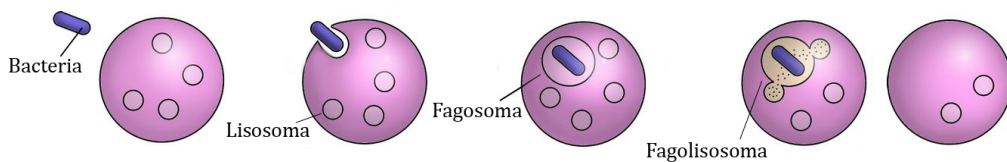
## 1.2.- Respuesta celular innata

La respuesta celular innata se desencadena cuando un microorganismo o toxina es reconocido por los denominados “receptores de reconocimiento de patrones”, que identifican componentes estructurales presentes en distintos grupos de microorganismos (patrones). Entre los receptores de reconocimiento de patrones cabe destacar los TLR (del inglés, *Toll-like receptor*), proteínas

transmembrana que tienen la capacidad de reconocer un gran número de moléculas diferentes, incluyendo péptidos, lípidos y ácidos nucleicos (Dasari et al. 2008). Estas interacciones dan como resultado la activación de cascadas de señalización que suelen finalizar con la activación del factor de transcripción nuclear  $\kappa\beta$  o NF- $\kappa\beta$  (del inglés, *Nuclear Factor  $\kappa\beta$* ). El resultado final es la inducción de la inmunidad innata y la instrucción de la respuesta inmune adaptativa contra el patógeno. La respuesta innata se encargará de la destrucción del patógeno mediante el proceso de fagocitosis y la inducción de muerte microbiana, promoviendo la síntesis de péptidos antimicrobianos o AMP (del inglés, *AntiMicrobial Peptides*).

Las células del sistema inmune innato son los leucocitos o células blancas de la sangre como los mastocitos, granulocitos (eosinófilos y basófilos), agranulocitos (monocitos) y células asesinas naturales, que actúan mediante el contacto directo; y los fagocitos como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, que actúan mediante el proceso de fagocitosis.

La fagocitosis es el proceso mediante el cual los fagocitos engloban patógenos rodeándolos exteriormente con su membrana mediante la formación de pseudópodos. Los patógenos son interiorizados hacia el citoplasma de dichas células y quedan envueltos por una vesícula llamada fagosoma, que se fusiona con otra vesícula llamada lisosoma para formar un fagolisosoma (Figura 1). El patógeno es destruido por la actividad de las enzimas digestivas que aporta el lisosoma. Los fagocitos generalmente patrullan en búsqueda de patógenos, pero pueden ser atraídos a ubicaciones específicas mediante un gradiente de citocinas.



**Figura 1.** Fagocitosis como mecanismo de defensa del sistema innato contra patógenos.

Los **monocitos** se encuentran en la médula ósea y cuando migran hacia los tejidos se diferencian a macrófagos (MAC). Estas células también son importantes mediadoras en la activación del sistema inmune adaptativo.

Los **neutrófilos** son granulocitos que se encuentran en la sangre y representan el 50% o 60% del total de leucocitos. Durante la fase aguda de la inflamación, particularmente en el caso de las infecciones bacterianas, los neutrófilos son los primeros en migrar hacia el lugar de la inflamación mediante un proceso llamado

quimiotaxis. Los **macrófagos** son células versátiles que residen dentro de los tejidos y derivan de los monocitos circulantes. Cuando los macrófagos fagocitan un patógeno, procesan sus antígenos y los sitúan en la superficie de su membrana plasmática, donde serán reconocidos por los linfocitos Th y se activará la respuesta inmune adaptativa. Ambos tipos celulares destruyen los patógenos a través de la generación de una "brecha respiratoria", que causa la liberación de especies reactivas del oxígeno.

Las **células dendríticas** o DCs (del inglés, *dendritic cells*) son fagocitos localizados en los tejidos que están en contacto con el medio externo, se encuentran principalmente en la piel (donde se denominan Células de Langerhans), la nariz, los pulmones, el estómago y los intestinos. Las células dendríticas actúan como enlace entre el sistema inmune innato y el adaptativo ya que presentan antígenos a los linfocitos T.

Los **basófilos** y los **eosinófilos** son granulocitos. Los basófilos liberan histamina, muy importante en la defensa contra parásitos, serotonina en bajas concentraciones, y otras sustancias químicas. Los eosinófilos secretan un rango de proteínas altamente tóxicas y radicales libres que son altamente efectivos en la muerte de bacterias y de parásitos, pero también son responsables del daño tisular que ocurre durante las reacciones alérgicas. Los eosinófilos también contienen histaminasa, una enzima que degrada la histamina secretada por los basófilos, y regula la respuesta alérgica.

Las **células asesinas naturales** o NK son un tipo de linfocito. Las células NK atacan directamente a los patógenos sino que destruyen células tumorales o células infectadas por virus y provocan difusión de iones y agua hacia el interior de la célula, lo que incrementa su volumen hasta el punto de rotura y se produce la lisis celular. El reconocimiento de las células dañadas se da cuando la célula NK detecta la ausencia de las moléculas de histocompatibilidad o MHC en su superficie celular.

### 1.3.- Respuesta humoral o química

Las barreras humorales o químicas generan una respuesta contra un patógeno o lesión mediante la acción de mediadores químicos. Los mediadores químicos son pequeñas moléculas que tras su unión con receptores específicos situados en la membrana plasmática de determinadas células, generan una cascada de señalización intracelular. Los mediadores químicos pueden ser lípidos (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxano), aminoácidos modificados (histamina, serotonina) o pequeñas proteínas (citocinas, factores de crecimiento, interleucinas, etc.).

### 1.3.1.- Citocinas

Las citoquinas o citocinas son proteínas que regulan la función de las células que las producen o de otros tipos celulares. Las citocinas son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, tienen funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por neutrófilos, células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo. Según la célula que las produce se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocitos) o interleucinas (leucocitos). Su acción fundamental es la regulación del proceso inflamatorio (véase más adelante). Hay citocinas con acción proinflamatoria y otras con acción anti-inflamatoria.

Cada citocina se une a un receptor celular específico de superficie y genera una cascada de señalización que altera la función de la célula receptora. La cascada de señalización incluye la regulación positiva o negativa de diversos genes y sus factores de transcripción, lo que puede dar como resultado la producción de otras citocinas, la variación en el número de receptores de superficie para citocinas u otras moléculas, o la supresión de su propio efecto mediante retro-regulación. Las citocinas se caracterizan por su redundancia (diversas citocinas realizan funciones similares) y su pleiotropismo (actúan sobre muchos tipos celulares y una misma célula puede expresar receptores para más de una citocina). El efecto de las citocinas puede ser autocrino, si la citocina actúa sobre la célula que la secreta; paracrino, si la acción se restringe al entorno inmediato del lugar de secreción; o endocrino, si la citocina llega a regiones distantes del lugar de secreción (mediante sangre o plasma) para actuar sobre diferentes tejidos.

Las citocinas pueden dividirse en 4 grupos funcionales de acuerdo al sitio o fase específica de la respuesta inmune en la que actúan:

1. **Citocinas pro-inflamatorias**, actúan en el proceso inflamatorio de la respuesta inmune. Las principales citocinas que componen este grupo son: Interleucina o IL 1 (IL-1), IL-8, IL-12, IL-16, TNF- $\alpha$  e interferones.
2. **Citocinas que favorecen el desarrollo de inmunidad celular**. Las principales citocinas en la inmunidad celular son el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) o tipo 2 que es el principal activador de macrófagos, células T citotóxicas y NK e induce la producción de Inmunoglobulina (Ig) G; y la IL-2 o Factor de Crecimiento de Células T o TCGF (del inglés, *T-Cell*

*Growth Factor*) que genera células citotóxicas especialmente NK y macrófagos antitumorales.

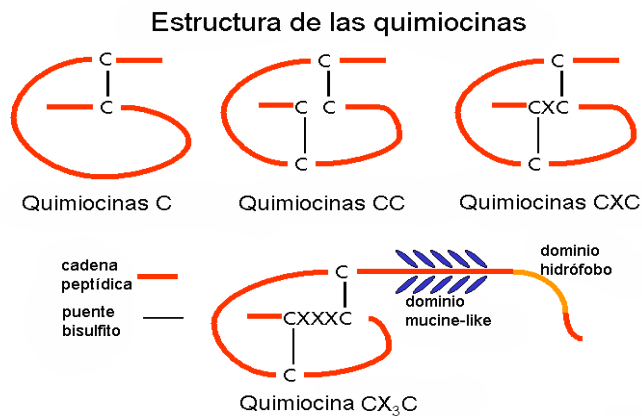
3. **Citocinas que favorecen la producción de inmunoglobulinas.** La IL-4 o factor estimulante de células B o BCSF (del inglés, *B-Cell Stimulatory Factor*) en pocas cantidades induce secreción de IgG1, IgG3 e IgG4, mientras que en excesiva cantidad induce la producción de IgE. Además antagoniza las acciones biológicas del IFN- $\gamma$ . La IL-5 induce la generación de IgA. IL-6 en inflamación es inductora de hepatocitos para la síntesis de reactivos de fase aguda; potencia los efectos de IL-1 y TNF aunque no posee la toxicidad de éstas y en la inmunidad humoral tiene efectos similares a IL-11: promueve la diferenciación, proliferación de linfocitos B y la síntesis de inmunoglobulinas. La IL-10 es anti-inflamatoria ya que inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- $\gamma$ , IL-1, IL-6 e IL-8. La IL-13, además estimula el crecimiento y la diferenciación de linfocitos B e inhibe los linfocitos Th1. Estas linfocinas son secretadas por linfocitos del tipo Th2 y B, mastocitos, eosinófilos y algunas por macrófagos (IL-6, IL-13).
4. **Citocinas con funciones extra-inmunológicas y/o homeostáticas.** Dichas citocinas son secretadas por células del estroma y regulan procesos tisulares como la hematopoyesis. Se distinguen tres tipos: las que actúan en las células primordiales multipotentes como la IL-3 y factor estimulante de macrófagos y granulocitos o GM-CSF (del inglés, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*); las que actúan en líneas celulares ya definidas o comprometidas hacia diferenciación (eritropoyetina en eritrocitos, trombopoyetina en megacariocitos, IL-2 en linfocitos, IL-5 en eosinófilos) y las que inhiben o hacen sinergia funcional de otras citocinas como SCF (del inglés, *Stem Cell Factor*), IL-6 e IL-1.

## Quimiocinas

Las quimiocinas son citocinas quimiotácticas que presentan una serie de características estructurales comunes, tales como su pequeño tamaño o la presencia de cuatro residuos de cisteína en regiones protegidas, claves para la construcción de su estructura tridimensional. Algunas quimiocinas son consideradas proinflamatorias, y, durante la respuesta inmunitaria pueden ser inducidas para promover el desplazamiento de células del sistema inmune al lugar de infección, mientras que otras son consideradas homeostáticas y están involucradas en el control de la migración de las células durante los procesos normales de mantenimiento o desarrollo de tejidos. Estas proteínas ejercen sus efectos biológicos mediante la interacción con receptores de quimiocina que

están acoplados a receptores de proteína G con siete dominios transmembrana que se encuentran en la superficie de los leucocitos. Se han descubierto 19 receptores de quimiocina distintos, que se dividen en cuatro familias dependiendo del tipo de quimiocina que se les une.

Los miembros de la familia de las quimiocinas se dividen en cuatro grupos dependiendo de la distancia entre sus dos primeros residuos de cisteína (Figura 2). Un ejemplo de la nomenclatura de las quimiocinas es CCL1 para el primer ligando de la familia CC de las quimiocinas y CCR1 para su receptor.



**Figura 2.** Estructura esquemática de los 4 grupos de quimiocinas.

### 1.3.2.- Respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria o inflamación es una de las primeras respuestas del sistema inmune frente a una infección o lesión del tejido. El proceso inflamatorio empieza con la liberación de mediadores químicos por parte de células infectadas o dañadas. Las prostaglandinas producen vasodilatación en la zona afectada e hiperemia activa (aumento de flujo sanguíneo en la zona de la lesión), que causa los síntomas de la inflamación, el enrojecimiento y el aumento de la temperatura (si es generalizada y por encima de 37,7°C se denomina fiebre). Posteriormente los leucotrienos producen un incremento en la permeabilidad de la microvasculatura, lo que disminuye el flujo de sangre (hiperemia pasiva) y se produce extravasación de líquido o exudado inflamatorio hacia la sangre, que se vuelve más viscosa. Distintos tipos de citocinas componen el exudado inflamatorio: las quimiocinas que promueven la quimiotaxis de leucocitos hacia la zona afectada y las interleucinas que son responsables de la comunicación entre dichos leucocitos. Una vez se han detenido los leucocitos, se adhieren al

endotelio de la zona dañada y salen hacia el tejido. Durante la inflamación los macrófagos y otras células presentan los antígenos a los linfocitos Th CD4+, que polarizan la respuesta inmune hacia la defensa celular (linfocitos Th1) o la humoral (linfocitos Th2) mediante la secreción de citocinas que crean una regulación cruzada (las citocinas que favorecen la inmunidad humoral inhiben las acciones de las citocinas que ayudan a la inmunidad celular y viceversa).

## 1.4.- Respuesta mediada por la cascada del complemento

El sistema del complemento es una cascada de reacciones bioquímicas que atacan las superficies de células extrañas. El sistema del complemento recibe este nombre por su capacidad para complementar la destrucción de patógenos iniciada por los anticuerpos. La función de las más de 20 proteínas distintas que forman la cascada del complemento es destruir microorganismos, neutralizar virus y promover la respuesta inflamatoria para facilitar el acceso de células del sistema inmune al lugar de la infección.

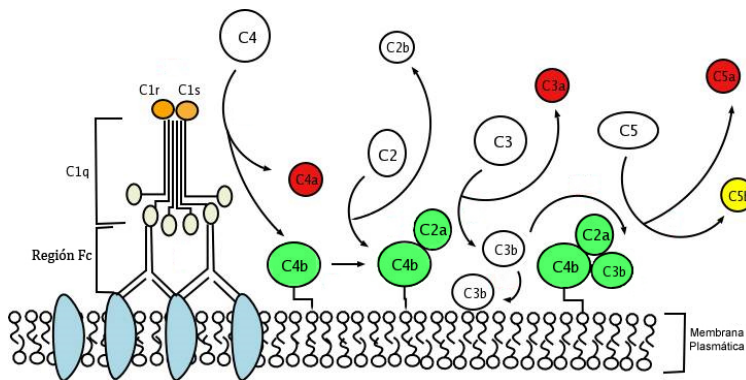
El sistema del complemento es el mayor componente humoral de la respuesta inmune innata. Esta respuesta se activa por la unión de proteínas del complemento a carbohidratos de las superficies de los microorganismos o por la unión del complemento a anticuerpos previamente unidos a los microorganismos. Esta señal de reconocimiento produce una rápida respuesta de destrucción. La velocidad de la respuesta es el resultado de la amplificación de la señal tras la activación proteolítica secuencial (cascada catalítica) de las moléculas del complemento por medio de una retroalimentación positiva controlada. La cascada origina la producción de péptidos que atraen células inmunitarias, aumentan la permeabilidad vascular y opsonizan la superficie del patógeno, marcándolo para su destrucción. La deposición del complemento puede destruir patógenos directamente bloqueando su membrana plasmática.

La activación del sistema del complemento puede darse por tres vías distintas:

1. **vía clásica** (Figura 3). Se inicia por inmunocomplejos formados por IgG e IgM. La unión de dos o más moléculas de inmunoglobulina a los antígenos produce cambios alostéricos en su extremo Fc. Los fragmentos Fc de la inmunoglobulina se unen a la molécula C1q y activan el complejo C1qr. Este complejo causa proteólisis de los componentes C4 en C4a y C4b y de C2 en C2a y C2b. Si los antígenos originales están muy separados entre sí no se produce la polimerización de las inmunoglobulinas y no se activa el complemento. C1 continúa su actividad enzimática degradando muchas moléculas de C4 hasta que es inactivada por su inhibidor. Las moléculas C1q no están asociadas al proceso de opsonización, dado que su función



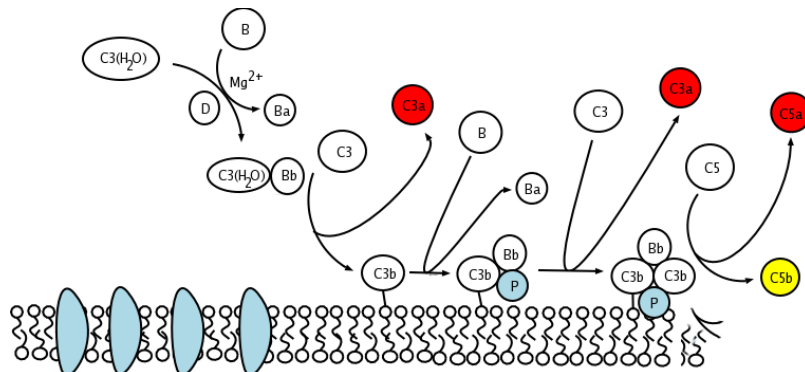
es iniciar la cascada clásica de coagulación. C4b se une de manera covalente a la membrana de la célula invasora o a un complejo inmune y a C2a en presencia de  $Mg^{+2}$ , para formar la C3 convertasa de la vía clásica, llamada C4b2a. La C3 convertasa tiene potente acción proteolítica sobre el factor C3, lo fragmenta en C3a y C3b. C3a, C4a y C5a tienen funciones de anafilotoxinas, favoreciendo la degranulación de los mastocitos que liberan histamina y favorecen la inflamación. La unión de C3b sobre la membrana es un paso crítico en el proceso de opsonización por fagocitos. C3b se une al complejo C4b2a, y forma la convertasa de C5 llamada C4b2a3b. Ésta causará escisión de C5 en componentes a y b. El componente C5b se unirá a la membrana y será estabilizado por C6. C7 se inserta en la doble capa lipídica de la membrana unido al complejo C5bC6b lo que estabiliza aún más la secuencia lítica en contra del invasor. Se fijan los demás factores C8 y poli-C9 (este último contribuyendo con entre 12 y 15 unidades). Cuando los componentes se han unido se forma un poro cilíndrico en la célula que permite el paso de iones y agua, lo que causa la lisis celular. Este conjunto de proteínas que forman el poro se conocen como complejo de ataque a la membrana.



**Figura 3.** Vía clásica de activación del complemento.

2. **vía alternativa** (Figura 4). Esta vía constituye un estado de activación permanente del componente C3 que genera C3b. En ausencia de microorganismos o antígenos extraños, la cantidad de C3b producida es inactivada por el Factor H. Cuando C3 evade la acción del Factor H y se une a una superficie invasora (polisacáridos y lipopolisacáridos bacterianos), forma un complejo con el Factor B. Este Factor B se fragmenta por acción del Factor D en presencia de  $Mg^{+2}$ . El complejo C3bBb o C3 convertasa de la vía alternativa es altamente inestable y la vía no podría continuar sin el rol estabilizador de una proteína circulante llamada properdina (P). La C3bBb actúa enzimáticamente sobre moléculas adicionales de C3, amplificando la cascada. Una parte de C3b se puede unir a la C3 convertasa y formar la C5 convertasa de la vía

alternativa (C3bBb3b) que activa a C5, converge en los pasos finales de la vía clásica.



**Figura 4.** Vía alternativa de activación del complemento.

- vía de las lectinas.** La activación se lleva a cabo por medio de una proteína de unión a manosa (MBP) que detecta residuos de dicho azúcar en la superficie bacteriana, y activa al complejo C1qrs. No requiere la presencia de inmunoglobulinas. Una segunda esterasa, asociada a MBP (denominada MASP) actúa sobre C4. El resto de la vía es similar a la clásica.

## 1.5.- Respuesta mediada por factores ambientales

Además de los factores internos del organismo que intervienen en la regulación de la respuesta inmune, también juegan un papel muy importante algunos elementos externos o factores ambientales. Estos factores son distintos elementos que se encuentran en el medio ambiente y que pueden modificar o alterar en distinto grado la respuesta de nuestro sistema inmune frente a infecciones o daño celular. Uno de los principales factores ambientales es la higiene. Dependiendo del grado de higiene estamos más o menos expuestos a determinados patógenos y enfermedades. También hay que tener en cuenta la alimentación, ya que determinadas dietas pueden producir tanto déficits como excesos de nutrientes susceptibles de afectar al funcionamiento del sistema inmune mejorándolo o empeorándolo y en casos extremos pueden derivar en enfermedades. Asimismo, en determinadas situaciones la ingesta de vitaminas u otras sustancias es beneficiosa para ayudar al sistema inmune en el proceso de cura de una enfermedad.

Otro factor ambiental importante es la exposición a la radiación solar. La radiación solar en el espectro ultravioleta o UV (UVA y UVB) tiene efectos positivos, por su acción antirraquítica, al promover la síntesis de vitamina D, y antidepresiva, al estimular la síntesis de melatonina, y efectos negativos, al

inducir mutaciones que incrementan el riesgo de desarrollar tumores cutáneos. Además, la radiación UV ejerce un efecto inmunosupresor ya que disminuye tanto la capacidad del sistema inmune de reconocer a las células tumorales, como la defensa contra infecciones bacterianas, fúngicas y víricas (Schwarz 2009). Dicha acción inmunosupresora se refleja en una disminución del número de células de Langerhans así como una pérdida de su función de presentación de antígenos. Si bien el efecto que dicha inmunosupresión tiene sobre la carcinogénesis ha sido ampliamente documentado, los datos clínicos disponibles no parecen indicar, salvo en el caso de la infección por el virus herpes simplex, que exista un incremento significativo de infecciones tras una exposición solar prolongada. Esta aparente contradicción ha sido resuelta al describirse que la radiación solar es capaz de inducir la síntesis de péptidos antimicrobianos en queratinocitos (Gläser et al. 2009). La epidermis, como primer nivel de barrera física, está expuesta a un estímulo inmunológico continuado. La acción inmunosupresora de la radiación solar tendría como función principal evitar una exacerbación de dicho estímulo, mientras que la inducción de péptidos antimicrobianos contrarrestaría dicho efecto inmunosupresor al mantener una línea de defensa activa contra las infecciones. Esta dualidad es también una característica que podemos observar en la acción de la vitamina D sobre la respuesta inmune. Además de su papel en el metabolismo mineral, la vitamina D actúa como inmunomodulador de la respuesta innata, al inducir la síntesis de péptidos antimicrobianos e inhibir la maduración de células presentadoras de antígenos, y de la respuesta adquirida, al regular el balance Th1/Th2. Todo ello hace de la vitamina D uno de los factores ambientales con mayor efecto sobre la respuesta inmune (véase más adelante).

## 1.6.- Factores de restricción del huésped

Existen factores intrínsecos, denominados “factores de restricción”, que desempeñan un papel importante en el control de las infecciones víricas. Los factores de restricción son proteínas cuya expresión restringe o inhibe el ciclo vital del patógeno, ya sea bloqueando la infección viral o previniendo la progresión de la infección. Dichos factores de restricción han sido ampliamente estudiados en el modelo de la infección por VIH-1. El primer factor descrito fue APOBEC3G (del inglés, *APolipoprotein B mRNA-editing, Enzyme-Catalytic, polypeptide-like 3G*), perteneciente a la superfamilia de proteínas APOBEC. APOBEC3G es una enzima citidina deaminasa implicada en la edición de moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) exógeno que interfiere en el proceso de replicación del virus reduciendo su integridad genética. La acción de APOBEC3G se desarrolla durante la transcripción reversa del genoma del virus. En la síntesis de la primera hebra de ADN complementario, o ADNc, la actividad deaminasa de la enzima cambia citosinas por uracilos. Dicha actividad se traduce

en última instancia en "puntos calientes" de hipermutación de guaninas por adeninas, que finalmente alteran la capacidad de codificación y replicación del virus, dando lugar a viriones no viables. Se ha observado que niveles intermedios de la proteína APOBEC3G son capaces de reducir significativamente la capacidad infectiva del VIH-1, por lo que es considerada un potente inhibidor de la infección por VIH-1.

Otro factor de restricción contra retrovirus es TRIM5 $\alpha$  (del inglés, *TRIPartite Motif-containing protein 5*), una proteína de la familia de las proteínas TRIM. Dicha proteína se localiza en el citoplasma de la célula huésped y se encarga de bloquear la desencapsidación del retrovirus. TRIM5 $\alpha$  ejerce su acción mediante el reconocimiento de proteínas de la cápside vírica, lo que impide que el virus quede libre en el citoplasma y previene la transcripción reversa y la integración del genoma viral.

Los factores de restricción descritos más recientemente son BST-2 (Neil et al. 2008) y SAMHD1 (Hrecka 2011; Laguette 2011). BST-2 (*Bone Marrow Stromal cell Antigen 2*), también conocido como Tetherin, es una proteína integral de membrana tipo II, con el extremo N-terminal localizado en el citoplasma, un dominio transmembrana, y el extremo C-terminal anclado en la membrana plasmática mediante un grupo glicosil-fosfatidilinositol o GPI. Dicha proteína previene la difusión de las partículas nacientes del VIH-1 al mantenerlas retenidas en la membrana de la célula infectada. Cuando se produce la gemación de la partícula vírica, uno de los dominios de BST-2 se localiza en la membrana del virus y el otro permanece en la membrana plasmática celular, así, mantiene el virión retenido en la superficie de la célula. Finalmente, SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*) es responsable de bloquear la replicación del VIH-1 en células dendríticas y mieloides. Esta enzima tiene actividad fosfohidrolasa y actúa convirtiendo trifosfatos de nucleótidos en nucleósidos más trifosfatos. Dicha acción agota la provisión de nucleótidos disponibles para la síntesis de ADN por la transcriptasa inversa con lo cual previene la replicación viral.

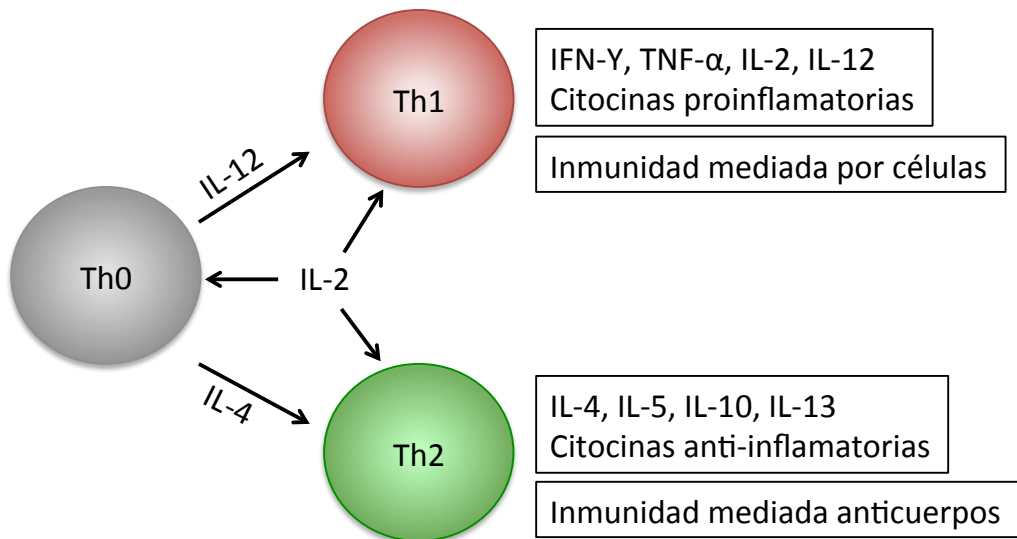
El papel clave de los factores de restricción del huésped se pone de manifiesto por el hecho de que el VIH-1 ha co-evolucionado desarrollando contramedidas específicas para contrarrestar o neutralizar dichos factores. Así, la proteína Vif (del inglés, *Viral Infectivity Factor*) contrarresta el efecto de APOBEC3G interactuando con ella y desencadenando su ubiquitinización y degradación. Por otro lado, la acción antiviral de BST-2 es antagonizada por la proteína del VIH-1 Vpu (del inglés, *Viral protein U*) que promueve su degradación.

## 2.- SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO

El sistema inmune adaptativo se compone de células y procesos sistémicos altamente especializados que eliminan patógenos. Dicho sistema se activa paralelamente al sistema inmune innato, si bien su acción se encuentra diferida debido al tiempo requerido para generar la respuesta específica contra el patógeno. Su especificidad es debida a la producción de anticuerpos que reconocen proteínas o polisacáridos del patógeno (antígenos), que son reconocidos como elementos no-propios del organismo durante el proceso denominado “presentación de antígenos”. La especificidad del antígeno permite la generación de una respuesta que se adapta a un determinado patógeno o a las células infectadas por dicho patógeno. La información sobre esta adaptación se conserva después de que el agente patógeno haya sido eliminado gracias a la memoria inmunológica, que permite que el sistema inmune adaptativo desencadene una respuesta más rápida y efectiva si en el futuro se detecta de nuevo el patógeno.

El sistema inmune adaptativo está constituido por un tipo especial de leucocitos denominados linfocitos. Los linfocitos B o células B están involucradas en la respuesta inmune humoral y reconocen los antígenos completos mediante un receptor específico de superficie o anticuerpo, y generan anticuerpos. Los linfocitos T o células T están implicados en la respuesta inmune mediada por células y sólo reconocen un patógeno después de que los antígenos hayan sido procesados y presentados en combinación con un receptor propio o molécula MHC. Cuando los linfocitos B y T se activan por el reconocimiento de un antígeno se dividen y algunos de sus descendientes se convierten en células de memoria.

Los linfocitos T se dividen en linfocitos T citotóxicos, Tc o CD8+ y en linfocitos colaboradores, Th o CD4+. Los linfocitos Tc tienen unas estructuras especializadas conocidas como receptor del linfocito T o TCR que reconoce los determinantes antigénicos en superficie y destruye las células infectadas. Los linfocitos Th se activan mediante el reconocimiento del antígeno presentado por el MHC-II, y requieren la participación de moléculas accesorias y citocinas que desencadenarán cascadas de señalización y modificarán la expresión de genes. Los linfocitos Th *naïve* CD4+, tras la estimulación por un antígeno específico, pueden diferenciarse en células pluripotentes Th0 que producen un patrón amplio de citocinas. Bajo la influencia de factores estimuladores solubles específicos y moléculas co-estimuladoras expresadas por células presentadoras de antígenos, los linfocitos pluripotentes Th0 se diferencian en Th1 (respuesta proinflamatoria), Th2 (respuesta anti-inflamatoria) y linfocitos T reguladores (Treg) lo que condiciona el patrón de citocinas secretadas (Figura 5).



**Figura 5.** Diferenciación de linfocitos T hacia Th1 y Th2. Los linfocitos Th0 pueden diferenciarse a Th1 o Th2 mediante la inducción de IL-12 o IL-4, respectivamente. Además, la IL-2 promueve la proliferación celular de los tres tipos de linfocitos T. A la derecha se muestran las principales citocinas producidas por los linfocitos Th1 y Th2.

Tanto los linfocitos Th2 como los Treg inhiben la diferenciación hacia Th1. Los linfocitos de la subpoblación Th1 secretan IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y en menor cantidad IL-2 y IL-12 y están implicados en la activación de linfocitos Th y en la producción de IgG. La respuesta mediada por estos linfocitos es más agresiva que la mediada por los Th2, con lo que puede dar lugar a enfermedades autoinmunes como diabetes mellitus tipo I, esclerosis múltiple o artritis si se produce una hiperactivación de la misma (Singh et al. 1999). Por otro lado, los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13, están implicados en la activación y diferenciación de eosinófilos y ayudan a los linfocitos B favoreciendo la producción de IgM y IgE. El correcto balance de las respuestas Th1/Th2 junto con su mantenimiento a lo largo de la infección es clave para el control de la enfermedad. El mantenimiento de dicho balance depende en parte de múltiples factores genéticos del huésped.

**E**n la presente tesis se ha evaluado el papel de la variabilidad de genes de respuesta inmune sobre dos modelos de estudio: la infección por VIH-1 y el proceso de envejecimiento natural. A continuación se detallan las características más significativas de cada uno de los modelos y el papel que la respuesta inmune desempeña en ambos.

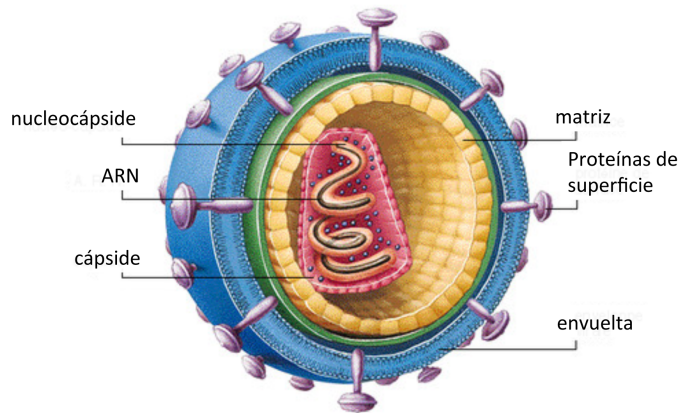
## **3.- RESPUESTA INMUNE E INFECCIÓN POR VIH-1**

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el responsable del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida), identificada en el mundo desarrollado en 1982 y que ha supuesto una de las mayores epidemias del siglo XX. La inmunodeficiencia desencadenada por la infección impide que el individuo organice una respuesta inmune adecuada contra infecciones oportunistas. El VIH es un lentivirus de la familia de los retrovirus del que se han identificado dos estirpes con genomas distintos que pueden causar la inmunodeficiencia, el VIH-1 y el VIH-2. El VIH-1 es el causante de la pandemia mientras que el VIH-2 es menos agresivo y su diseminación se encuentra restringida al África oriental.

### **3.1.- Estructura del VIH-1**

El virión es una partícula infecciosa icosaédrica de forma esférica y con un diámetro que oscila entre los 80 y los 100 nanómetros. Está formado por tres capas. La capa externa es una membrana o bicapa lipídica que obtiene sus componentes estructurales básicos de la membrana plasmática de la célula huésped, contiene 72 espículas, que son complejos proteicos formados por una proteína integral de membrana glucoproteína (gp) 41 o gp41 y una cabeza externa formada por la proteína gp120 (Gelderblom 1991; Ozel et al. 1988), esencial para el acoplamiento con el exterior de ciertas células para su invasión (Figura 6). La capa intermedia o matriz se encuentra debajo de la membrana y está compuesta por la proteína p17. La capa interna o cápside está formada por la proteína p24, tiene forma de cono truncado y contiene dos copias del ácido

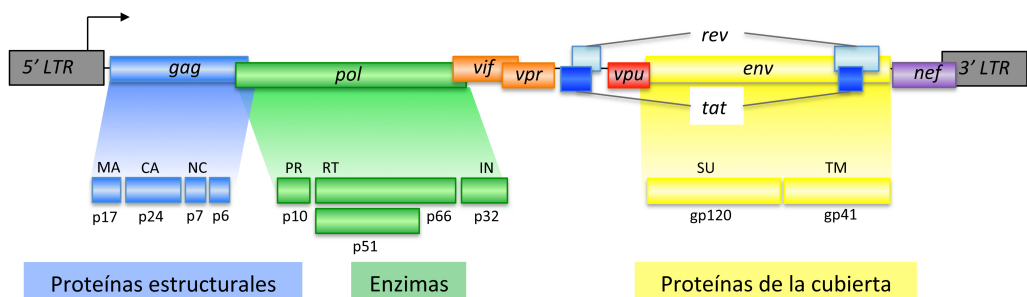
ribonucleico (ARN) viral en la nucleocápside, una transcriptasa inversa, una integrasa y una proteasa. La nucleocápside se encuentra en contacto con el ARN y está compuesta por la proteína p7.



**Figura 6.** Estructura de la partícula infecciosa del VIH-1.

### 3.2.- Material genético del VIH-1

El VIH-1, al igual que los demás retrovirus, presenta dos organizaciones genómicas distintas, virión y provirus, ambas de 9,2 Kilobases (Kb) (Muesing et al. 1985). En la fase extracelular de su ciclo vital, el virus presenta dos copias idénticas de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, dicha forma se denomina virión. En la fase intracelular, el virus, denominado ahora provirus, presenta una doble cadena de ADN integrada en el genoma celular y flanqueada por repeticiones terminales largas o LTR (del inglés, *Long Terminal Repeats*).



**Figura 7.** Estructura del genoma del VIH-1. Se indican las proteínas que derivan de su expresión y procesamiento así como las funciones asignadas a cada una de ellas.

El material genético del VIH-1 se divide en genes estructurales, reguladores y accesorios o auxiliares. Los genes estructurales ocupan la mayor parte del genoma vírico y son: el gen *gag*, que codifica los precursores de las proteínas de la cápside del virión, el gen *pol*, que codifica los precursores de distintas enzimas



del virión y el gen *env*, que codifica los precursores de glicoproteínas de la envuelta. Los genes reguladores son el gen *tat* o transactivador transcripcional y el gen *rev* o regulador de la expresión viral. Finalmente, los genes accesorios o auxiliares son *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*; que no son necesarios para la replicación del virus en cultivo pero *in vivo* condicionan la patogenia de la enfermedad. La Figura 7 muestra la estructura genética del VIH-1, así como las proteínas que derivan de cada gen.

Tabla 1. Organización del genoma del VIH-1.

Gen	Precursor	Proteína	Función
<i>gag</i>	Gag o p55	p24	Proteína estructural, forma la cápside.
		p17	Proteína estructural, forma la matriz.
		p7	Proteína estructural, forma la nucleocápside. Responsable del reconocimiento y la incorporación del ARN al virión. Facilita la transcripción inversa.
		p6	Proteína estructural. Se encarga de la incorporación de la proteína accesoria Vpr al virión y de la interacción con la membrana celular para hacer posible la gemación.
<i>gag-pol</i>	Pol	p66, p51	Transcriptasa Reversa. ADN polimerasa que puede actuar dependiente de ADN y de ARN. Compuesta por dos subunidades (p66 y p51), se encarga de la síntesis del ADN de doble cadena del provirus usando como patrón la cadena simple del ARN viral. Una vez formada la primera cadena de ADN, la ARNasa lo separa de él, y permite a la transcriptasa reversa ejecutar la síntesis de la segunda cadena de ADN.
		Pol	p10
	Pol	p32	Integrasa. Realiza la inserción del ADN proviral en el genoma de la célula huésped. No requiere ATP.
<i>env</i>	gp160	gp120	Proteína de envuelta celular.
		gp41	Proteína de envuelta celular transmembrana.
<i>tat</i>	Tat	p14	Promueve activamente la formación de nuevos viriones. La proteína se une a una región de 59 nucleótidos situada en el extremo 5' del ARN viral llamada TAR ( <i>Transactivator Active Region</i> ) y actúa como un transactivador. En cuanto este extremo ha sido transcrito desde el ADN proviral, la proteína Tat se une a él y promueve su elongación con lo que favorece la transcripción del resto de la cadena.
<i>rev</i>	Rev	p19	Regula la expresión del ARN viral y controla el ritmo de exportación del ARN mensajero.
<i>nef</i>	Nef	p27	Pleiotrópica, puede incrementar o disminuir la replicación del VIH-1.
<i>vif</i>	Vif	p23	Incrementa la infectividad y la transmisión célula-célula, ayuda en la síntesis de ADN del provirus y en el ensamblaje del virión.
<i>vpr</i>	Vpr	p15	Detiene el crecimiento celular, transactiva genes celulares e induce la diferenciación celular.
<i>vpu</i>	Vpu	p16	Facilita el desprendimiento de viriones en células infectadas. Disrupta los complejos CD4:gp160.
<i>tat-rev</i>	Tev	p26	Actividades de Tat/Rev. Se crean cuando los genes <i>tat</i> y <i>rev</i> se fusionan.

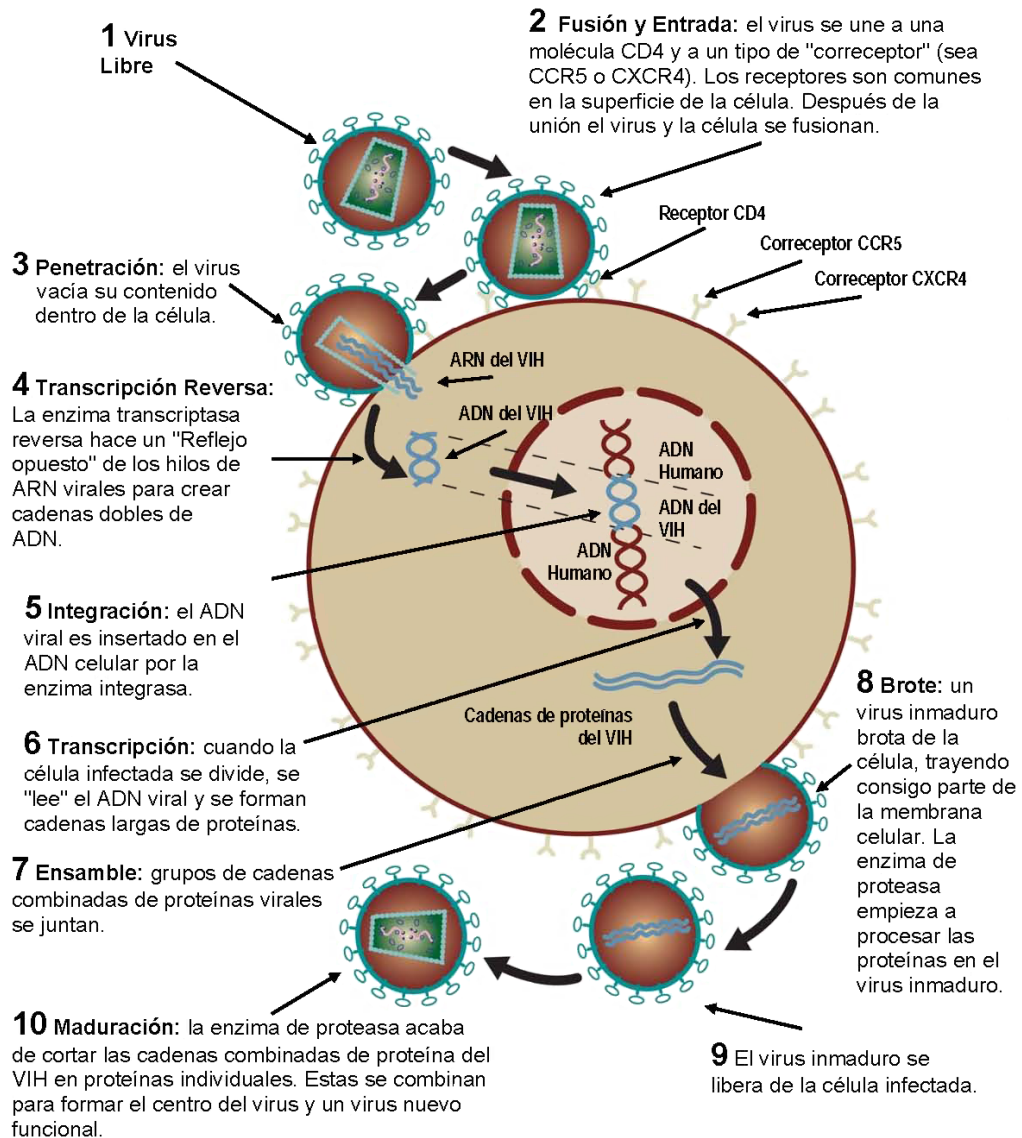
Muchos de los genes del VIH-1 se traducen a una proteína intermedia que es cortada por la proteasa y da lugar a distintas proteínas funcionales, o bien, se producen distintas proteínas por edición diferente del ARN mensajero (ARNm). La Tabla 1 resume las proteínas del VIH-1, sus funciones, proteínas precursoras y los genes de los que provienen. El gen *gag* es traducido a una proteína precursora, la p55, que es cortada por una proteasa en cuatro proteínas: p17, p24, p6 y p7, cada una de las cuales tiene una función diferente. Los genes *gag* y *pol* son co-traducidos una de cada 20 veces en una proteína precursora mixta que se corta y da la proteína Pol que a su vez será cortada para dar una transcriptasa inversa (p66, p51), una integrasa (p32) y una proteasa (p10). El gen *env* es traducido a proteína y se obtiene como resultado la poliproteína gp160 que será cortada y dará la gp120 y la gp41. El gen *tat* (*transactivator*) da dos tipos de proteínas Tat, una larga, de 101 residuos de aminoácidos, obtenida en fase tardía por edición parcial del ARNm viral, y otra más corta, de 72 aminoácidos, obtenida en fase temprana por edición completa del ARNm.

### 3.3.- Ciclo vital del VIH-1

El VIH-1 infecta principalmente linfocitos T CD4+, pero también en menor medida monocitos/macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y células de la microglía del cerebro. La replicación del VIH-1 se da principalmente en los órganos linfoides, sobre todo en los ganglios linfáticos y se divide en dos fases: temprana y tardía. La fase temprana se inicia con la unión del virión a la célula y con la integración del provirus en el genoma. La fase tardía se inicia tras un período de latencia, con la transcripción a ARN viral a partir del ADN proviral integrado y termina con la gemación de los viriones de la célula.

La Figura 8 ilustra las distintas etapas del ciclo vital del VIH-1. La entrada del VIH-1 en la célula se inicia con el proceso de fijación, mediante el reconocimiento mutuo y el acoplamiento de proteínas de la envuelta del virión y receptores de la célula diana (Figura 8, 2). El proceso de infección requiere la presencia en la célula huésped del receptor de membrana CD4, que actúa como receptor del virus y, alternativamente, de las moléculas CCR5 o CXCR4, que actúan como correceptores virales. El receptor CD4 es una glicoproteína de 55 kiloDaltons (kDa) presente en linfocitos TCD4+, macrófagos, monocitos, células de la microglía y células dendríticas; cuya principal función es participar en el proceso de activación de los linfocitos T CD4+. En 1996 se describieron las moléculas CXCR4 (receptor-C de citocinas 4, conocida como "fusina") y CCR5 (receptor 5 de citocinas-C) como correceptores del VIH-1 (Deng et al. 1996; Rowe 1996). Se trata de proteínas con siete dominios transmembrana que pertenecen a la superfamilia de los receptores de quimiocinas, cuya función natural es mediar la

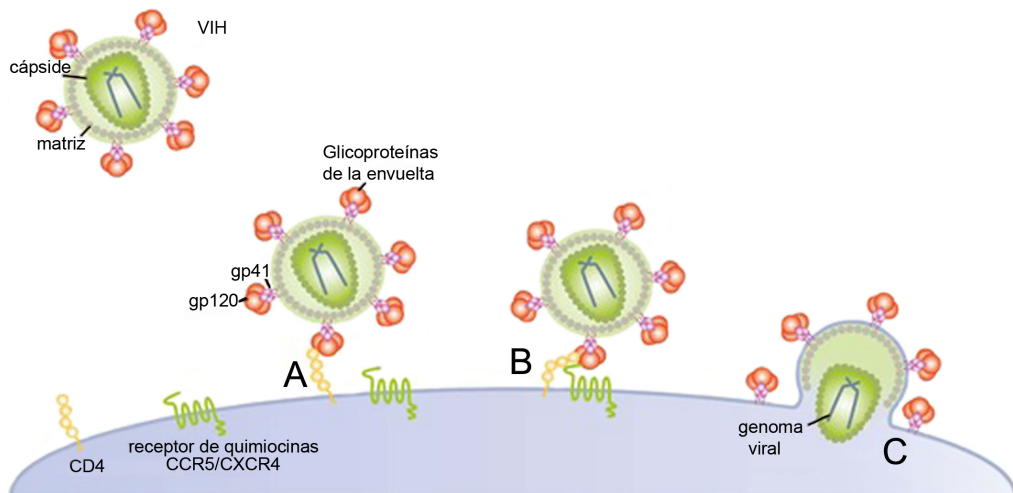
activación celular en procesos inflamatorios actuando como receptores de quimiocinas específicas.



**Figura 8.** Ciclo vital del VIH-1. Imagen adaptada de InfoRed SIDA ([http://www.aidsinfonet.org/fact\\_sheets/view/106?lang=spa](http://www.aidsinfonet.org/fact_sheets/view/106?lang=spa)).

La unión del virus a la célula está mediada por la interacción del dominio transmembrana gp120 y el antígeno CD4 de la célula, que posee un dominio de alta afinidad por gp120 (Brand et al. 1995; Broder and Berger 1993) (Figura 9, A). Esta unión provoca un cambio conformacional en el complejo gp120/CD4 que lleva a la interacción de gp120 con el correceptor apropiado, CCR5 o CXCR4 (Figura 9, B) (Choe et al. 1996; Oberlin et al. 1996; Wu et al. 1996). Tras dicha

interacción se produce un cambio conformacional en gp41, concretamente en el péptido de fusión que posee en su extremo amino-terminal, que genera la unión y fusión de la membrana del virión con la membrana celular (Figura 9, C) (Chan and Kim 1998). La unión del virus a uno u otro de los correceptores en la célula huésped define el tropismo de las cepas del VIH-1, entendiéndose por cepas X4 aquellas que utilizan el correceptor CXCR4 (con tropismo por los linfocitos T) y cepas R5 aquellas que utilizan el CCR5 (cepas con tropismo por macrófagos). Finalmente, se han descrito cepas X4R5 que pueden utilizar ambos correceptores (cepas con tropismo dual) (Berger et al. 1999). Se ha observado que las cepas virales aisladas de sangre periférica de un individuo que se encuentra en fase temprana de la infección, presentan principalmente un tropismo por macrófagos mientras que en estadios finales de la infección las cepas suelen presentar tropismo por linfocitos T, de mayor efecto citopático.



**Figura 9.** Mecanismo de entrada del VIH-1 en la célula. A) Reconocimiento, B) fijación y C) fusión.

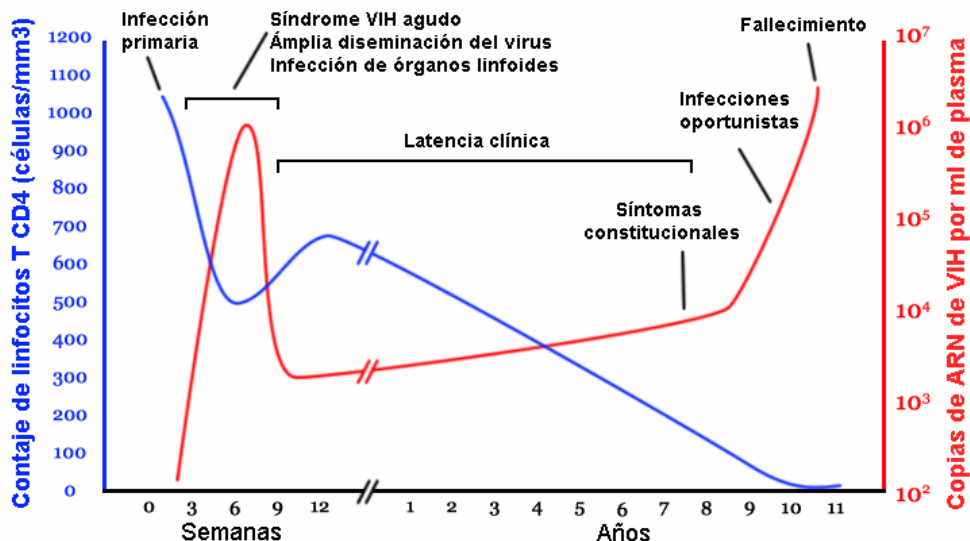
El siguiente paso en el proceso de infección es la penetración en la que el virus vacía su contenido dentro de la célula (Figura 8, 3). Los dos ARNm que forman el genoma viral y sus proteínas asociadas son liberados en el citoplasma. Se eliminan las cubiertas proteicas, cápside y nucleocápside y el ARN vírico queda libre y listo para ser procesado.

La síntesis del ADN viral por la transcriptasa reversa (actividad ARNasa H en su extremo C-terminal y polimerasa en el N-terminal) empieza con la síntesis de una hebra de ADN a partir del ARN viral, que forma un híbrido ADN/ARN (Figura 8, 4). La ARNasa H degrada la hebra de ARN y sintetiza la hebra complementaria de ADN. El siguiente paso es la translocación del complejo de integración, constituido por el ADN de doble cadena y varias proteínas virales, al núcleo donde la integrasa procede a la integración del genoma vírico en el genoma de la célula huésped (Figura 8, 5). En este punto el provirus entra en la fase de latencia.

La síntesis de proteínas virales tras el período de latencia se inicia con la transcripción del ADN proviral a ARNm mediante la maquinaria propia de la célula (Figura 8, 6). El ARNm viral sale del núcleo a través de los poros nucleares para ser traducido a proteína en el citoplasma. El resultado de la traducción no consiste inmediatamente en proteínas funcionales, sino en poliproteínas que aún deben ser cortadas en fragmentos por proteasas específicas del VIH-1 para formar las proteínas constitutivas del virus. La producción de proteínas se da en dos fases, en la primera fase se producen proteínas que no se incluirán en el virión (Tat, Rev y Nef) y en la segunda fase se sintetizan las proteínas que se incorporarán al virión (Gag, Pol y Env). El siguiente paso en el proceso de infección es el ensamblaje y la diseminación del virus. Para ello, se produce la asociación de los precursores de Gag y Gag/Pol con la membrana plasmática de la célula y con el ARN viral. A continuación, la proteasa viral genera las proteínas funcionales maduras a partir de los precursores polipeptídicos y finalmente se produce el ensamblaje y la liberación de las partículas virales inmaduras por gemación (Figura 8; 7 y 8). El proceso de gemación puede verse inhibido por la acción del factor de restricción BST-2, que retiene las partículas víricas liberadas unidas a la superficie celular. El virus es liberado de la célula en su forma inmadura (Figura 8, 9) y terminará de madurar cuando la proteasa termine de cortar las proteínas y el virus adquiera su capacidad infectiva (Figura 8, 10).

### **3.4.- Historia natural de la infección por VIH-1 y progresión a sida**

La infección por VIH-1 se presenta en diversas etapas identificadas por un conjunto de síntomas e indicadores clínicos. En ausencia de un tratamiento adecuado, el virus se replica constantemente e infecta los linfocitos T CD4+, que constituyen una parte esencial del sistema inmunológico. Por su parte, el sistema inmune del huésped reacciona ante la presencia del virus y genera una respuesta que puede mantener la infección bajo control durante un tiempo, mediante la reposición de células de defensa. Al cabo de un período que puede durar varios años, el VIH-1 se vuelve resistente a las defensas naturales del cuerpo y destruye el sistema inmune del huésped. De esta manera, la persona seropositiva queda expuesta a diversas enfermedades oportunistas que concluyen con el fallecimiento del individuo. El estadio de la enfermedad y su pronóstico, así como el efecto de la terapia antirretroviral, se miden en función de dos parámetros clínicos: recuento de la población de linfocitos T CD4+/ $\mu\text{l}$ , que se determina mediante citometría de flujo y recuento de partículas virales o carga viral (copias/ $\mu\text{l}$ ), que se determina mediante PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) cuantitativa.



**Figura 10.** Historia natural de la infección por VIH-1. Los tiempos de latencia clínica varían ampliamente entre individuos. La línea azul indica la evolución del recuento de linfocitos T CD4+. La línea roja indica la evolución de la carga viral. Imagen adaptada de Wikipedia.

En el transcurso de la infección se pueden diferenciar tres etapas de acuerdo con los parámetros mencionados: fase aguda, fase crónica y fase crítica o sida.

## Fase aguda

La fase aguda de la infección por VIH-1 se inicia en el momento del contagio. El virus se propaga por el cuerpo de la persona contagiada a través de sus fluidos corporales. En un plazo de días, el VIH-1 infecta no sólo las células expuestas inicialmente sino también los ganglios linfáticos. Durante este tiempo, el virus se multiplica dentro del organismo hasta alcanzar altos niveles de partículas virales en sangre, propios de la infección crónica. El tejido linfoide asociado a los intestinos constituye uno de los lugares de replicación inicial del VIH-1 dado su elevado porcentaje de linfocitos T CD4+.

Una fracción considerable de las personas que contraen el virus no presenta síntomas de la infección en su fase aguda, es decir, son asintomáticos. Sin embargo, se calcula que entre el 40-90% de los casos de contagio por VIH-1 presentan manifestaciones clínicas. El cuadro de la infección aguda se caracteriza por la aparición de fiebre, malestares musculares, inflamación de los ganglios, sudoración nocturna, diarrea, náuseas y vómitos. La gran mayoría de los individuos seropositivos no reciben diagnóstico del cuadro agudo de la infección por VIH-1, pues son síntomas compartidos por varias enfermedades. El cuadro de la infección aguda por VIH-1 aparece entre dos y seis semanas después de la exposición al virus, y desaparece tras pocos días (Figura 10).

En un individuo sano el número de linfocitos T CD4+ oscila entre 500 y 1200/ $\mu$ l. Durante la fase asintomática de la infección, la proporción de linfocitos infectados es 1/1.000-1/100.000, y aumentará progresivamente hasta llegar a 1/100 en la infección crónica. Durante la fase aguda, los sistemas de diagnóstico basados en la detección de anticuerpos producidos como respuesta a la infección, dan un resultado negativo ya que la síntesis de anticuerpos no se produce hasta transcurridos alrededor de 3 meses después del contagio. Sin embargo, los métodos diagnósticos basados en la carga viral, que contabilizan el número de copias de ARN viral en sangre, son capaces de detectar el virus durante la fase aguda de la infección debido a la elevada cantidad de copias del VIH-1.

### **Fase crónica**

La fase crónica de la infección por VIH-1 se suele llamar también fase de latencia clínica porque el portador es asintomático, es decir, no presenta síntomas que puedan asociarse con la infección. Esto no quiere decir que el virus se encuentre inactivo. Al contrario, durante la fase crónica el virus se multiplica incesantemente. Se calcula que en un sujeto infectado se producen diariamente entre mil y diez mil millones de nuevas partículas víricas y se destruyen alrededor de cien millones de linfocitos T CD4+. Los pacientes son asintomáticos debido a la gran capacidad del sistema inmune para regenerar las células destruidas, pero dichos pacientes pueden presentar adenopatías y disminución del recuento de plaquetas en sangre.

Durante la fase crónica, los pacientes pueden desarrollar algunas manifestaciones de la infección como dermatitis seborreica, úlceras bucales o foliculitis.

### **Fase crítica o sida**

La respuesta mantenida contra el virus termina por desgastar el sistema inmunológico dando lugar a una incapacidad para responder a infecciones oportunistas, lo que se conoce como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). En ausencia de tratamiento, la mayoría de los portadores del virus desarrollan sida en un plazo de 8 a 10 años tras la infección (Figura 10).

En esta fase de la infección, los linfocitos T CD4+ son incapaces de responder adecuadamente a la infección y la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8+ se reduce considerablemente. Este fenómeno coincide con el aumento en las tasas de replicación del virus, que merma la capacidad de reacción del huésped ante otros agentes causantes de enfermedades. De esta manera, el portador del virus es presa potencial de numerosas infecciones oportunistas que le pueden conducir a la muerte. Algunas de las infecciones más frecuentes que atacan a individuos

seropositivos que han desarrollado sida son neumonía por *P. jiroveci*, sarcoma de Kaposi, tuberculosis, candidiasis e infección por citomegalovirus. La mayor parte de los pacientes que llegan a desarrollar sida no sobreviven más de tres años sin recibir tratamiento antirretroviral.

El estudio y caracterización del ciclo vital del virus ha permitido el desarrollo de fármacos con capacidad antirretroviral capaces de inhibir alguna de las etapas esenciales del ciclo como son, la entrada del virus en la célula huésped, la transcripción reversa, la integración del genoma viral y el procesamiento de las proteínas del virus. No obstante, dada la elevada tasa de mutación del VIH-1, los tratamientos iniciales, basados en la utilización de un único fármaco, dieron resultados poco efectivos, ya que los pacientes desarrollaban resistencias a dichos fármacos y con el paso del tiempo el tratamiento perdía su efectividad. Fue en 1995 cuando se implementó el Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA) que consiste en la administración simultánea de una combinación de 3 o más de estos fármacos antirretrovirales lo cual mejora la efectividad del tratamiento al disminuir drásticamente la aparición de resistencias. Gracias al tratamiento TARGA se consigue una reducción de la carga viral hasta niveles indetectables lo cual facilita una recuperación inmune. Ello conlleva un incremento en el recuento de linfocitos que capacita al paciente para combatir las infecciones oportunistas y evitar el desarrollo del cuadro clínico del sida. Sin embargo, la existencia de reservorios virales, inaccesibles a los fármacos antirretrovirales actuales, determina que dicho tratamiento deba ser mantenido de forma constante y persistente a riesgo de rebrotes de la infección y aparición de cepas resistentes, de consecuencias nefastas para el paciente. Por todo ello la infección por VIH-1 debe ser considerada una enfermedad crónica.

### 3.5.- Mecanismos de transmisión del VIH-1

El VIH-1 sólo se puede transmitir a través del contacto entre fluidos corporales que posean una alta carga viral. El virus ha sido aislado en sangre, semen, fluidos vaginales, líquido preseminal, líquido amniótico, leche materna, líquido cefalorraquídeo, saliva, lágrimas y orina.

Las tres principales formas de transmisión son:

**Contacto Sexual** (acto sexual sin protección). La transmisión se produce por el contacto de fluidos corporales infectados como el semen o los fluidos vaginales con la sangre del individuo sano. El contagio se produce a través de pequeñas heridas en el glande o en la mucosa genital, rectal o bucal de la otra persona.



**Parenteral** (por sangre). Transmisión a través de restos de sangre contaminada presentes en jeringuillas. Este mecanismo de transmisión puede darse por el uso compartido de jeringuillas en consumo de drogas intravenosas o a través de donaciones o transfusiones de sangre y trasplantes de órganos o tejidos si no se usan las apropiadas medidas preventivas.

**Vertical** (de madre infectada a hijo). La transmisión puede ocurrir durante las últimas semanas del embarazo, durante el parto, o al amamantar al bebé. De estas situaciones, el parto es la más problemática. Actualmente en países desarrollados la transmisión vertical del VIH-1 está totalmente controlada (siempre que la madre sepa que es portadora del virus) ya que desde el inicio del embarazo se subministra un tratamiento TARGA especialmente indicado para estas situaciones, el parto se realiza generalmente por cesárea, se suprime la producción de leche, e incluso se da tratamiento antiviral al recién nacido.

### **3.6.- Clasificación clínica de la infección por VIH-1**

#### **Clasificación según el criterio CDC 1987**

Esta clasificación no está actualmente en uso pero es citada con cierta frecuencia debido a su carácter predominantemente clínico. El criterio CDC 1987 divide a los pacientes adultos infectados por VIH-1 en 4 grupos (I a IV) que son excluyentes entre sí y progresivos de acuerdo a la evolución de la infección (Anonymous 1987). Los grupos II y III pueden subclasificarse atendiendo a la presencia o ausencia de determinados marcadores biológicos como son el número de linfocitos CD4+,  $\beta$ 2 microglobulina, niveles de antígeno p24 o el recuento de plaquetas. El grupo IV puede subdividirse en categorías no excluyentes, de la A a la E, entre las que cabe destacar la categoría C, de enfermedades infecciosas asociadas al VIH-1.

Grupo I: Infección aguda demostrada por seroconversión.

Grupo II: Infección asintomática.

Grupo III: Adenopatías generalizadas persistentes, clínicamente asintomáticos.

Grupo IV: Otras enfermedades: manifestaciones clínicas de la infección por VIH-1.

IV.A: Enfermedad constitucional.

IV.B: Trastornos neurológicos.

IV.C: Enfermedades infecciosas asociadas al VIH-1.

IV.D: Neoplasias asociadas al VIH-1.

IV.E: Enfermedades asociadas al VIH-1 y no incluidas en los grupos anteriores.

La consideración de caso de sida se asigna a todos los pacientes incluidos en el grupo IV. La clasificación de los pacientes infectados por VIH-1 menores de 13 años según este criterio es similar a la de los adultos y comprende tres grupos principales (P0, P1 y P2). El grupo P0 comprende los hijos de madres infectadas que no presentan evidencia de estar infectados. Los otros dos grupos son excluyentes entre sí. El grupo P1 comprende los niños infectados asintomáticos y se divide en 3 subgrupos atendiendo al estado de su función inmunológica (subgrupos A-C). El grupo P2 incluye a los infectados que presentan síntomas y se divide en 6 subgrupos (A-F), y algunos de estos en categorías, similares a las del grupo IV de los adultos.

### **Clasificación según el criterio CDC 1993**

En 1993 se publicó el Sistema de clasificación revisado para la infección por VIH y definición ampliada de caso de sida en adolescentes y adultos (Anonymous 1993). Este criterio de clasificación entró en vigor en enero de 1993 y sustituyó al criterio CDC 1987 y es el que se utiliza actualmente. El nuevo criterio utiliza datos del recuento de linfocitos T CD4+ y de criterios clínicos. La clasificación en función del número de linfocitos T CD4+ se establece en 3 categorías: 1, 2 y 3. Los pacientes se engloban en la categoría 1 si su recuento de linfocitos T CD4+ está por encima de 500/ $\mu$ L, en la categoría 2 si el recuento está entre 200-499/ $\mu$ L, y en la categoría 3 si el recuento está por debajo de 200/ $\mu$ L. Los criterios clínicos consisten en la presencia de enfermedades y situaciones clínicas diagnósticas de sida, que aparecen en un paciente VIH-1 positivo y que no pueden ser explicadas por otras causas de inmunodeficiencia. Según este criterio se consideran 3 categorías: A, B y C. En la categoría A se engloban pacientes en fase de infección primaria o pacientes asintomáticos, presenten o no un cuadro linfadenopático persistente. En la categoría B se engloban los pacientes que presentan angiomatosis bacilar, candidiasis vulvovaginal persistente, fiebre ( $>38,5^{\circ}$ C), diarrea de más de un mes de duración o muguet (candidiasis oral), entre otras. Por último, en la categoría C se engloban pacientes con manifestación de enfermedades oportunistas definitivas de sida como la candidiasis traqueal, bronquial, pulmonar o esofágica, sarcoma de Kaposi, tuberculosis pulmonar, neumonía por *Pneumocystis carinii* o toxoplasmosis, entre otras. Teniendo en cuenta ambas clasificaciones se obtienen todas las categorías que se muestran en la Tabla 2. Se considera que todos los pacientes de la categoría C (C1, C2 y C3) y los de la categoría 3 (A3, B3 y C3) han desarrollado sida.

Tabla 2. Clasificación clínica de los pacientes infectados por VIH-1 según CDC 1993.

	Categoría según el número de CD4+	Categoría clínica		
		A	B	C (sida)
1	>500/ $\mu$ L	A1	B1	C1
2	200-499/ $\mu$ L	A2	B2	C2
3	<200/ $\mu$ L (sida)	A3	B3	C3

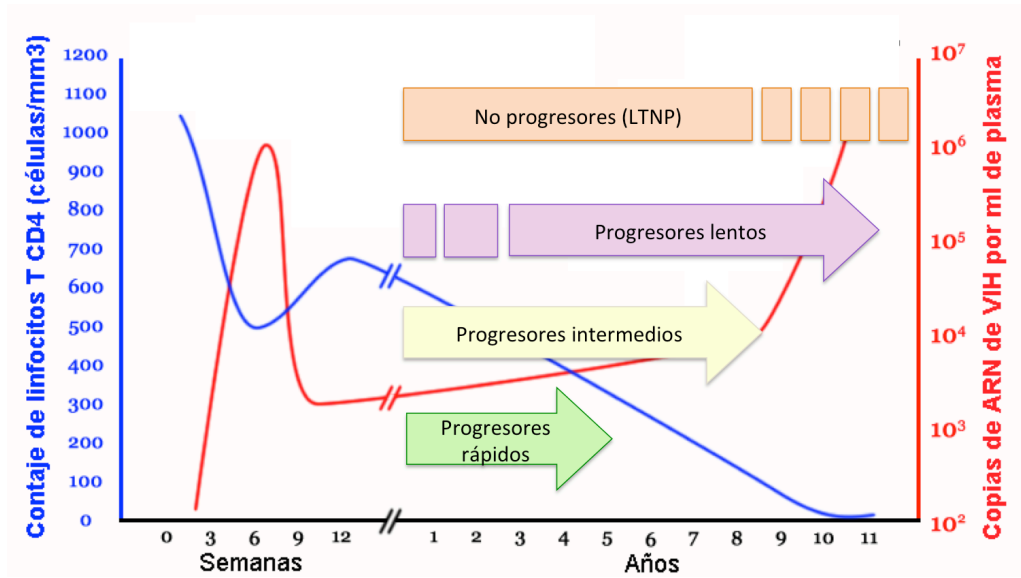
Además de los criterios predominantemente clínicos del CDC, creados para facilitar el desarrollo de estrategias de salud pública en el manejo de la infección, en la bibliografía también se aplican criterios de progresión inmunológicos en los que se considera el recuento de linfocitos T CD4+/ $\mu$ L como parámetro discriminatorio y predictor de inmunodepresión (Ho et al. 2007, Soghoian et al. 2012). En estos casos, se establece como criterio de progresión de la infección el descenso en el recuento de linfocitos CD4+ por debajo de un cierto umbral. En esta tesis, atendiendo a la categoría 3 del criterio del CDC 1993, se ha aplicado un umbral de 200 células/ $\mu$ L.

### 3.7.- Clasificación de los pacientes según su respuesta a la infección por VIH-1

Existe gran variabilidad individual en la respuesta a la exposición al VIH-1 y en la evolución de la infección así como en el tiempo requerido para desarrollar un evento de sida.

Se ha observado que hay personas que a pesar de haber estado expuestas al VIH-1 no se han infectado, es decir, que presentan resistencia innata a la infección. Estos individuos se denominan expuestos no infectados o ENI (del inglés, *Exposed Non Infected*) y constituyen un grupo de gran interés ya que han contribuido a identificar algunos de los mecanismos de respuesta contra la infección por VIH-1 (Clerici et al. 1994). Dicho grupo de individuos presenta una gran heterogeneidad, ya que en él se incluyen hijos seronegativos nacidos de madres infectadas, parejas serodiscordantes (un miembro de la pareja es seropositivo y el otro seronegativo), personas seronegativas que ejercen el trabajo sexual sin protección, personas seronegativas que han recibido transfusión de sangre contaminada, o usuarios de droga por vía parenteral que son seronegativos a pesar de haber intercambiado jeringas durante largos periodos de tiempo.

En los pacientes seropositivos el ritmo de progresión de la enfermedad es muy variable. Atendiendo a este criterio podemos clasificar los individuos infectados por VIH-1 en progresores rápidos, intermedios, lentos y no progresores a largo plazo (Figura 11).



**Figura 11.** Clasificación de los pacientes VIH-1 positivos según el ritmo de progresión a sida.

Los progresores rápidos son aquellos individuos VIH-1 positivos (VIH+) que progresan a sida en los primeros 5 años después de la infección (Anzala et al. 1995) y representan entre el 5 y el 10% de los individuos infectados. Dicho grupo de pacientes se caracteriza por presentar una elevada carga viral, que no desciende de forma significativa tras la infección primaria, acompañada por un descenso rápido y acusado en los niveles de linfocitos T CD4+ y una disminución de la respuesta CD8+ no citolítica capaz de suprimir la replicación viral. Los progresores intermedios representan entre el 80 y el 90% de los individuos infectados y progresan a sida en un periodo de entre 5 y 10 años después de la infección. Estos pacientes presentan una disminución progresiva en el número de linfocitos T CD4+ y una respuesta significativa de tipo CD8+ citotóxica tras el periodo de infección primaria, que disminuye de forma progresiva durante el transcurso de la misma. Los progresores lentos son aquellos individuos VIH+ que desarrollan sida tras más de 10 años de infección. Entre ellos hay un grupo de individuos que no presentan síntomas de la enfermedad tras más de 15 años de infección. Estos individuos se conocen como no progresores a largo plazo o LTNP (del inglés, *Long Term Non Progressors*) y se caracterizan porque en ausencia de tratamiento antirretroviral permanecen asintomáticos, sin inmunosupresión celular, con cargas virales bajas o indetectables (Bartnof 1995) y una fuerte respuesta inmunológica humoral y celular (linfocitos CD8+ y un balance Th1/Th2 con resultado Th1>Th2).

### 3.8.- Respuesta inmune frente al VIH-1

La respuesta inmune desencadenada frente a la infección por VIH-1 es del tipo humoral y celular y ambas pueden ser tanto específicas como inespecíficas.

La respuesta humoral específica inducida por el VIH-1 consta de una intensa producción de anticuerpos contra prácticamente todas las proteínas reguladoras y estructurales del virus. Los anticuerpos que actúan sobre las proteínas gp41 y gp120 son de acción neutralizante, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que se cree que tienen un papel protector frente a la infección. No obstante, la producción *in vivo* de estos anticuerpos es muy baja, lo que podría ser debido a que el dominio variable 3 (V3) y el de interacción con CD4 de la proteína gp120 quedan ocultos en la conformación nativa de la misma. En la respuesta humoral inespecífica frente al VIH-1 intervienen factores solubles como los interferones o el complemento que han demostrado su actividad antiviral pero no son suficientes para detener la infección.

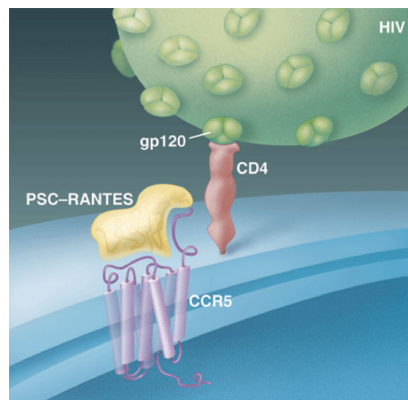
Los linfocitos T, tanto los Th como los Tc, son los principales mediadores en la respuesta celular frente a la infección por VIH-1. Las células presentadoras de antígenos infectadas por VIH-1 degradan y procesan los antígenos víricos para presentar los determinantes antigénicos en una molécula del MHC en la superficie celular. Los linfocitos Tc reconocen los determinantes antigénicos en superficie mediante el TCR y destruyen las células infectadas (respuesta celular específica). Se ha observado que dichos linfocitos realizan una expansión clonal *in vitro* en pacientes seropositivos (McMichael and Rowland-Jones 2001). Se ha demostrado que la respuesta por parte de los linfocitos Th es esencial para la puesta en marcha de una respuesta inmune eficaz contra el VIH-1 (Ghanekar et al. 2001). Los linfocitos Th pueden ser de la subpoblación Th1 o Th2, lo que condicionará el patrón de citocinas secretadas y por lo tanto el tipo de respuesta inmune generada. En la infección por VIH-1 predomina la respuesta Th1, sin embargo, esta respuesta es débil debido al descenso del número de linfocitos Th que secretan IFN- $\gamma$  (responsable de la polarización de células Th1) (Norris and Rosenberg 2001) y IL-2 (actúa en el proceso de activación de la respuesta citotóxica) durante el transcurso de la infección. Por otro lado, los linfocitos Th2 están implicados en la activación y diferenciación de eosinófilos y ayudan a los linfocitos B favoreciendo la producción de IgM y IgE. La IL-4 secretada por los linfocitos Th2 se relaciona con una inhibición de la expresión del correceptor viral CCR5. Este hecho sugiere que un entorno Th2 sería beneficioso en el control de la infección por VIH-1 (Kidd 2003). El correcto balance de las respuestas Th1/Th2 junto con su mantenimiento a lo largo de la infección es clave para el control de la enfermedad (Galli et al. 2001). El mantenimiento de dicho balance depende en parte de múltiples factores genéticos del huésped así como de

factores ambientales como la vitamina D (véase más adelante). En los procesos de inmunidad celular inespecífica tienen lugar fenómenos tanto de citotoxicidad natural por parte de las células NK como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

### 3.9.- Factores genéticos del huésped frente al VIH-1

Además de los factores de restricción del huésped descritos anteriormente APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ , BST-2 y SAMHD1, se han descrito múltiples factores genéticos que determinan la susceptibilidad a la infección por VIH-1 y el ritmo de progresión a sida. De entre estos cabe destacar el papel ampliamente documentado de la variabilidad en el sistema HLA y de variantes del receptor CCR5.

La variación en la región altamente polimórfica del MHC es el principal componente genético relacionado con el control inmunológico del VIH-1 (Fellay et al. 2007; The International HIV Controllers Study 2010). Este efecto se debe casi en su totalidad a determinados alelos del MHC-I, muchos de los cuales han sido previamente vinculados con tasas de progresión de la infección por VIH-1 en estudios de epidemiología molecular (Carrington et al. 1999; Deeks and Walker 2007; Kaslow et al. 1996; Kiepiela et al. 2004; Goulder and Watkins 2008) y a la ventaja del heterocigoto, anteriormente comentada.



**Figura 12.** Competición de RANTES con el VIH por la unión a CCR5. Imagen adaptada de Cohen 2004.

Otro ejemplo bien conocido corresponde al gen *CCR5* (del inglés, *CC chemokine receptor 5*) implicado tanto en la respuesta inmune innata como en el proceso de inflamación. Dicho gen codifica para un receptor de quimiocinas que se localiza en la membrana celular. El VIH-1 utiliza este receptor para unirse a la membrana

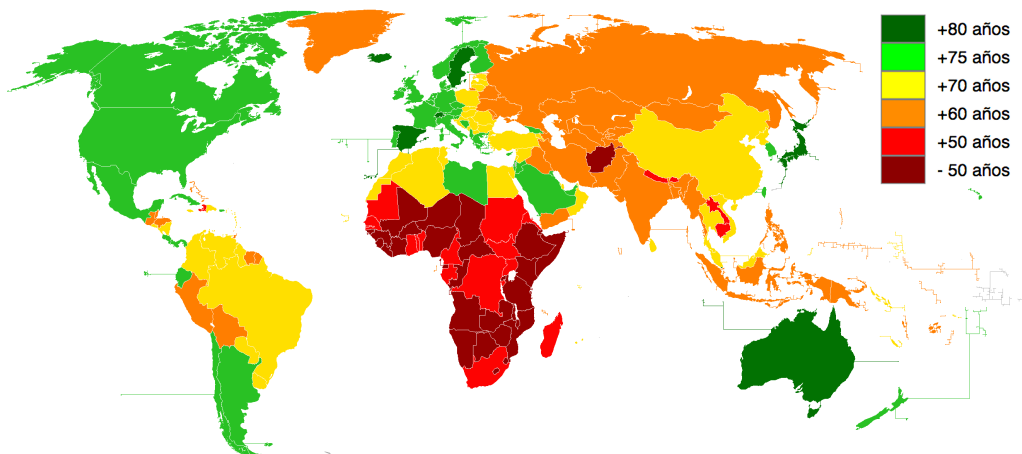
celular y entrar en la célula. Se ha descrito el polimorfismo rs333 o  $\Delta 32$  que en homocigosis determina la síntesis de un receptor no funcional que no se exporta a membrana (Liu et al. 1996). La ausencia del receptor confiere resistencia a la infección por VIH-1. Uno de los ligandos naturales de CCR5 es la quimiocina proinflamatoria RANTES (del inglés, *Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*) o CCL5. Se ha propuesto que RANTES puede competir con el VIH-1 por su unión a CCR5 (Figura 12). En línea con esta hipótesis, polimorfismos de *RANTES*, que reducen su transcripción, se han asociado con mayor riesgo de infección por VIH-1 y una progresión más rápida a sida. Las características y funciones de RANTES y CCR5 se detallan más adelante.

## 4.- SISTEMA INMUNE Y ENVEJECIMIENTO

La longevidad es un fenómeno muy complejo en el que se encuentran implicados factores ambientales, sociales, estocásticos y biológicos. El potencial de vida máximo o esperanza de vida potencial, es el número máximo de años que puede vivir un individuo de una determinada especie y tiene un fuerte componente biológico (Figura 13). Por otro lado, la esperanza de vida poblacional es la media del número de años que vive una determinada población en un cierto período de tiempo, este rasgo es multifactorial y está basado tanto en factores biológicos como en no biológicos (Figura 14). En los seres humanos, como en otras especies, los individuos longevos surgen como resultado de una vida exitosa sin factores estocásticos dañinos y con un envejecimiento saludable.

Mosca – 17 días	
Estornino – 17 meses	
Carpa – 19 años	
Tiburón – 25 años	
Gato – 36 años	
Langosta – 50 años	
Elefante – 70 años	
Humano – 120 años	

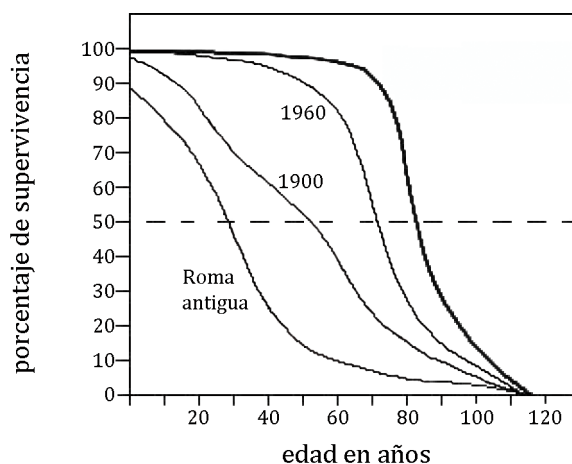
**Figura 13.** Esperanza de vida potencial de distintas especies.



**Figura 14.** Distribución geográfica de la esperanza de vida poblacional. Imagen adaptada de Wikipedia.



En los países desarrollados, las mejoras socioeconómicas y los avances en la prevención y el tratamiento de enfermedades, han reducido la mortalidad causada por enfermedades e incrementado de forma significativa la esperanza de vida de la población. Ello ha creado un nuevo escenario donde un mayor número de individuos alcanzan la vejez (Figura 15). En este nuevo escenario los factores biológicos relacionados con la longevidad y el proceso de envejecimiento han podido actuar, permitiendo a los individuos portadores de factores promotores de longevidad, alcanzar la vejez extrema. Distintos estudios han evaluado el posible componente genético de la longevidad mediante estudios con gemelos y han demostrado que tener un hermano gemelo longevo incrementa las probabilidades de llegar a edades avanzadas (Christensen et al. 2006).



**Figura 15.** Cambios en la esperanza de vida poblacional en distintos periodos históricos. Los cambios en la esperanza de vida poblacional no conllevan cambios en la esperanza de vida potencial. Imagen adaptada de Minsky 1994.

Actualmente, el proceso de envejecimiento se considera resultado de la acumulación de daños en macromoléculas, células y tejidos, que de no ser corregido, produce una disfunción sistémica que conduce a la muerte del individuo. Según las teorías de la red y de la remodelación del envejecimiento, la acumulación de daño se da por la actuación de ciertos factores de estrés que incluyen agentes físicos, como los rayos UV, la radiación gamma o el calor; químicos, como radicales libres de oxígeno y azúcares reductores; y biológicos como virus y bacterias. Sin embargo, existen una serie de mecanismos a lo largo de la vida que intentan corregir el daño causado por estos factores de estrés como son los mecanismos celulares de mantenimiento, como las enzimas de reparación del ADN, la corrección del daño oxidativo mediante enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa), proteínas de choque térmico y otras proteínas de estrés (H-Ras), y la respuesta del sistema inmune contra patógenos y células tumorales. Aunque el potencial de vida máximo que

confieren los factores de defensa es similar dentro de una especie, la variabilidad genética que existe en la población genera una variabilidad en la longevidad esperada a nivel individual.

## 4.1.- Teorías del envejecimiento

En el transcurso de los años se han postulado distintas teorías acerca del proceso de envejecimiento que se resumen a continuación.

**1.- Teoría del desgaste de órganos y tejidos** o teoría del ritmo de vida. Se fundamenta en que las células del cuerpo se van estropeando conforme pasa el tiempo debido a su uso. Se propone que las personas que han vivido forzando su cuerpo o que han tenido un estilo de vida poco saludable, viven menos tiempo. Los radicales libres serían las sustancias responsables del desgaste de las células relacionadas con los estilos de vida nocivos, sobre todo de las mitocondrias, que no tienen capacidad de reparar su ADN.

**2.- Teoría de la intoxicación por sustancias intrínsecas** o teoría de la autointoxicación. Se basa en la acumulación de sustancias de desecho en el interior o exterior de la célula durante el transcurso de la vida, como son la lipofuscina y otros pigmentos o la creatinina y el colesterol, que son productos del metabolismo celular.

**3.- Teoría del trastorno glandular** o endocrino. Considera que los órganos endocrinos como las gónadas, son los responsables del envejecimiento debido a las observaciones de eunucos, hipotiroideos y diabéticos, que envejecen precozmente.

**4.- Teoría de los genes.** Se basa en que el envejecimiento podría deberse a la existencia de uno o más genes que se modifican y provocan el envejecimiento, el gen principal se denomina *WRN* y al sufrir alteraciones provoca envejecimiento (Saunders et al. 2008).

**5.- Teoría de la red de envejecimiento.** Considera el proceso de envejecimiento como el resultado de la acumulación de daños en macromoléculas, células y tejidos que, de no ser corregido, produce una disfunción sistémica que conduce a la muerte del individuo. La versión más reciente del modelo de red incorpora las siguientes características: posible acumulación de mitocondrias defectuosas, efectos de las proteínas aberrantes en la síntesis de proteínas, acciones perjudiciales de los radicales libres de oxígeno junto al papel protector de las enzimas antioxidantes, y el *turnover* de las proteínas por *scavengers* proteolíticos (macrófago denominado barrendero). Este modelo se ha denominado el modelo

MARS (proteínas de las Mitocondrias, las proteínas Aberrantes, Radicales libres y Scavenger) (Kirkwood and Kowald 1997).

Esta teoría utiliza el término inmunosenescencia para referirse al progresivo deterioro del sistema inmunológico provocado por el avance de la edad, tanto en la capacidad para responder a infecciones como en el desarrollo de memoria inmunológica a largo plazo. La inmunosenescencia no es un fenómeno de deterioro al azar, sino que más bien parece un patrón evolutivo donde la mayoría de los parámetros afectados parecen estar bajo control genético (Franceschi et al. 1999).

**6.- Teoría de la remodelación del envejecimiento.** Es una extensión de la teoría de la red de envejecimiento y sugiere que la inmunosenescencia es el resultado neto de la continua adaptación del cuerpo a cambios perjudiciales que ocurren en el tiempo. De acuerdo con esta hipótesis, los recursos del cuerpo se optimizan continuamente y la inmunosenescencia debe considerarse como un proceso muy dinámico, que incluye tanto pérdida como ganancia (Franceschi et al. 2000c). La clave es la adaptación, y por lo tanto la predicción más importante es que los individuos sanos de edad extrema son aquellos que tienen la mejor capacidad para adaptarse a los agentes que dañan y, en particular a los factores estresantes inmunológicos. Si esta suposición es cierta, al contrario de lo que indicaría el sentido común, se puede predecir que los individuos que responden más fuerte a factores estresantes inmunológicos y son capaces de montar una respuesta inmune fuerte contra las bacterias, virus y otros desafíos antigénicos, tendrán una ventaja a corto plazo, pero sobrevivirán menos que los que tienen una capacidad de respuesta menor, pero eficiente para responder a los factores antigénicos estresantes.

## **4.2.- Perspectiva epidemiológico-evolutiva del envejecimiento**

La existencia de factores genéticos que contribuyen a una mayor longevidad ha sido objeto de debate y controversia. El efecto de la selección natural está directamente vinculado con la eficacia biológica o *fitness*, contribución media de un genotipo al *pool* genético de la próxima generación. Por ello cabe esperar que la acción de la selección natural tras el período fértil de un individuo disminuya con la edad. Si bien ello indicaría la no existencia de selección a favor de factores genéticos de longevidad, algunos autores (Hawkes 2004) han postulado la teoría conocida como "*The grandmother effect*" según la cual, bajo un modelo de selección de grupo, la existencia de individuos de edad avanzada podría ser seleccionada para garantizar la transmisión de conocimientos y experiencias adquiridas por el grupo, así como para contribuir al cuidado de los individuos

jóvenes. Esta teoría explicaría que a diferencia de la mayoría de animales, las mujeres sobrevivan un largo periodo de tiempo más allá de su etapa reproductiva.

El estudio de los factores genéticos implicados en el envejecimiento no solo se centran en aquellos que incrementan la longevidad, sino que también están interesados en la caracterización de aquellos factores que contribuyen a un envejecimiento saludable.

Desde la perspectiva del envejecimiento saludable, los alelos con efectos positivos sobre la eficacia biológica que tengan una acción tardía negativa se pueden acumular en el *pool* genético de la población. Estos alelos pueden jugar un papel importante al conferir un mayor riesgo poblacional de manifestación de enfermedades de aparición en edad avanzada. Así, elevados niveles de testosterona en hombres jóvenes, que se asocian con un incremento en la agresividad y crecimiento muscular y óseo, han sido seleccionados por su contribución a una mayor eficiencia reproductiva. Sin embargo, dichos niveles elevados pueden tener efectos perjudiciales a edades más avanzadas, al ser un factor de riesgo para distintas enfermedades de manifestación tardía.

Hasta el último siglo la esperanza de vida en la especie humana no ha superado los 45-50 años. En este escenario las consecuencias negativas de los factores seleccionados en edades tempranas no llegaban a manifestarse. El incremento en la esperanza de vida producido en el último siglo ha tenido como consecuencia un incremento en la prevalencia de enfermedades de manifestación tardía que, en último término, pueden ser debidas a la presencia de factores genéticos de riesgo seleccionados como beneficiosos en edades tempranas. En este sentido, los individuos de edad extrema, como los ancianos mayores de 85-90 años y los centenarios, revelan la existencia de un grupo de individuos capaces de superar la etapa de máxima incidencia de enfermedades, y entre cuyas características puede encontrarse la ausencia de los factores genéticos de riesgo anteriormente mencionados. Es por ello que la caracterización genética de este grupo de individuos tiene un gran interés ya que pueden contribuir de forma significativa a la identificación de factores genéticos implicados en el envejecimiento saludable.

Existen numerosos estudios que describen las diferencias entre hombres y mujeres en el proceso de envejecimiento y longevidad, siendo las mujeres las que tienen una esperanza de vida más elevada. Existen datos epidemiológicos sobre individuos longevos que documentan una mayor prevalencia de las mujeres en comparación con los hombres, lo que sugiere la existencia de tasas de mortalidad específicas de sexo que siguen trayectorias diferentes. Se han considerado tanto modelos demográfico-culturales como biológicos en la interpretación de dichas diferencias. Ninguno de los modelos demográfico-culturales alcanza a explicar las

diferencias en las tasa de mortalidad observadas entre sexos (Wingard 1984). En cuanto a los modelos biológicos, los resultados obtenidos han sido conflictivos (Austad 2009). Se ha descrito dimorfismo sexual en el fondo genético de la respuesta inmune, ejemplo de ello es la mayor prevalencia de alelos anti-inflamatorios de la citocina IL-10 en hombres longevos (Lio et al. 2003) o el incremento del supratipo de hiperactividad inmune A1B8Cw7DR3 del HLA (Rea and Middleton 1994). Asimismo, se ha sugerido que el estrógeno, la hormona sexual femenina, puede aumentar la expresión de enzimas antioxidantes, y desempeña un papel protector al prevenir la aparición de enfermedades degenerativas, y al reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares gracias a la modulación de los factores fibrinolíticos (Eskes and Haanen 2007).

### **4.3.- Respuesta inmune y envejecimiento**

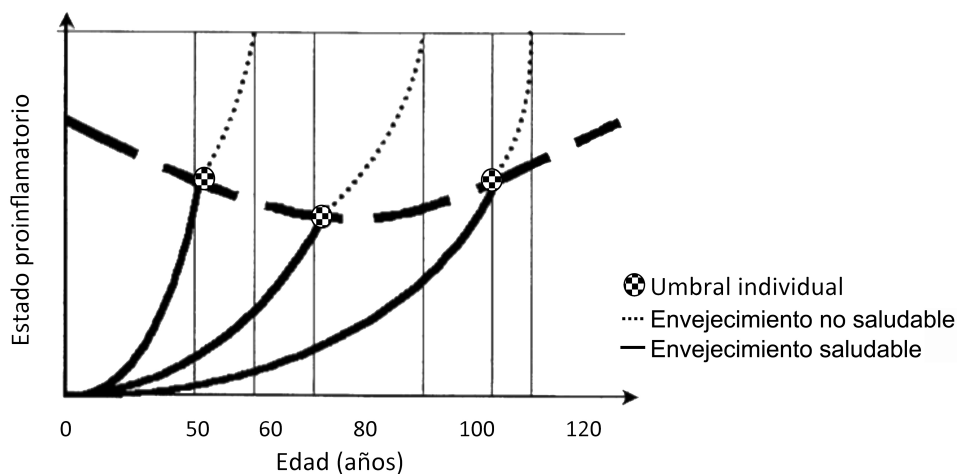
Una de las características que acompaña al proceso de envejecimiento es el deterioro de componentes del sistema inmunológico. Ello comporta una disminución en la capacidad de organizar una respuesta inmune adecuada que presenta un fuerte paralelismo con procesos de inmunodeficiencia natural (Burns and Goodwin 1997). Los principales componentes de la respuesta innata afectados en dicho proceso son la respuesta inflamatoria y la respuesta innata celular. Ambos mecanismos se describen a continuación.

#### **4.3.1.- Inflamación y envejecimiento: *Inflamm-aging***

La teoría de la red de envejecimiento fue ampliada por Franceschi et al. 2000a que argumenta que la reducción global en la capacidad para hacer frente a los factores de estrés y el incremento progresivo en el estado proinflamatorio característicos del proceso de envejecimiento son consecuencia de una carga antigénica continua y estrés mantenidos a lo largo de la vida de un individuo. Este nuevo concepto fue definido como *Inflamm-aging*. Dentro de esta teoría, se postula el proceso de envejecimiento como resultado de estrés crónico sobre ciertos tipos celulares como los macrófagos (relación directa entre su activación y la inflamación crónica en los ancianos) o los linfocitos (que con el paso del tiempo sufren la expansión de las células de memoria, disminución de las células *naive*, disminución del repertorio de linfocitos T y la reducción global del “espacio inmunológico” (Franceschi et al. 1999)). Estos acontecimientos pueden explicar, al menos en parte, el estado proinflamatorio que acompaña el proceso de envejecimiento. Esta situación también podría explicar la aparición de las principales enfermedades relacionadas con la edad como son la arteriosclerosis, demencia, osteoporosis o diabetes, cada una de ellas con un importante componente inflamatorio. En este sentido, se ha propuesto que el equilibrio entre

las citocinas pro- y anti-inflamatorias pueda ser utilizado como perfil indicador de morbilidad y mortalidad en personas mayores (Van den Biggelaar et al. 2004).

El proceso inflamatorio ejerce un efecto esencial y beneficioso en la protección contra patógenos y la propagación de células tumorales. Sin embargo, la continua activación de la respuesta inmune puede dar lugar a un estado inflamatorio crónico con efectos perjudiciales que se acumulan con la edad. No obstante, existen estudios que indican que un mismo patrón inflamatorio puede ser compartido por ancianos enfermos y centenarios sanos (Baggio et al. 1998; Chiricolo et al. 1986; Mari et al. 1995; Mari et al. 1996).



**Figura 16.** Umbrales individuales de *Inflamm-aging*. Imagen adaptada de Franceschi et al. 2000a.

Todo ello ha llevado a plantear un modelo según el cual existe un umbral inflamatorio específico para cada individuo, a partir del cual la inflamación o el estrés producirían daño. Tal como se muestra en la Figura 16, cuando dicho umbral es traspasado, se produce la transición entre el envejecimiento saludable (línea continua) y el envejecimiento no saludable (línea punteada). De acuerdo con datos epidemiológicos, una vez superado el umbral inflamatorio, el tiempo de duración de la etapa de envejecimiento no saludable (discapacidad) es mayor en ancianos de 60 a 80 años que en adultos jóvenes o en centenarios. El modelo predice que los individuos longevos requieren más tiempo para alcanzar este umbral (Franceschi et al. 2000a), lo que concuerda con datos de estudios recientes que indican que los centenarios han vivido en buenas condiciones y sin impedimentos hasta edades muy avanzadas (Hitt et al. 1999), a pesar de que en la mayoría de ellos los parámetros bioquímicos relacionados con la inflamación puedan llegar a valores elevados (Baggio et al. 1998; Bruunsgaard et al. 1999; Chiricolo et al. 1986; Hitt et al. 1999; Mannucci et al. 1997; Mari et al. 1996; Mari et al. 1995). Según estos autores, se puede asumir que la velocidad a la que un

individuo alcanza el umbral inflamatorio, por encima del cual se da un envejecimiento no saludable, depende en gran medida del componente genético.

Los estudios sobre el componente genético de la longevidad han evaluado el papel de la variabilidad de los genes del sistema inmune, especialmente aquellos involucrados en inflamación. Los resultados obtenidos indican que las variantes que determinan una activación persistente de la respuesta inflamatoria se asocian con envejecimiento no saludable, mientras que aquellas que contribuyen a evitar una inflamación persistente se asocian a un envejecimiento saludable (véase más adelante).

#### **4.3.2.- Efectos del envejecimiento en las células del sistema inmune innato**

Los efectos del proceso de envejecimiento en la respuesta inmune innata han sido ampliamente revisados en los últimos años (Gomez et al. 2005; Gomez et al. 2008; Mahbub et al. 2011; Panda et al. 2009; Plackett et al. 2004; Weiskopf et al. 2009). Experimentos *in vitro* indican que el envejecimiento ejerce efectos negativos sobre la funcionalidad y el número de células del sistema inmune innato. Los cambios experimentados por dichas células durante el proceso de envejecimiento se resumen en la Tabla 3.

En los ancianos se observa un deterioro de múltiples funciones de los neutrófilos, como la reducción de su capacidad fagocítica, de la síntesis de intermediarios reactivos del oxígeno y de la eficiencia en la eliminación intracelular de patógenos (Fulop et al. 2004; Tortorella et al. 2007). El envejecimiento también afecta las funciones de los macrófagos, incluyendo su actividad fagocítica, secreción de citocinas y quimiocinas, defensa antibacteriana, infiltración y reparación de lesiones, y presentación de antígenos (Sebastián et al. 2005). Existen evidencias contradictorias respecto a los efectos del envejecimiento en el número y en las propiedades funcionales de células NK (Mocchegiani et al. 2003; Peralbo et al. 2007). Aunque los estudios sobre mastocitos (Hart et al. 1999; Montagna and Carlisle 1990; Nguyen et al. 2005) y eosinófilos (Kasper et al. 1999; Leng et al. 2005) son limitados, se ha descrito que tanto el número de células como sus propiedades funcionales parecen estar alteradas con la edad.

Tabla 3. Efectos del envejecimiento en células del sistema inmune.

Tipo celular y cambios en envejecimiento	Referencias
<b>Neutrófilos</b>	
↓ en la fagocitosis y en la quimiotaxis	
↑ o SC en la expresión de TLR4 y ↓ en la de TLR2	
↓ En la señalización MAPK de p38 y ERK, ↓ en el flujo de Ca <sup>2+</sup>	(Fulop et al. 2004)
↓ En la producción de radicales libres	
↑ En el contenido de fosfolípidos	
<b>Mastocitos</b>	
↓ En el número presente en la epidermis	(Montagna and Carlisle 1990)
↑ Degranulación en la enfermedad varicosa	(Pascual et al. 2007)
<b>Eosinófilos</b>	
SC en el número de células en el esputo	(Vignola et al. 2003)
↓ De la liberación de EDN en respuesta a IL-5 en pacientes con asma y en respuesta a fMLP ( <i>formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i> )	(Mathur et al. 2008)
↓ De la producción de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en respuesta a PMA ( <i>phorbol myristate acetate</i> )	
<b>Monocitos/macrófagos</b>	
↓ En la producción de IL-6 y TNFα inducida por TLR1/2	
↓ En la expresión en superficie de TLR1 y TLR4	(Van Duin et al. 2007)
↓ En la inducción de CD80 por TLR	
↓ Fagocitosis	(Fietta et al. 1994)
↓ En el porcentaje de macrófagos CD68+ en la médula ósea	(Ogawa et al. 2000)
↓ Quimiotaxis, ↓ Expresión de moléculas MHC-II	
↓ Cicatrización de heridas (retardada)	(Lloberas and Celada 2002; Plowden et al. 2004)
↓ En la señalización MAPK de p38 y ERK	
↓ Producción de intermediarios reactivos de oxígeno	
<b>Células NK</b>	
↑ En el número de células	(Mariani et al. 2001; Solana and Mariani 2000)
↓ En la citotoxicidad	
↓ En la proliferación y producción de IFN-γ inducida por IL-2	
↓ Flujo Ca <sup>2+</sup>	(Borrego et al. 1999)
↓ Hidrólisis retrasada de PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	
↓ Niveles Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	
↓ Producción de quimiocinas (MIP-1α, RANTES y IL-8) inducida por IL-2 y IL-12	(Krishnaraj and Bhooma 1996; Mariani et al. 2002)
SC en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos	(Edwards and Avis 1979; Fernandes and Gupta 1981)
<b>Células dendríticas</b>	
↑ o SC en número de DC mieloides	(Agrawal et al. 2007; Bella et al. 2007)
↓ o SC en número de DC plasmacitoides	
↓ Densidad de células de Langerhans en la piel	(Bhushan et al. 2002; Bodineau et al. 2007)
↓ Pinocitosis, endocitosis y de la migración inducida por quimiocinas	
↑ Producción de IL-6 inducida por TLR-4 y TLR-8 y TNF-α en DCs derivadas de monocitos	(Agrawal et al. 2007)
↓ En la producción de IL-12 inducida por LPS en DCs mieloides	(Bella et al. 2007)
↓ En la producción de IFN-α en células mononucleares de sangre periférica	(Shodell and Siegal 2002)

SC: sin cambios. DC: células dendríticas



Existen numerosos estudios que sugieren que el envejecimiento está asociado con el aumento de la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos y fibroblastos (De Martinis et al. 2006; Licastro et al. 2005). Se considera que los niveles elevados de dichos mediadores son los responsables de la mayoría de las enfermedades asociadas con la edad, como la diabetes, la osteoporosis y la arteriosclerosis, todas ellas con un fuerte componente inflamatorio.

#### **4.3.3.- Factores genéticos implicados en el proceso de envejecimiento**

La implicación de factores genéticos en el proceso de envejecimiento se ha evaluado mediante distintas estrategias que indican que un 20-30% de la variabilidad en la esperanza de vida puede ser atribuida a factores genéticos (vB Hjelmborg et al. 2006). Los estudios de parejas de gemelos monocigóticos indican que si uno de los hermanos es longevo se incrementa la probabilidad de que el otro alcance edades avanzadas (Skytthe et al. 2003). Asimismo, estudios de familias de individuos longevos han revelado que la descendencia de uno o dos progenitores longevos tienen una menor prevalencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Terry et al. 2004) y que los hermanos e hijos de nonagenarios tienen menores tasas de mortalidad y morbilidad y mayor probabilidad de alcanzar edades extremas (Westendorp et al. 2009).

Existen evidencias experimentales con modelos animales que demuestran la contribución de los factores genéticos en el proceso de envejecimiento. Así, ratones con variantes en los genes *IGF-1R* (del inglés, *insulin-like growth factor 1*) y *PI3KCB* (del inglés, *phosphoinositide-3-kinase*), que incrementan los niveles de IGF-1 libre en plasma, tienen una esperanza de vida menor (Holzenberger et al. 2003). Se postula que la disminución de los niveles plasmáticos de IGF-I minimizan el estímulo mitogénico generalizado en los tejidos y reducen la incidencia de cáncer lo que contribuye a una mayor esperanza de vida. Ello concuerda con los bajos niveles plasmáticos de IGF-1 libre encontrados en humanos longevos (Arai et al. 2001b; Bartnof 1995; Clerici et al. 1994; Donlon et al. 1990; Paolisso et al. 1997). Estudios en *Caenorhabditis elegans* demuestran que mutaciones en los genes *age-1* y *daf-2*, que forman parte de la red de señalización *insulin-like*, confieren resistencia al estrés oxidativo y un aumento en la expresión génica de Mn-SOD, que se traducen en un incremento de la esperanza de vida (Honda and Honda 2002). Otro factor que se ha asociado con el envejecimiento es el acortamiento de telómeros, cuya función se centra en el mantenimiento de la estructura del cromosoma. Se ha descrito que durante el proceso de división celular, se produce un acortamiento de los telómeros. Dicho acortamiento tiene lugar en cada replicación del ADN y se produce en el extremo 5' de la cadena de ADN nuevo. Como consecuencia del acortamiento de los telómeros la célula se detiene en la fase G0, lo que deriva en pérdida de

viabilidad y senescencia. Además, estudios en diversos modelos animales muestran que mutaciones en el ADN mitocondrial podrían estar implicadas en el proceso de envejecimiento (Lee and Wei 2012), así como su asociación en humanos con envejecimiento no saludable (Courtenay et al. 2012; Pinós et al. 2012).

Complementando las evidencias experimentales, estudios de epidemiología genética sustentan un papel significativo del fondo genético en el proceso de envejecimiento. Así, siguiendo un modelo caso-control, distintos estudios de asociación han observado diferencias en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de varios genes entre individuos agrupados según edad. Entre estos cabe destacar la asociación descrita para variantes de los genes *APOE* (apolipoproteína E), *ACE* (enzima convertidora de angiotensina I) o los genes del sistema HLA. Los resultados más significativos de los estudios de asociación descritos en la literatura están accesibles online en la base de datos GeneAge (<http://genomics.senescence.info/genes/longevity.html>).

De entre los genes analizados en los estudios de asociación con longevidad cabe destacar aquellos relacionados con el sistema inmune y en especial los implicados en la respuesta inflamatoria, que representan aproximadamente el 30% de los genes listados en la base de datos de GeneAge .

En este sentido, cabe destacar los estudios realizados con los genes inflamatorios *IL-6*, *IL-10*, *TNF $\alpha$*  y *TNF $\beta$ 1*. Se ha descrito que los sujetos con variantes que incrementan la expresión de la interleucina IL-6, tienen menos probabilidades de alcanzar edades extremas (Candore et al. 2006). Dicha citocina regula el balance de la respuesta pro- y anti-inflamatoria. Asimismo, el alelo G del polimorfismo -1082A/G, que confiere niveles elevados de expresión de la interleucina anti-inflamatoria IL-10, se encuentra asociado con un incremento en la esperanza de vida (Lio et al. 2002a). En línea con ello, se ha descrito que la combinación de alelos anti-inflamatorios en *IL-10* (-1082G) y *TNF $\alpha$*  (-308A), que determinan un incremento de IL-10, y una reducción de *TNF $\alpha$* , respectivamente, se asocian con longevidad (Lio et al. 2003). Además, alelos del gen *TNF $\beta$ 1*, que confieren menor síntesis de la citocina, se han asociado a longevidad (Carrieri et al. 2004).

#### **4.3.4.- Factores ambientales implicados en el proceso de envejecimiento**

No podemos olvidar el papel que desempeñan los factores ambientales en el proceso de envejecimiento donde tienen gran importancia tanto los factores estocásticos como los controlables. Además de factores climatológicos, medidas de higiene y factores socio-culturales, la nutrición constituye uno de los factores ambientales con mayor efecto en el proceso de envejecimiento, ya que ésta

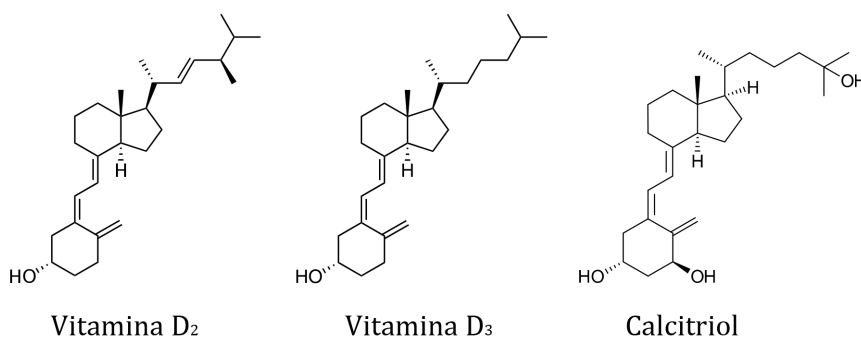
condiciona el aporte de nutrientes, vitaminas y minerales esenciales necesarios para el desarrollo de los procesos metabólicos.

Entre los factores nutricionales implicados en el proceso de envejecimiento, cabe destacar el papel de los nutrientes esenciales, como las vitaminas, y en especial la vitamina D. Dicha vitamina ha sido ampliamente considerada un factor protector y promotor de buena salud (Holick and Chen 2008). La deficiencia en vitamina D se ha descrito como factor de riesgo en la manifestación de enfermedades que acortan la vida (Heaney 2008), como el cáncer (Garland et al. 2009), enfermedades cardiovasculares (Gouni-Berthold et al. 2009), osteoporosis (Lash et al. 2009), sarcopenia (Visser et al. 2003) y diabetes (Danescu et al. 2009). Dicho efecto deriva de la acción pleiotrópica de la vitamina D cuyos efectos abarcan desde el metabolismo mineral y la proliferación celular a la modulación de la respuesta inmune. Datos recientes indican que los niveles bajos de 25-hidroxivitamina D en sangre se asocian con todas las causas de mortalidad en la población general (Dobnig et al. 2008), así como en hombres y mujeres mayores (Pilz et al. 2009). Por todo ello, se ha propuesto un papel significativo del metabolismo de la vitamina D en biogerontología (Hayes 2010).

**E**n la presente tesis se ha estudiado la variabilidad en genes de respuesta inmune y su papel en la infección por VIH-1 y en el proceso de envejecimiento natural. Se han seleccionado como candidatos tres genes implicados en la síntesis, transporte y señalización de la vitamina D (*CYP27B1*, *GC* y *VDR*), dos genes implicados en la mediación de la respuesta inflamatoria, *RANTES* y *CCR5* y un gen que codifica para uno de los factores de restricción de la infección por VIH-1, *BST-2*. Las características y funciones de dichos genes se detallan a continuación.

## 5.- VITAMINA D: RUTA METABÓLICA Y GENES IMPLICADOS

La vitamina D puede considerarse como un factor ambiental que actúa sobre el estado de salud. Fue descubierta inicialmente como un nutriente esencial que previene el raquitismo, aunque lo que hoy se conoce como vitamina D no es una vitamina sino que engloba una serie de hormonas secoesteroideas (las más conocidas son la vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol y la vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol, Figura 17).



**Figura 17.** Estructura química de las distintas formas de la vitamina D. Vitamina D<sub>2</sub>, vitamina D<sub>3</sub> y calcitriol (forma activa de la vitamina D).

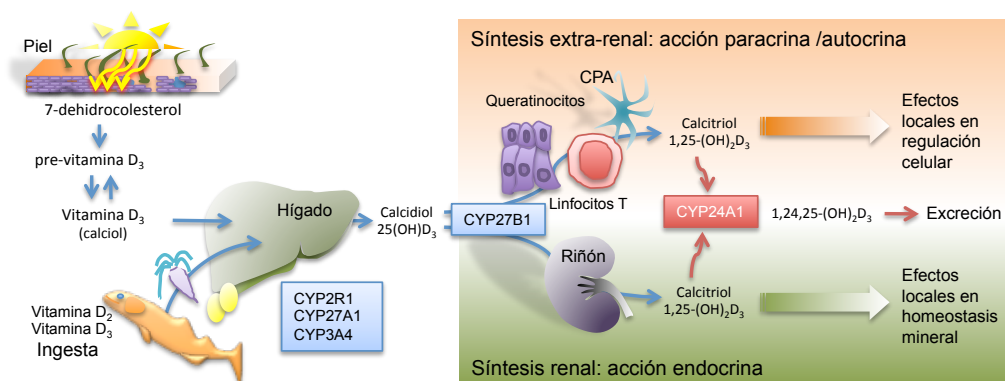
La vitamina D ejerce su acción a través de su receptor nuclear VDR (del inglés, *vitamin D receptor*), que es un factor de transcripción dependiente de ligando que modifica la expresión de distintos genes. La vitamina D tiene efectos

pleiotrópicos entre los que cabe destacar su papel en el metabolismo mineral y óseo, regulando la homeostasis del calcio y del fósforo, en la diferenciación y proliferación celular y en la modulación de la respuesta inmune, actuando tanto en la respuesta innata, mediante el estímulo de células presentadoras de antígenos, como en la respuesta adquirida, mediante la regulación del balance Th1/Th2.

## 5.1.-Síntesis de vitamina D

La vitamina D es una pro-hormona que ejerce sus acciones una vez ha alcanzado su forma activa. Las etapas más significativas del metabolismo de la vitamina D se detallan en la Figura 18. Las fuentes de vitamina D, como son la vitamina D<sub>2</sub> y la vitamina D<sub>3</sub>, pueden proceder de la ingestión de alimentos, principalmente del pescado graso como el salmón, la caballa y las sardinas (Chen et al. 2007) y de las yemas de huevo (Lamberg-Allardt 2006), o bien, de la síntesis endógena mediante una reacción fotolítica provocada por la radiación ultravioleta en la piel que transforma el 7-dehidrocolesterol en pre-vitamina D<sub>3</sub> (Lips 2006) que a su vez pasará a vitamina D<sub>3</sub> (también denominada calcitriol o calciferol) mediante un proceso de isomerización termogénica. Ambos tipos de fuentes están fuertemente vinculados a factores medioambientales, tales como el clima y la latitud, y al comportamiento social, como la dieta diaria, la exposición solar y la vestimenta. Además, se deben considerar los factores demográficos, como son los hábitos culturales, el género y la edad, así como el grado de pigmentación de la piel (Chen et al. 2007).

La vitamina D<sub>3</sub> puede ser selectivamente transportada en sangre por la proteína de unión a vitamina D conocida comúnmente como GC (del inglés, *Group-specific Component* o también conocida como DBP, *vitamin D Binding Protein*) hacia las células diana del sistema endocrino para su metabolización. Además, la vitamina D<sub>3</sub> suministrada por la dieta puede ser adsorbida a través del duodeno y transportada a través de la linfa por quilomicrones. La forma activa de la vitamina D<sub>3</sub> se forma mediante dos hidroxilaciones secuenciales. La primera hidroxilación la lleva a cabo la enzima citocromo P450 esterol 27-hidroxilasa (CYP27A1) en el hígado y da lugar a la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> o calcidiol (25(OH)D<sub>3</sub>). La segunda hidroxilación la realiza la enzima citocromo P450 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP27B1) en las células del túbulo proximal de la nefrona del riñón y da lugar a la 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> o calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), que además de ser la forma más activa de la vitamina D es su forma circulante más abundante, y por ello, sus niveles en plasma se utilizan como indicadores del estatus nutricional de vitamina D (Holick 1981).



**Figura 18.** Síntesis y degradación de la vitamina D. Imagen adaptada de Fibla and Caruz 2010.

Además de la síntesis renal, otros tejidos y tipos celulares tienen la capacidad de producir la forma activa de la vitamina D, tales como los queratinocitos (Huang et al. 2002), células de la mucosa del colon (Cross et al. 2001), células endoteliales (Zehnder et al. 2002), células presentadoras de antígenos o APC (del inglés, *Antigen-Presenting Cells*) como macrófagos (MAC) (Adams and Gacad 1985) y células dendríticas (DC) y otras células del sistema inmune. La 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> producida en los tejidos extra-renales actúa localmente de forma paracrina/autocrina y por lo general no contribuye a los niveles de hormona circulante.

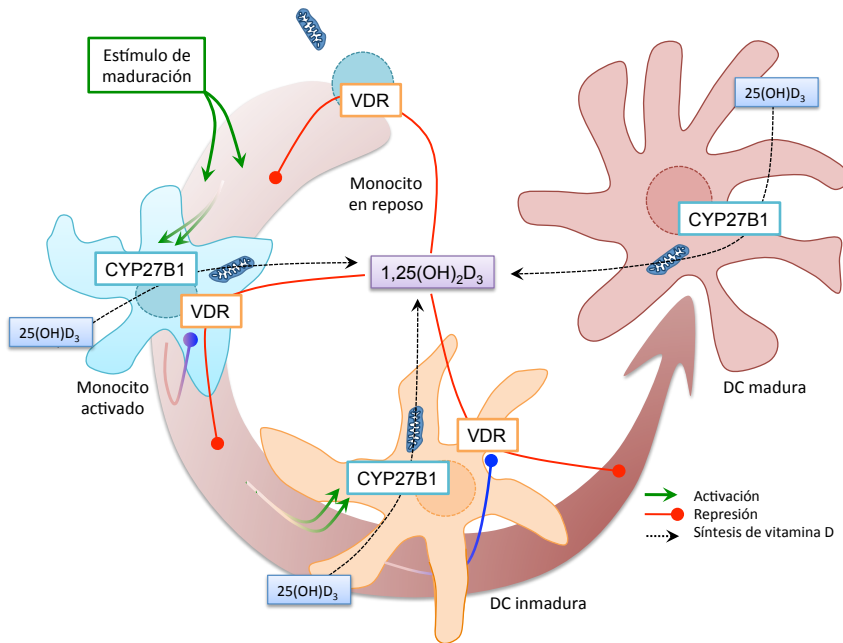
El catabolismo o inactivación de la vitamina D<sub>3</sub> se produce mediante la incorporación de un grupo hidroxilo a la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en la posición C-24 dando como resultado la formación de la 1,24,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (1,24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) gracias a la acción de la enzima 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> 24-hidroxilasa (CYP24A1), lo que permite su excreción en la bilis. La posible sobreproducción de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, y por tanto su posible toxicidad, se encuentra finamente regulada por un bucle de retroalimentación negativa mediante el cual la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induce la enzima CYP24A1 (Omdahl et al. 1972).

## 5.2.- Papel de la vitamina D en la regulación de la respuesta inmune

Además de las acciones de la vitamina D en el metabolismo mineral y óseo y en la diferenciación y proliferación celular, la vitamina D ejerce su acción inmunomoduladora en la respuesta innata y en la respuesta adquirida. La importancia de la modulación mediada por vitamina D queda patente ya que la mayoría de células del sistema inmune presentan la maquinaria necesaria para su completo metabolismo.

### 5.2.1.- Regulación del sistema endocrino de la vitamina D en las células inmunes

La regulación de la expresión del *VDR* en células presentadoras de antígenos, monocitos/macrófagos y células dendríticas, depende de su estado de maduración.

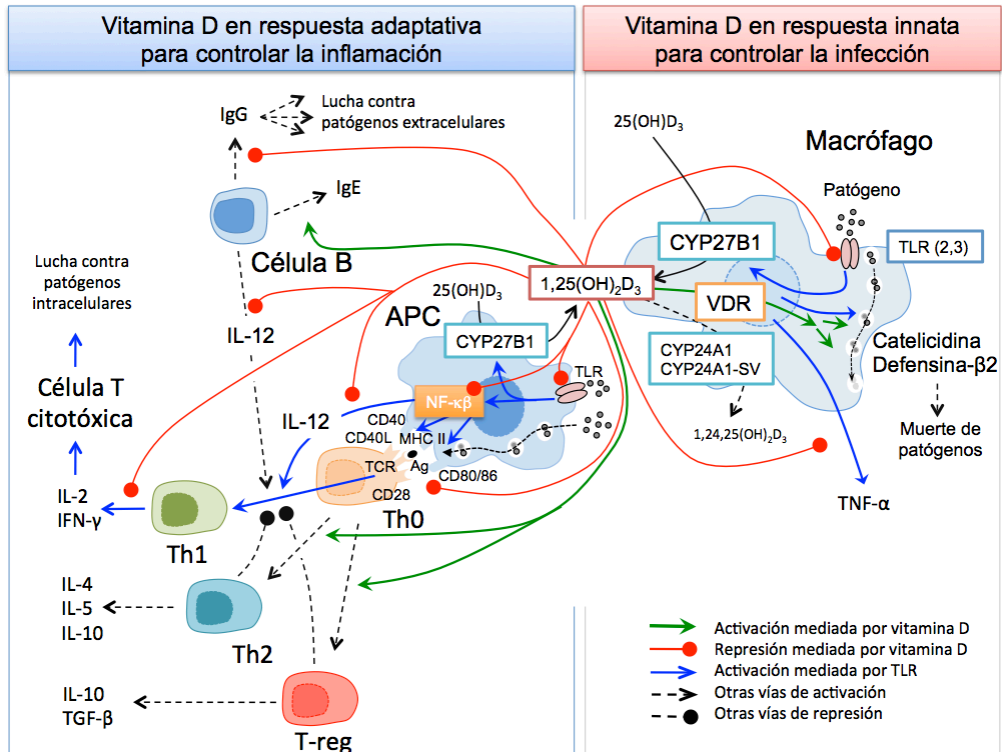


**Figura 19.** Regulación de la síntesis del VDR y de la CYP27B1 durante la maduración de las células presentadoras de antígenos. Imagen adaptada de Fibla and Caruz 2010.

Cuando un agente infeccioso interactúa con macrófagos y células dendríticas estas células maduran para poder captar y presentar antígenos. El proceso de maduración se caracteriza por la inducción de la expresión de *CYP27B1* y la inhibición de la expresión de *VDR* (Figura 19). Como consecuencia, las células presentadoras de antígenos maduras producen grandes cantidades de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> al mismo tiempo que pierden su capacidad para responder a la hormona. Como resultado, se genera un circuito paracrino en el que la hormona producida por las células presentadoras de antígenos maduras inhibe la maduración de las células presentadoras de antígenos inmaduras, que son capaces de responder a la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, contribuyendo así a la supresión de la activación inmune (Adams and Hewison 2008; Hewison et al. 2007).

### 5.2.2.- Acción de la vitamina D sobre la respuesta inmune innata

Las características principales del efecto de la vitamina D<sub>3</sub> en la regulación del sistema inmune se muestran en la Figura 20.



**Figura 20.** Papel de la vitamina D en las respuestas innata y adquirida. Imagen adaptada de Fibla and Caruz 2010.

La respuesta inmune debe ser finamente regulada para evitar una proliferación excesiva que causaría daño. La vitamina D<sub>3</sub> juega un papel clave en los mecanismos de regulación de esa respuesta. La síntesis de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> se induce en respuesta a la activación de los TLRs, y actúa de forma autocrina/paracrina promoviendo la síntesis de AMPs, como la catelicidina y la defensina-β2, y al mismo tiempo, manteniendo el control sobre el vigor de la respuesta adaptativa contra los patógenos (Adams 2006). La vitamina D es un regulador autocrino de la retroalimentación en la respuesta de los macrófagos debido a su capacidad de inhibir la vía NF-κβ y suprimir la expresión de TLR en dichas células (Figura 20).

La 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es un mediador de la respuesta innata frente a *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos por la inducción de péptidos antimicrobianos como la catelicidina (Liu et al. 2006). Como respuesta a la activación del TLR2/4 por parte de *M. Tuberculosis* se induce la vía de AP-1/NF-κβ en macrófagos, que a su



vez induce la expresión de los genes *CYP27B1* y *VDR*, y provoca un incremento en la síntesis de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Entre los genes dependientes de vitamina D, el gen de la catelicidina, es inducido a través de la interacción con el *enhancer* VDRE situado en su promotor (Giovannini et al. 2001).

En macrófagos no existe control de retroalimentación negativa para la producción inducida de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , que sí se da en otros tipos celulares mediante la enzima catabólica CYP24A1. Aunque se produce una inducción de la expresión de la enzima CYP24A1, se genera, además del producto génico normal, la variante de *splicing* CYP24A1-SV, que interfiere con la enzima normal atenuando su actividad enzimática y reduciendo el catabolismo de la vitamina D.

La inducción de la producción de AMP en macrófagos mediada por la vitamina D/VDR va de la mano con la activación de la vía del factor de transcripción NF- $\kappa$ B mediada por TLR en células presentadoras de antígenos que resulta en la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, así como la inducción de moléculas co-estimuladoras que son esenciales para la activación de linfocitos T (Figura 20). De todo ello se deduce que la activación de la vía de señalización mediada por TLR es un elemento crítico tanto para la inducción de la respuesta innata como para la instrucción de la respuesta adaptativa contra patógenos (Akira et al. 2001). Sin embargo, una excesiva liberación de mediadores proinflamatorios puede ser potencialmente perjudicial para el individuo, tal como se manifiesta clínicamente en los casos de sepsis o de enfermedades autoinmunes (Sadeghi et al. 2006). Se ha propuesto que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  producida por macrófagos estimulados por TLR o de producción endógena por células presentadoras de antígenos, protege de la señalización exacerbada por TLR gracias a la inhibición de la síntesis de citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$ ), de moléculas presentadoras de antígeno y co-estimuladoras como CD40 y CD80/86, y lo más importante, la inhibición de los TLR en macrófagos y células presentadoras de antígenos (Sadeghi et al. 2006).

### **5.2.3.- Acción de la vitamina D en la polarización de los linfocitos T**

La contribución de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR en la modulación de la respuesta inmune queda enfatizada por su papel en la polarización de los linfocitos T. A pesar de que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  puede actuar directamente en la función de los linfocitos T, los principales efectos inmunomoduladores en la diferenciación de linfocitos T se dan indirectamente a través de su acción en las células presentadoras de antígenos.

La hipótesis del balance en las respuestas Th1/Th2 ha sido considerada como un paradigma de la coordinación de la respuesta inmune donde un desajuste en el

balance hacia Th1 predispone a enfermedades autoinmunes y un predominio de la respuesta Th2 se ha relacionado con alergias (Kidd 2003). La acción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$  en células presentadoras de antígenos se caracteriza por la inhibición de la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, la disminución en la producción de IL-12 y el aumento en la producción de IL-10. Esto da lugar a una disminución de la activación de linfocitos T y crea un ambiente que favorece la diferenciación a Th2 y, sobre todo, a Treg (Gauzzi et al. 2005; Gregori et al. 2002; Lemire et al. 1995; Muthian et al. 2006). La inhibición de la respuesta Th1 y la promoción de la diferenciación Th2 y Treg se ha relacionado con la protección contra enfermedades autoinmunes mediada por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Lemire et al. 1995). Además, el estado tolerogénico promovido por la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  justifica su uso terapéutico para prevenir el rechazo en injertos (Adorini et al. 2004).

#### **5.2.4.- Efecto de la vitamina D en la inmunidad contra los patógenos intracelulares mediada por Th1**

En el contexto de la infección por patógenos intracelulares, el equilibrio entre los efectos positivos de la vía  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$  mediante la inducción de la respuesta anti-microbiana, el efecto perjudicial de la inhibición Th1 y la inducción de un estado tolerogénico tiene que ser considerado para cada enfermedad. Los efectos supresores de la vía  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$  sobre las funciones de los macrófagos resultan ser perjudiciales en ciertos modelos de infección como en la infección por parásitos intracelulares como *Leishmania major*. En este tipo de infección, la defensa del huésped se centra alrededor de macrófagos activados que actúan como células efectoras de IFN- $\gamma$ . Teniendo en cuenta el efecto supresor de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$  en la producción de IFN- $\gamma$  mediada por Th1 se puede esperar un papel adverso de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en estas infecciones.

El desbalance Th1>Th2 constituye una estrategia inmune de evasión viral (Majumder et al. 2005), que se ve favorecida por infecciones oportunistas (Romagnani et al. 1994) o deriva de un proceso de selección de los linfocitos Th más permisivos (Galli et al. 2001). La principal consecuencia es que este desequilibrio Th1/Th2 podría impedir montar respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas del VIH -1 capaces de controlar la infección vírica. De acuerdo con esto, el desequilibrio Th1> Th2 mediado por la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  podría tener efectos perjudiciales tanto en el VIH-1 como en la progresión de la enfermedad a sida.

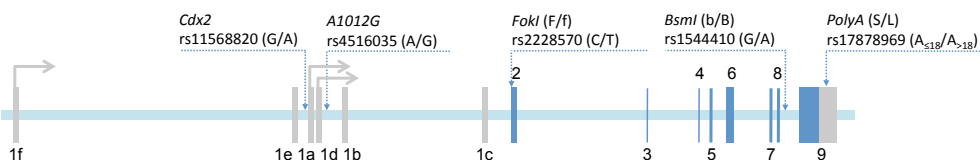
## 5.3.- Genes de la ruta de la vitamina D

Los genes que codifican para enzimas metabólicas de la vitamina D y los mediadores de vías de señalización a partir de vitamina D constituyen una red génica compleja. En la presente tesis se evalúan 3 genes clave de dicha red : el receptor nuclear *VDR*, la enzima limitante del proceso de síntesis *CYP27B1* y la proteína transportadora *GC*.

### 5.3.1.- Gen *VDR*

El receptor de vitamina D o VDR (del inglés, *vitamin D receptor*) es el encargado de mediar la acción de la hormona a nivel genómico, y actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando que modula la expresión de genes de respuesta a vitamina D (Pike 1991).

El gen está localizado en la región 12q13.11 del cromosoma 12, se extiende 63,5Kb y consta de 14 exones, 8 de los cuales son codificantes (del 2 al 9) (Figura 21). El gen *VDR* se expresa en la mayoría de los tipos de células del sistema inmune (Provvedini et al. 1983; Veldman et al. 2000), en particular en las células presentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas (Brennan et al. 1987), y células de Langerhans (Dam et al. 1996; Milde et al. 1991), así como en linfocitos T CD4+ y CD8+ (Veldman et al. 2000). Se ha detectado la expresión basal de *VDR* en macrófagos y células dendríticas, mientras que su expresión es inducida por estímulo inmune en los linfocitos B y T.



**Figura 21.** Estructura del gen *VDR* y localización de los 5 polimorfismos seleccionados.

Se han descrito diversos polimorfismos con efectos funcionales en el gen *VDR*, en la región del promotor o región reguladora de 5', en la región codificante y en la región no traducida de 3'UTR (del inglés, *UnTranslated Region*) (Uitterlinden et al. 2004b). A continuación se detallan 5 de los polimorfismos comunes descritos en este gen (Figura 21). En la región 5' se han localizado dos polimorfismos comunes tipo SNP (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*), *Cdx2* (rs11568820) y *A1012G* (rs4516035), que afectan a la unión de factores de transcripción. El polimorfismo *Cdx2* es una transición de A a G localizada entre los exones 1f y 1e que altera el lugar de reconocimiento y la afinidad para el factor de transcripción intestinal CDX-2. Dicho factor de transcripción está relacionado con la absorción de calcio intestinal (Yamamoto et al. 1999) y juega

un papel importante en el desarrollo y diferenciación del intestino (Freund et al. 1998). El alelo *Cdx2-A* confiere una mayor afinidad por la unión de CDX-2 dando lugar a una mayor capacidad transactivadora y por tanto mayores niveles de expresión del *VDR* en las células intestinales (Arai et al. 2001a). El segundo polimorfismo de la región 5' es el *A1012G*, una transición de A por G localizada entre los exones 1e y 1a que introduce una secuencia de reconocimiento para los factores de transcripción GATA-3 (Halsall et al. 2004). Dichos factores de transcripción se encuentran implicados en la regulación de la polarización de los linfocitos T hacia una respuesta Th2 (Rengarajan et al. 2000) y su expresión puede ser inducida por la vitamina D (Boonstra et al. 2001). Se ha descrito que el elemento de respuesta a GATA-3 presente en el alelo A del promotor del *VDR* genera un aumento en la polarización a Th2 inducida por GATA-3.

En la región codificante del gen *VDR* hay que destacar el polimorfismo tipo SNP *FokI* (rs2228570) que consiste en un cambio de T a C alterando el codón de inicio de la traducción de ATG a ACG, que determina un inicio de traducción en el siguiente ATG, y da lugar a una proteína tres aminoácidos más corta (424 aminoácidos frente a 427 aminoácidos) (Gross et al. 1996). Las diferencias funcionales entre los alelos de *FokI* muestran que la proteína codificada por el alelo *FokI-C* (proteína corta, 424 aminoácidos) interactúa de manera más eficiente con el factor transcripcional TFIIB y determina una mayor y más sostenida actividad transcripcional de los genes regulados por *VDR* que la proteína codificada por el alelo *FokI-T* (Jurutka et al. 2000).

En el extremo 3'UTR del gen *VDR* existe una gran variabilidad genética debido al elevado número de polimorfismos localizados en dicha región. Entre estos polimorfismos cabe destacar, los polimorfismos *BsmI* (rs1544410) y *PolyA* (rs17878969) (Ingles et al. 1997b; Morrison et al. 1994). El polimorfismo *BsmI* es un SNP que determina un cambio de A por G. En la misma región, y con un fuerte desequilibrio de ligamiento, se localiza el polimorfismo *PolyA*. Dicho polimorfismo es un microsatélite o STR (del inglés, *Short Tandem Repeat*) que consiste en una repetición de entre 15 y 18 As, que da lugar al alelo S (del inglés, *small*), o a una repetición de más de 20 As, que genera el alelo L (de *large*). Se conoce una proteína de unión a secuencias polyA de 3'UTR o PABP (del inglés, *poly A binding protein*) con especial afinidad a las formas largas del polyA. Dicha proteína facilita la translocación del ARNm en mamíferos mediante su interacción con otras proteínas (Mangus et al. 2003). Se cree que la unión al ADN de esta proteína requiere la presencia de un mínimo de 11 adeninas y que su máxima afinidad se da con 25 As. Según esto, el alelo L del *PolyA* presentaría una mayor afinidad por la PABP lo que conferiría una mayor capacidad de translocación al ARNm (Whitfield et al. 2001).

Los estudios de la estructura de la región genómica del *VDR* en caucásicos, llevados a cabo por Fang et al. 2005 y otros autores (Ingles et al. 1997a; Morrison et al. 1994; Morrison et al. 1992; Nejentsev et al. 2004), permitieron identificar un patrón fragmentado de siete bloques de ligamiento distribuidos a lo largo del gen *VDR*. Los polimorfismos *Cdx2* y *A1012G* se incluyen en un único bloque de ligamiento localizado en la región promotora mientras que los polimorfismos *BsmI* y *PolyA* se sitúan en otro bloque de ligamiento localizado en el extremo 3'UTR. Sin embargo, el polimorfismo *FokI* se localiza en la región central del gen donde se ha descrito un *hotspot* de recombinación. Variaciones de la región 3'UTR se han asociado con alteraciones de la estabilidad del ARNm del *VDR* y con el nivel de expresión del gen (Fang et al. 2005). Así, el haplotipo formado por el alelo A del polimorfismo *BsmI* y el alelo S del polimorfismo *PolyA* se ha asociado con mayores niveles de expresión del gen en un ensayo de luciferasa (Morrison et al. 1994) y con una mayor estabilidad del mensajero (Fang et al. 2005).

Varios estudios revelan que los polimorfismos en el *locus VDR* se asocian con enfermedades que limitan la esperanza de vida como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos del metabolismo mineral y del sistema inmune (Uitterlinden et al. 2004a).

### 5.3.2.- Gen *CYP27B1*

El gen *CYP27B1* codifica para un miembro de la superfamilia de enzimas citocromo P450. Estas enzimas son monooxigenasas que catalizan distintas reacciones implicadas en el metabolismo de fármacos y síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos. El gen se localiza en la región 12q13.1-q13.3 del cromosoma 12, se extiende 4,9 Kb y contiene 9 exones. La enzima CYP27B1 (citocromo P450 25-hidroxivitamina-D<sub>3</sub> 1- $\alpha$ -hidroxilasa) se localiza en la membrana interna mitocondrial donde se encarga del paso limitante de la biosíntesis de la vitamina D, consistente en la hidroxilación de la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> en la posición 1 $\alpha$  para producir 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> conocida como 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o calcitriol, que es la forma activa de la vitamina D.

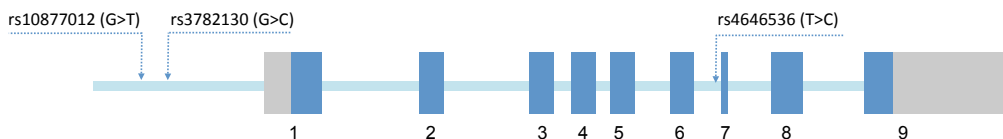


Figura 22. Estructura del gen *CYP27B1* y localización de los 3 polimorfismos seleccionados.

La región donde se localiza el gen *CYP27B1* es una región de alta densidad génica y se caracteriza por la existencia de un fuerte desequilibrio de ligamiento. Se han descrito distintos polimorfismos entre los cuales cabe destacar 3 SNPs:

rs10877012 (cambio de G por T) y rs3782130 (cambio de G por C) localizados en la región 5' y rs4646536 (cambio de T por C) localizado en el intrón 6 (Figura 22).

Variantes del gen *CYP27B1* se encuentran asociadas a riesgo de aparición de enfermedades autoinmunes. La variante C del polimorfismo rs10877012 se asocia con susceptibilidad a enfermedades endocrinas autoinmunes, como la enfermedad de Addison, la tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves y diabetes mellitus tipo 1 (Lopez et al. 2004). Además, dicho polimorfismo se ha asociado con la incapacidad para mantener una respuesta virológica sostenida en la infección por el virus de la hepatitis C o VHC (Lange et al. 2011). Otros estudios indican que el alelo C del polimorfismo rs4646536 está asociado con insuficiencia cardíaca congestiva en pacientes con hipertensión (Wilke et al. 2009) y con diabetes tipo 1 en europeos (Bailey et al. 2007).

### 5.3.3.- Gen *GC*

El gen *GC* (del inglés, *Group-specific Component*) también conocido como *DBP* (del inglés *vitamin-D Binding Protein*) se localiza en la región 4q12-q13 del cromosoma 4. Dicho gen se extiende 63,8 Kb y contiene 14 exones. La proteína codificada pertenece a la familia de la albúmina. Se trata de una proteína multifuncional que se encuentra en plasma, fluido ascítico, fluido cerebroespinal y en la superficie de muchos tipos celulares. La proteína *GC* se une a vitamina D y a sus metabolitos en plasma y los transporta a los tejidos y células diana. Se ha descrito que los niveles circulantes de *GC* y la afinidad de unión por metabolitos de la vitamina D, determinados por su genotipo, no sólo puede determinar la biodisponibilidad de 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> a las células diana sino también puede influir en el nivel global de vitamina D en circulación (Hewison 2012).



**Figura 23.** Estructura del gen *GC* y localización de los 2 polimorfismos seleccionados.

Este gen contiene numerosos polimorfismos entre los que cabe destacar los SNPs no sinónimos rs7041 (*Glu416Asp*) y rs4588 (*Thr420Lys*) (Figura 23). La variante *Glu416Asp* es un cambio T por G, mientras que el *Thr420Lys* deriva de un cambio C por A. Ambas variantes se encuentran muy próximas y presentan un desequilibrio de ligamiento completo.

Estos dos polimorfismos definen tres haplotipos denominados F (*Glu416Asp-T\_Thr420Lys-C*), S (*Glu416Asp-G\_Thr420Lys-C*) y 2 (*Glu416Asp-T\_Thr420Lys-A*) (Figura 24).

	416	417	418	419	420	haplotipo
3' -	CTA	CGG	TGT	GGG	TTC	
5' -	<b>GAT</b>	GCC	ACA	CCC	<b>AAG</b>	<b>2</b>
-	<b>Asp</b>	Ala	Thr	Pro	<b>Lys</b>	
3' -	CTA	CGG	TGT	GGG	TGC	
5' -	<b>GAT</b>	GCC	ACA	CCC	<b>ACG</b>	<b>F</b>
-	<b>Asp</b>	Ala	Thr	Pro	<b>Thr</b>	
3' -	CTC	CGG	TGT	GGG	TGC	
5' -	<b>GAG</b>	GCC	ACA	CCC	<b>ACG</b>	<b>S</b>
-	<b>Glu</b>	Ala	Thr	Pro	<b>Thr</b>	
	<b>GAT/GAG</b>				<b>AAG/ACG</b>	
	<b>Asp/Glu</b>				<b>Lys/Thr</b>	

**Figura 24.** Haplotipos definidos por los polimorfismos rs7041 (*Glu416Asp*) y rs4588 (*Thr420Lys*) del locus *GC*.

Se ha descrito que el haplotipo F confiere mayores niveles de proteína GC en suero con una alta afinidad por las distintas formas de la vitamina D, mientras que el haplotipo S es el que confiere los menores niveles de proteína GC en suero con una menor afinidad por las distintas formas de la vitamina D. Se ha descrito que altos niveles de proteína GC promueven la síntesis renal de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, lo que facilita la reabsorción glomerular de 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> para su posterior metabolismo en el riñón por la CYP27B1.

La deglicosilación selectiva de la proteína GC da lugar al Factor Activador de Macrófagos (Gc-MAF) con propiedades anti-tumorales y anti-víricas. Algunos autores han propuesto el uso de Gc-MAF en la inmunoterapia del VIH (Yamamoto et al. 2009).

Se ha descrito asociación de variantes de la proteína GC con la infección por VIH (Eales et al. 1987), aunque estos resultados no han sido confirmados en estudios posteriores (Cleve et al. 1988; Alonso et al. 1990). Recientemente se ha descrito asociación del genotipo 2/2 con susceptibilidad a tuberculosis en población hindú (Martineau et al. 2010). Dicha asociación se observa en los pacientes con bajos niveles en suero de 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (<20 nM) mientras que no es significativa en los pacientes con niveles ≥20 nM. Asimismo, se ha descrito en población asiática que los polimorfismos *Glu416Asp* y *Thr420Lys* están asociados con susceptibilidad a asma (Li et al. 2011), riesgo de desarrollar cánceres gastrointestinales, sobre todo cáncer de colon (Zhou et al. 2012) y riesgo de fractura antes de la menopausia (Lauridsen et al. 2004).

## 6.- QUIMIOCINA RANTES Y RECEPTOR CCR5

RANTES (del inglés, *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) es una proteína de aproximadamente 8 kDa clasificada dentro de la familia de las citocinas quimiotácticas o quimiocinas CC. Las quimiocinas CC se caracterizan por presentar dos cisteínas adyacentes, en su extremo amino terminal. Se conocen al menos 27 miembros distintos dentro de este subgrupo en mamíferos. Se denominan con las siglas CCL (del inglés, *chemokine C-C Ligand*) seguido de un número que en el caso de RANTES se corresponde con la denominación CCL5. Su acción esta mediada por la interacción con receptores de quimiocinas específicos entre los que se encuentran CCR1 (Proudfoot 2000; Struyf et al. 2001), CCR3 (Daugherty 1996; Struyf et al. 2001) y CCR5 (Proudfoot 2000; Slimani et al. 2003; Struyf et al. 2001). RANTES es capaz de inducir la migración de células que expresan el receptor CCR5 en su superficie como los linfocitos T, eosinófilos, basófilos, células NK y células dendríticas y desempeña un papel activo en el reclutamiento de leucocitos hacia los lugares de inflamación. Con la ayuda de ciertas citocinas como IL-2 y IFN- $\gamma$  liberadas por los linfocitos T, RANTES también induce la proliferación y la activación de células NK para formar células CHAK (células asesinas activadas por CC-Quimiocinas) (Maghazachi et al. 1996).

CCR5 (del inglés, *chemokine C-C receptor 5*) es una proteína de 352 aminoácidos con un peso de 40,6 kDa que pertenece a la superfamilia de receptores transmembrana acoplados a la proteína G. Este tipo de receptores se caracteriza por presentar 7 dominios transmembrana. CCR5 está implicado en la migración de monocitos, células NK y linfocitos Th1 hacia focos de concentración creciente de quimiocinas CC, y media en el reclutamiento de leucocitos hacia el foco de infección. Además, CCR5 actúa como co-receptor de las cepas virales R5 del VIH-1 mediando la entrada del virus a la célula huésped. Los ligandos naturales de CCR5 son CCL3, CCL4 (también conocidas como *macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$*  y *1 $\beta$* , respectivamente) y CCL5 (RANTES).

### 6.1.- Gen RANTES

El gen *RANTES* está localizado en la región 17q11.2-q12 del cromosoma 17 (Donlon et al. 1990), se extiende 8,9Kb y contiene 3 exones. Se han descrito dos polimorfismos del tipo SNP rs2107538 (-403G/A) y rs2280789 (*Int1.1T/C*) con efectos funcionales (Figura 25). El primero es un cambio G por A, se localiza en el promotor y su alelo -403-A incrementa la actividad transcripcional, lo que da



lugar a altos niveles de RANTES en suero que promueven un estado proinflamatorio (Zhernakova et al. 2006). El segundo es un cambio T por C, se localiza en el intrón 1 y su alelo *Int1.1-C* se ha asociado con una baja expresión de RANTES, lo que promueve un estado anti-inflamatorio (An et al. 2002).

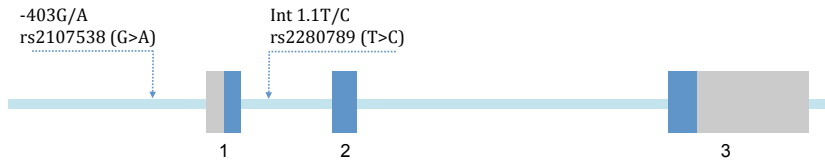


Figura 25. Estructura del gen *RANTES* y localización de los 2 polimorfismos seleccionados.

## 6.2.- Gen *CCR5*

El gen *CCR5* se localiza en la región 3p21.31 del cromosoma 3. Este gen se extiende 6 Kb y contiene 3 exones. Se ha descrito el polimorfismo rs333 (*CCR5* $\Delta$ 32) del tipo inserción/delección de 32 pares de bases (pb) localizado en el exón 3 que genera una proteína no funcional que no se exporta a membrana (Liu et al. 1996), lo que impide su acción como mediador proinflamatorio (Samson et al. 1996). No se ha descrito ninguna alteración fisiológica en individuos homocigotos para la delección y que, por tanto, no presentan el receptor *CCR5* funcional. El alelo delección (*CCR5* $\Delta$ 32) alcanza frecuencias apreciables sólo en Europa, y sigue una distribución de clina latitudinal con frecuencias altas en el norte y bajas en el sur.

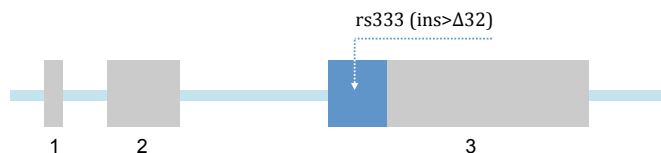
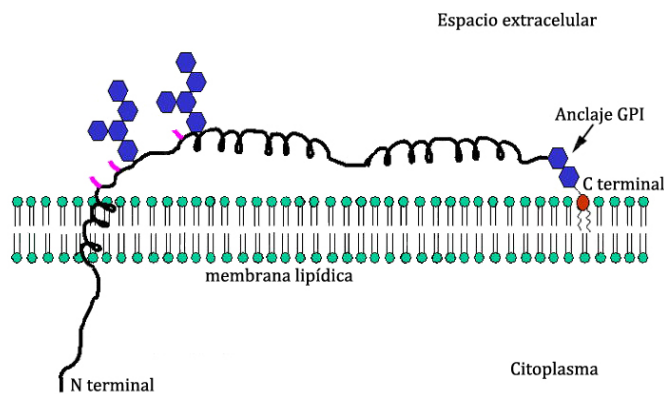


Figura 26. Estructura del gen *CCR5* y localización del polimorfismo rs333.

Diversos estudios han demostrado que el alelo *CCR5* $\Delta$ 32 se asocia con la reducción de la inflamación portal durante la infección por VHC, un retraso en la progresión de la esclerosis múltiple, con la protección contra las enfermedades cardiovasculares (infarto agudo de miocardio y enfermedad coronaria grave) y con la atenuación de la respuesta inflamatoria que retrasa la progresión de las lesiones ateroscleróticas (Potteaux et al. 2006). Además, dado el papel de *CCR5* como co-receptor del VIH-1, se ha descrito que los individuos homocigotos  $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32, son resistentes a la infección por cepas R5 del virus. La Figura 26 muestra la estructura del gen y la localización del polimorfismo rs333.

## 7.- EL FACTOR DE RESTRICCIÓN BST-2

El antígeno de células del estroma de la médula ósea 2 o BST-2 (del inglés, *Bone-marrow STromal antigen 2*), también conocido como Tetherin, HM1.24, y CD317, es una proteína transmembrana dimérica tipo II heterogéneamente glicosilada de entre 30 y 36 kDa y compuesta por 180 aminoácidos (Ohtomo et al. 1999). BST-2 ha sido recientemente identificado como un nuevo componente de la respuesta inmune innata contra virus, que actúa como un factor de restricción frente a virus con envuelta como son el virus del Ébola, virus de la leucemia murina, los virus de las inmunodeficiencias felina y de simios, virus asociado al sarcoma de Kaposi, virus del tumor mamario de ratón, virus Lassa o Marbug, siendo el caso más estudiado el del VIH-1 (Goffinet et al. 2010; Kaletsky et al. 2009; Lisa A Lopez 2010; Neil et al. 2008; Nolwenn Jouvenet 2009; Van Damme et al. 2008). La restricción mediada por BST-2 consiste en la inhibición de la liberación de partículas virales de las células infectadas reteniendo las partículas maduras ancladas tanto en la superficie celular como a otras partículas virales. Asimismo, se ha sugerido que BST-2 puede anular la infectividad de las partículas virales liberadas (Zhang 2010).

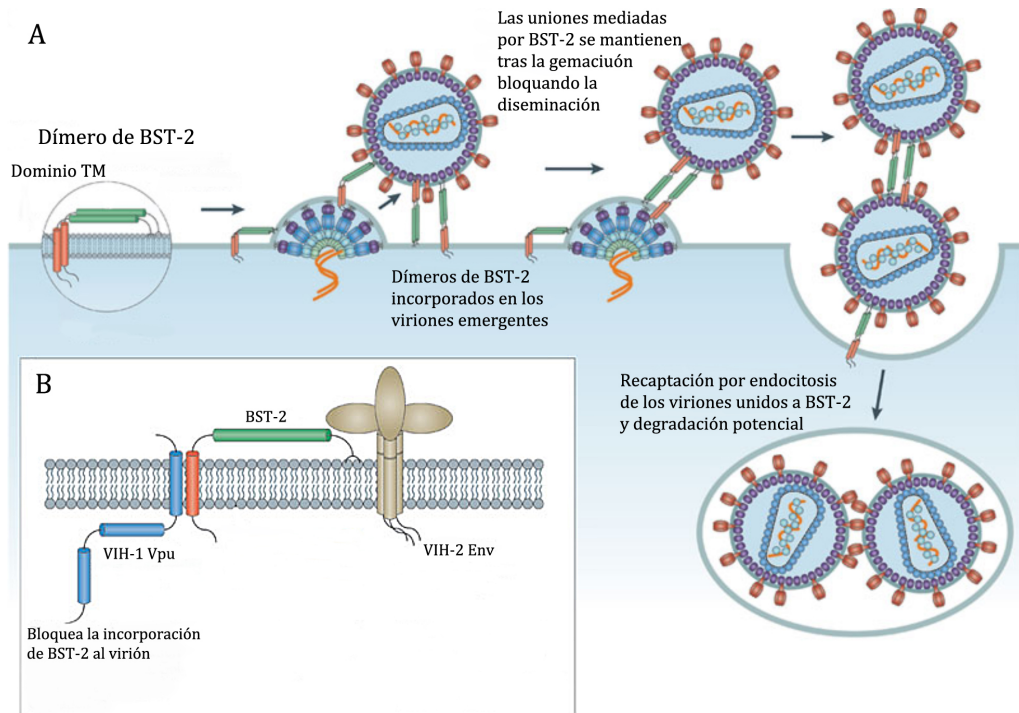


**Figura 27.** Estructura de la proteína BST-2. Imagen adaptada de Evans et al. 2010.

### 7.1.- Estructura de la proteína BST-2

La estructura de la proteína se ilustra en la Figura 27. El dominio extracelular constituye una bobina enrollada (coiled-coil) extendida en paralelo y anclada en ambos extremos en la membrana plasmática de la célula (Hinz et al. 2010; Schubert et al. 2010; Yang et al. 2010). El extremo N-terminal se encuentra unido por un dominio peptídico transmembrana, y el C-terminal por un grupo glicosil fosfatidilinositol (GPI) (Evans et al. 2010). Tres residuos de cisteína

extracelulares median la formación de enlaces disulfuro y permiten la dimerización de BST-2 (Evans et al. 2010). La corta cola citoplasmática N-terminal promueve el reciclaje endocítico de la proteína a través de su interacción mediada por los adaptadores de clatrina AP-1 y AP-2 (Rollason et al. 2007). En células epiteliales polarizadas la cola N-terminal une BST-2 a los filamentos de actina corticales subapicales a través de la interacción con RICH2, una proteína miembro de la familia de las GTPasas de activación de BAR-RAC (también conocido como ARHGAP44) (Rollason et al. 2009).



**Figura 28.** Mecanismo de acción de BST-2. A) Restricción de la liberación de las partículas virales por BST-2. B) Proteínas del VIH antagonistas de BST-2. Imagen adaptada de Martin-Serrano and Neil 2011.

## 7.2.- Mecanismo de acción de BST-2

En la Figura 28A, se representa el mecanismo de acción de BST-2. BST-2 ejerce su acción incorporándose a la partícula naciente del virus (Fitzpatrick et al. 2010; Habermann et al. 2010; Hammonds et al. 2010; Perez-Caballero et al. 2009). Existen evidencias bioquímicas y estructurales que indican que los dímeros de BST-2 se sitúan en paralelo y que enlazan el virión tanto con la membrana celular como con las membranas de otros viriones (Hinz et al. 2010; Perez-Caballero et al. 2009; Schubert et al. 2010; Yang et al. 2010). Ello conduce a la retención de viriones maduros en 'capas' en la membrana plasmática y la subsiguiente

captación endocítica de estos viriones. La dimerización de BST-2, el anclaje mediante GPI y la región de bobina en espiral son esenciales para la actividad restrictiva de BST-2 (Andrew et al. 2009; Neil et al. 2008; Perez-Caballero et al. 2009).

El papel clave que BST-2 juega en la infección por VIH-1 se pone de manifiesto por el hecho de que el VIH-1 ha co-evolucionado desarrollando contramedidas específicas para contrarrestar y neutralizar dicho factor. Así, la proteína Vpu (del inglés, *Viral Protein U*) contrarresta la acción de BST-2 secuestrándolo de la superficie celular mediante su internalización y promoción de su degradación (Figura 28B). La acción antagónica de Vpu conlleva un aumento en la liberación de partículas virales con lo que contrarresta el efecto restrictivo de BST-2 (Vandamme et al. 2008; Douglas et al. 2009; Hauser et al. 2010; Neilet al. 2006).

### 7.3.- El gen *BST-2*

El gen *BST-2*, está localizado en la región 19p13.1 del cromosoma 19, se extiende 2,71 Kb y contiene 5 exones (Figura 29). *BST-2* se expresa constitutivamente en linfocitos B, páncreas, hígado, pulmones y corazón (Erikson 2011; Ishikawa 1995), mientras que existe una controversia acerca de su expresión en linfocitos T, monocitos, macrófagos y células dendríticas plasmocitoides. Además se ha descrito que su expresión puede ser inducida por interferón en otros tipos celulares (Homann 2011; Erikson 2011).

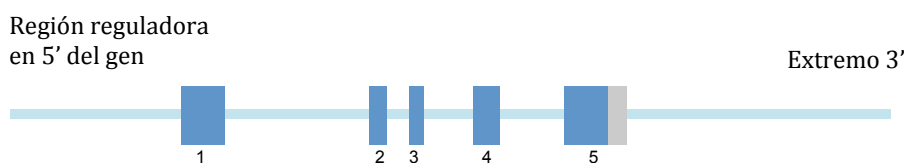


Figura 29. Estructura del gen *BST-2*.

La región promotora de *BST-2* contiene elementos reguladores en *cis*, incluyendo una repetición en tándem de tres elementos de respuesta a IL-6 tipo II/sitios APRF, elementos de respuesta a interferón IRF-1/2, ISGF3 y GAS; varios elementos de respuesta a IL-6 tipo I/sitios NF-IL-6, y sitios de unión a STAT3, AP-2 y Sp1 (Ohtomo et al. 1999) (Figura 30).

```

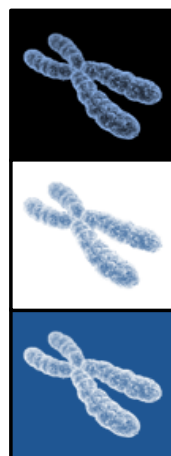
-17517071 AAGTAGGAGCTTGTTCCTGCAGGTGCCAAGACAGAGACCGACATGTTTGTGGCTGGTCCGGTCTCCCAGTTTCAGCTGGTCCAGTCTCACCTGTT
-17516971 GCTCACACACCCCTCCATGTCTCCATAGTCCCTCGGTGGGGACAGAGGCACTGGATGAAGCCCTGCTCGTACCACAGAGACACCTGAACACAAAAACC
CREB
-17516871 AGTCCCTGGGGTCAGACCAGGCCCGCCCGCCAGCCAGGCCCTGCCCTCACTCCACCAGCAACTGTGCAACCTCAGTTTCCCCAGGTGGAGACGGGA
AP-2 AP-2 AP-2
-17516771 CCAACAGTGATGGCCCTCGCCCTTCAGGTCAATAGTACAGATGAATACAGGCTGGCACGGCCTAGGCACTCAGTAACACACAGCAGAGGCACAGGGACTT
-17516671 AAGATGGAGTGTCCCAGGCAGCCACAGTTGGCTGGCACCAGCTGGGAAGGGCCCAAGGGCTTTTAAAGCAGGGTGAAAAAAGCCACCTCCTTTCTG
AP-2
-17516571 GGAAACTGAAACTGAAACCTAATTAATCCTCTGCCTGTAGGTGCCTCATGCAAGAGCTGCTGGTCAGAGCACTTCTTGGAACTTGCTATTTGGTCAGGAC
ISGF3 IRF1/2 STAT3
STAT3 STAT3 STAT3
-17516471 GTTTCCTATGCTAATAAAGGGGTGGCCCGTAGAAGATTCAGCACCCCTCCCTAACTCCAGGCCAGACTCTAAAGGGGAGATCTGGATGGCATCTACTTC
TATABOX AP-2 +1 M A S T S
-17516371 GTATGACTATTGCAGAGTGCCATGGAAGACGGGGATAAGCGCTGTAAGCTTCTGCTGGGGATAGGAATTCGGTGTCTCCTGATCATCGTGATTCGGGG
Y D Y C R V P M E D G D K R C K L L L G I G I L V L L I I V I L G
-17516271 GTGCCCTTGATTAICTCACCATCAAGGCCAACAGCGAGGCCTGCCGGGACGGCCTTCGGGCAGTGATGGAGTGTGCGAATGTCACCATCTCTGCAAC
V P L I I F T I K A N S E A C R D G L R A V M E C R N V T H L L Q
-17516171 AAGAGCTGACCGAGGCCAGAAAGGCTTTCAGGATGTGGAGGCCAGGCCCACTGCAACCACACTGTGGTAAGTCTCTCACTCCTTTGGATGGCCT
Q E L T E A Q K G F Q D V E A Q A A T C N H T V
-17516071 AGTACTAGCGGTGGGAGGACAAGAATCTCTCCCGAAATCTGACCCAGGGTGGTCTCCAGGGAGATGCAGGGGAGTCTGAAACTGCTCCTGGCC

```

**Figura 30.** Región promotora del gen *BST-2*. Se han representado los sitios de unión de factores de transcripción (descrito por Ohtomo et al. 1999).

El gen *BST-2* se encuentra en una región genómica con alto desequilibrio de ligamiento. Variantes polimórficas de este gen se han descrito en la base de datos dbSNP. En la bibliografía no existe asociación de polimorfismos del gen *BST-2* con patologías humanas.

# OBJETIVOS





El curso del envejecimiento natural y de la infección por VIH-1 se encuentran influenciados por la variabilidad que afecta tanto a genes relacionados con factores ambientales como a genes implicados en la respuesta inmune.

Dada la reciente descripción del factor de restricción BST-2 como inhibidor de la liberación de partículas virales de las células infectadas por VIH-1, proponemos un posible papel de la variabilidad genética de dicho factor en la susceptibilidad a la infección por VIH-1 y el ritmo de progresión a sida. Por otro lado, se ha descrito el papel de la vitamina D en la regulación de la respuesta inmune y en la infección por VIH-1. Por ello, proponemos que la variabilidad de genes implicados en la ruta fisiológica de la vitamina D pueda tener un papel significativo en el ritmo de progresión de la infección.

El proceso de envejecimiento se ha asociado con un estado inflamatorio crónico que resulta perjudicial para el individuo. Diversos estudios de asociación genética sobre envejecimiento y longevidad se centran en la caracterización de genes de respuesta inmune e inflamación. En esta tesis se propone evaluar el papel de variantes del gen del receptor nuclear de la vitamina D o *VDR*, así como de variantes de los genes *RANTES* y *CCR5*, mediadores de la respuesta inflamatoria, en el proceso de envejecimiento.

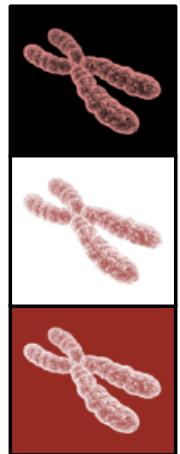
Por tanto los objetivos de esta tesis son:

1. Caracterizar variantes polimórficas del gen que codifica para el factor de restricción BST-2.
  - 1.1. Evaluar la asociación de dichas variantes con la susceptibilidad y progresión de la infección por VIH-1.
  - 1.2. Evaluar posibles efectos funcionales de las variantes identificadas.
2. Evaluar el papel de variantes de genes de la ruta de la vitamina D: *VDR*, *GC* y *CYP27B1*, en la progresión de la infección por VIH-1.
3. Evaluar el papel de las variantes polimórficas del gen *VDR* en el proceso de envejecimiento natural.
4. Evaluar el papel de variantes polimórficas de los genes de la quimiocina *RANTES* y de su receptor *CCR5* en el proceso de envejecimiento natural.





# MATERIAL Y MÉTODOS





# **1.- DESCRIPCIÓN DE LAS COHORTES**

En esta tesis se han utilizado distintas cohortes en función de las características requeridas para cada estudio. Dichas cohortes se describen a continuación. Todos los individuos reclutados en las distintas cohortes dieron su consentimiento informado para la participación en el estudio y el manejo de sus datos clínico-epidemiológicos. Una vez terminado el proceso de reclutamiento, las cohortes se cerraron y anonimizaron siguiendo la normativa establecida en el artículo 3 de la Ley 14/2007 del 3 de julio de Investigación Biomédica. Los comités éticos de las instituciones participantes aprobaron los estudios.

## **1.1.- Cohorte de controles sanos**

La cohorte de individuos control está compuesta por 224 individuos sanos (124 hombres y 100 mujeres) de origen caucásico reclutados entre enero y diciembre de 1999 en la región sanitaria de Lleida, entre donantes de sangre anónimos que dieron negativo para las pruebas de infección del VIH-1 y del VHC. En el momento de reclutamiento, la edad media de los individuos era de 36 años (rango de edad entre 17 y 61 años). A partir de dicha cohorte se han constituido las cohortes de referencia para cada uno de los estudios realizados. En cada caso, los sujetos se han seleccionado del total de la cohorte mediante métodos de aleatorización con el fin de emparejar casos y controles atendiendo a parámetros como edad, sexo y número de individuos.

Para los estudios de longevidad se han seleccionado 110 sujetos control emparejados por sexo con la cohorte de individuos longevos. La subcohorte control está formada por 75 mujeres con una edad media de 28 años (rango de edad entre 17 y 39 años) y 35 hombres con una edad media de 29 años (rango de edad entre 17 y 40 años).

Para los estudios de susceptibilidad a la infección por VIH-1 y progresión a sida se seleccionaron como controles 188 sujetos, 94 hombres con una edad media de 37,2 años (rango de edad entre 17 y 60 años) y 94 mujeres con una edad media de 31,8 años (rango de edad entre 17 y 59 años) emparejados por edad con las correspondientes cohortes de casos.

## **1.2.- Cohorte de individuos longevos**

La cohorte de individuos longevos está compuesta por 104 individuos de origen caucásico de más de 85 años, entre los cuales 72 son mujeres, con una edad media de 89,4 años (rango de edad entre 85 y 100 años) y 32 son hombres con

una edad media de 89,4 años (rango de edad entre 85 y 97 años). Los sujetos fueron reclutados entre junio y diciembre de 2004 en los Centros de Atención Primaria (25%) o en residencias de la tercera edad (75%) de la región sanitaria de Lleida. Se recogieron datos clínicos y epidemiológicos de cada individuo. Durante el proceso de reclutamiento los sujetos que presentaron enfermedades relacionadas con disfunciones del metabolismo de la vitamina D como la osteoporosis, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias y cáncer fueron excluidos del estudio. Las principales comorbilidades de los individuos seleccionados fueron: hipertensión (9,6%), accidente cerebrovascular (7,7%), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (4,8%) y enfermedades cardíacas (2,9%).

### 1.3.- Cohorte de individuos VIH+

La cohorte AIDS-Lleida es una cohorte prospectiva seroprevalente y anonimizada de pacientes infectados por VIH-1 que dieron el primer test positivo para VIH-1 entre 1982 y 1999. Todos los pacientes seropositivos atendidos en la Unidad de VIH/SIDA del *Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida* (Catalunya, España) fueron invitados a participar en el reclutamiento de la cohorte. La cohorte está compuesta por 461 sujetos, entre los cuales 444 (96,3%) son de origen caucásico y 17 (3,7%) son de origen subsahariano. La mayoría de los sujetos, 330 (71,6%), eran del grupo de riesgo de adictos a droga por vía parenteral (ADVP), 105 sujetos (22,8%) eran del grupo de riesgo heterosexual, y el resto de los sujetos pertenecían a otros grupos de riesgo con menor representación: 14 homosexuales (3%) y 12 receptores de sangre y hemoderivados (2,6%). Del total de 461 sujetos, 324 son hombres y 137 mujeres.

De la cohorte AIDS-Lleida se derivó una subcohorte de 185 pacientes de origen caucásico y pertenecientes al grupo de riesgo ADVP para ser utilizada en los estudios de progresión a sida (cohorte AVIP, ADVP, VIH+, Progresión) (Barber et al. 2001; Nieto et al. 2004).

Dada la historia natural de la infección por VIH-1, los pacientes reclutados pueden haberse infectado de unos meses a varios años antes de la detección de seropositividad. Por ello, la cohorte AVIP debe ser considerada como una cohorte seroprevalente con fecha de infección no conocida. Con el objetivo de acotar al máximo la fecha de infección se consideraron dos criterios de inclusión adicionales: edad en el momento de la detección de seropositividad y fecha de la detección de seropositividad. Así, del total de pacientes VIH+ de origen caucásico y del grupo de riesgo ADVP se seleccionaron aquellos que presentaron un test de seropositividad anterior al 31 de diciembre de 1990 (159 pacientes). Asimismo, se incorporaron al estudio 26 pacientes ADVP de origen caucásico con una edad

inferior a 20 años en la fecha de seropositividad. El seguimiento mínimo de los pacientes incluidos en la cohorte fue de 7 años excepto para un paciente con fecha de seropositividad anterior al 91 cuyo seguimiento fue de 48 meses y que desarrolló un evento de progresión durante el seguimiento. El seguimiento clínico de los pacientes se estableció desde el primer resultado positivo en la prueba del VIH-1 (seropositividad) hasta la última visita registrada o defunción anterior a la finalización del reclutamiento (diciembre de 1999). Los pacientes fueron considerados como perdidos cuando la fecha de la última visita registrada fue más de 6 meses anterior a la fecha final de reclutamiento.

Tabla 4. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes de la cohorte AVIP.

Características	Cohorte AVIP
Sujetos [n]	185
Hombres / Mujeres [n]	138/47
Edad en la fecha de detección seropositividad VIH (años) <sup>a</sup>	24 (21-28)
Tiempo de seguimiento (meses) <sup>a</sup>	127 (104-142)
Pacientes en tratamiento antirretroviral [n (%)]	154 (83)
2 análogos de base	18
2 análogos de base y un inhibidor de la proteasa	136
Pacientes VHC positivo [n (%)] <sup>b</sup>	170 (91,9)
<i>Exitus</i> [n (%)]	6 (3,2)
Enfermedades definitorias de sida [n (%)]	
Tuberculosis	29 (59,2)
<i>Pneumocystis carinii pneumonia</i>	11 (22,4)
Toxoplasmosis	5 (10,2)
Otras <sup>c</sup>	4 (8,2)
Pacientes agrupados en las categorías clínicas de CDC 1993 [n (%)]	
Categoría A	56 (30,3)
Categoría B	80 (43,2)
Categoría C	49 (26,5)
Pacientes agrupados por recuento de linfocitos CD4+ [n (%)]	
Estadio 1 ( $\geq 500$ células/ $\mu\text{L}$ )	21 (11,4)
Estadio 2 ( $200 \leq \text{CD4} < 500$ células/ $\mu\text{L}$ )	89 (48,1)
Estadio 3 ( $< 200$ células/ $\mu\text{L}$ )	75 (40,5)
Recuento inferior de linfocitos CD4+ (células/ $\mu\text{L}$ ) <sup>a</sup>	240 (102-351)
Carga viral superior (copias/ $\mu\text{L} \times 10^3$ ) <sup>a, d</sup>	20 (4-65)

<sup>a</sup> Los valores se muestran como el valor de la mediana y el rango intercuartil entre paréntesis.

<sup>b</sup> Datos disponibles sobre la infección por virus de la hepatitis C (VHC), n=175.

<sup>c</sup> Caquexia, encefalitis por VIH y neoplasia de cérvix

<sup>d</sup> Datos disponibles sobre los valores de carga viral superior, n=135.

De acuerdo con los criterios de inclusión se seleccionaron un total de 185 pacientes, 31 (17%) se mantuvieron libres de tratamiento durante todo el estudio, 18 (10%) siguieron un tratamiento con 2 análogos de base que se inició una media de 76,8 meses posterior a la infección y que se mantuvo durante una media de 52 meses. Finalmente, 136 (73%) pacientes siguieron un tratamiento con una combinación de 2 análogos de base y un inhibidor de la proteasa que se inició una media de 84,6 meses posterior a la infección y que se mantuvo durante una media de 43 meses. De cada paciente se obtuvo información sobre los eventos clínicos de VIH-1, el régimen de terapia antirretroviral y las mediciones de rutina de los niveles de CD4 y carga viral. Las características epidemiológicas y clínicas más relevantes de la cohorte AVIP se detallan en la Tabla 4.

#### 1.4.- Cohorte ENI (individuos Expuestos No Infectados)

La cohorte ENI (del inglés, *Exposed Non Infected*) está formada por 171 sujetos seronegativos para el VIH-1 que han estado en situación de riesgo de infección por su condición de ADVP. Los criterios de inclusión en la cohorte fueron: origen caucásico, pertenecer al grupo de riesgo ADVP, tener un test seronegativo para anticuerpos frente al VIH-1 en el momento de la inclusión y haber compartido agujas hipodérmicas durante un mínimo de 3 meses.

Tabla 5. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes de la cohorte ENI.

Características	Cohorte ENI
Sujetos [n (%)]	171
Hombres / Mujeres [n]	147/24
Procedencia	
Hospital Valme de Sevilla	78
Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida	93
Edad <sup>a</sup>	31 (18-47)
Tiempo de ADVP (meses) <sup>a</sup>	36 (3-240)
Pacientes VHC positivo [n (%)] <sup>a</sup>	100 (80)

<sup>a</sup> Los valores se muestran como el valor de la mediana y el rango intercuartil entre paréntesis.

El proceso de reclutamiento para la cohorte ENI se realizó en el Hospital Valme de Sevilla y el *Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida* (Sanchez et al. 2008). En el Hospital Valme de Sevilla se reclutaron 78 sujetos entre los

participantes en un estudio epidemiológico sobre la infección por *Leishmania* que tuvo lugar entre abril de 1998 y abril de 1999. En el *Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida* se reclutaron 47 sujetos entre los participantes de un programa de rehabilitación que tuvo lugar entre 1997 y 1999. El consumo de droga por vía parenteral en estos pacientes fue de una media de 36 meses (rango entre 3 y 240 meses) en el grupo de Sevilla y una media de 27 meses (rango entre 5 y 150 meses) en el grupo de Lleida. La infección por VHC, que es la infección viral crónica más transmitida por el uso compartido de agujas, estaba presente en 100 (80%) de los individuos de riesgo no infectados. Esta prevalencia era muy superior a la descrita en la población general en España, que oscilaba entre el 1 y el 2%. En una segunda fase se incorporaron a la cohorte 46 sujetos reclutados en el *Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida*. Las características clínicas y epidemiológicas de la cohorte ENI se resumen en la Tabla 5.

#### **1.4.- Test de seropositividad para VIH-1 y VHC y determinación de carga viral**

La determinación de seropositividad para el VIH-1 fue realizada mediante la detección de anticuerpos contra VIH-1 en suero con el kit *Micro particle Enzyme Immunoassay* (MEIA, Abbott Laboratories, IL, USA) y confirmada por análisis de *Western Blot* (INNO-LIA HIV Confirmation, Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica).

El diagnóstico de la infección por VHC se realizó sobre la base de la detección positiva de anticuerpos anti-VHC y anticuerpos anti-ARN del VHC (EIA; Ortho Diagnostic Systems, Inc., Raritan, NJ, USA). Asimismo, se detectó el ARN del VHC mediante PCR con el kit *Cobas Amplicor HCV* (Hoffman-La Roche Ltd., Basel, Switzerland).

La carga viral en suero se determinó con el *Amplicor HIV-1 Monitor test* (Roche Molecular Systems, Somerville, NJ, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La carga viral fue analizada en una escala logarítmica de base 10, los valores por debajo del nivel de detección (500 copias/ $\mu$ L) se registraron como 499 copias/ $\mu$ L. El recuento de linfocitos CD4+ se realizó mediante citometría de flujo en un *fluorescence-activated cell sorter analyzer* (Becton Dickinson, San José, CA, USA).



## 2.- ANALISIS GENÉTICO

### 2.1.- Obtención de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo dos técnicas distintas en función de la procedencia de la muestra: saliva y sangre periférica.

El ADN genómico procedente de las muestras de saliva se extrajo con el kit *BuccalAmp Extraction Kit* (Epicentre, Madison, USA). Las muestras de saliva fueron recogidas mediante raspado bucal con hisopos. Este protocolo se utilizó en la recogida de muestras de los individuos longevos ya que se trata de un método poco invasivo que permite su recogida *in situ*.

El ADN genómico procedente de las muestras de sangre periférica se extrajo con el kit *KG-Midi extraction kit* (Camgen, Cambridge, Reino Unido). Este protocolo se utilizó en el procesamiento de las muestras de controles sanos, individuos VIH+ y ENIs.

### 2.2.- Genotipado

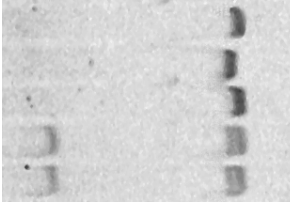
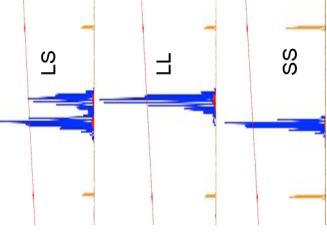
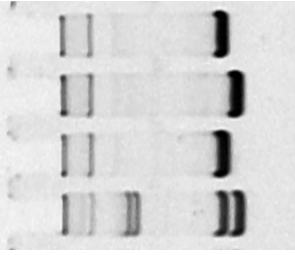
Se utilizaron distintas técnicas de genotipado según las características y requerimientos de cada polimorfismo. Las técnicas utilizadas se describen brevemente a continuación:

1. **Análisis del tamaño de los fragmentos.** Aplicada en los polimorfismos del tipo inserción/delección o microsatélite. Tras la amplificación de la región polimórfica mediante PCR se obtienen fragmentos de distinto tamaño. La separación de dichos fragmentos mediante electroforesis permite la asignación de alelos en función del tamaño.
2. **Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción** o RFLP (del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). El polimorfismo de interés altera la diana de una enzima de restricción, de forma que, dependiendo del alelo presente, la diana es o no reconocida por la enzima. El genotipado se realiza por amplificación de la región que contiene el polimorfismo y la posterior digestión del producto de PCR con la enzima de restricción. En función del alelo amplificado en cada fragmento, éste será cortado o no por la enzima. La separación de los fragmentos de restricción por electroforesis permite la asignación de genotipo.

3. **Polimorfismo de conformación de cadena sencilla** o SSCP (del inglés, *Single Strand Conformational Polymorphism*). Dicho método se fundamenta en la detección de cambios en la conformación de dos cadenas sencillas de ADN de igual longitud que difieren en un solo nucleótido. Tras la amplificación por PCR de la región que incluye el nucleótido polimórfico, el producto de PCR se desnaturaliza por calor y las cadenas sencillas se separan en un gel de acrilamida. La detección de bandas mediante tinción de plata permite asignar el genotipo en función del patrón de conformación observado. En este tipo de polimorfismos la nomenclatura de los alelos se realiza en función de la presencia/ausencia de diana. Así, el alelo que contiene la diana se denomina con letra minúscula, mientras que el alelo que no la contiene, se denomina con letra mayúscula.
4. **PCR específica de alelo.** Esta técnica se fundamenta en la utilización de *primers* específicos de alelo que permiten la amplificación de la región analizada dependiendo del alelo presente en la muestra.
5. **Secuenciación de ADN.** La amplificación por PCR de la región de interés, seguida de secuenciación directa por el método de Sanger, permite obtener el genotipo de la muestra.
6. **Discriminación alélica (*TaqMan assay*).** Este método consiste en una PCR a tiempo real en la que, además de los *primers* de amplificación, se incorporan 2 sondas específicas de alelo que contienen un fluorocromo (VIC o FAM) y un *quencher*. Las sondas hibridan con la muestra, de manera que durante la síntesis de la nueva molécula de ADN, la sonda específica será degradada por la polimerasa y la inespecífica será liberada sin degradarse. La sonda degradada libera el fluorocromo que emite fluorescencia al no estar inhibido por el *quencher*. La cantidad de fluorescencia captada en cada ciclo de la PCR permite crear curvas de amplificación para cada alelo.

Algunos de los métodos de genotipado han sido descritos previamente. Los protocolos utilizados para los polimorfismos del gen *VDR* están descritos en Sanchez et al. 2008 y Laplana et al. 2010; y los utilizados para el genotipado de las variantes de *RANTES* y *CCR5* están descritos en Laplana and Fibla 2012. Los protocolos aplicados para cada polimorfismo se detallan en la Tabla 6. Los protocolos de amplificación se inician con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C (10 min si se utiliza una Taq polimerasa Hot start) y terminan con un ciclo de 10 min a 72°C para realizar la extensión final de los fragmentos. Una vez terminada la reacción se guardan a 4°C hasta su procesamiento.

Tabla 6. Métodos de genotipado y primers utilizados.

Código rs del SNP ( <i>alias</i> )	Secuencia de los primers (5'-3') Código de ensayo TaqMan	Protocolo de amplificación <sup>a</sup>	Resultados esperados		Protocolo de detección
			Alelo	Tamaño (pb)	
<b>PCR &amp; análisis del tamaño de los fragmentos</b>					
rs3217318 ( <i>Deleción en promotor</i> ) <i>Locus: BST-2</i>	F: CGTCCAGCCTGTATTTCAT R: CCTGAACACAAAAACCAGTCC	45 seg a 94°C 45 seg a 64°C 45 seg a 72°C x35 ciclos	Δ19 i19	250 269	Los fragmentos amplificados fueron resueltos en un gel de acrilamida del 15% y teñidos con <i>sybrgreen I nucleic acid gel stain</i> .
rs71694748 ( <i>largedel</i> ) <i>Locus: BST-2</i>	F: GAGAATCGGGACAAAGAAGT R: GAGGGACCTTCCAAAGATGTG	50 seg a 94°C 50 seg a 65°C 50 seg a 72°C x40 ciclos	inserción deleción	495 163	Los fragmentos amplificados fueron resueltos en un gel de acrilamida del 15% y teñidos mediante tinción de plata.
rs17878969 ( <i>PolyA</i> ) <i>Locus: VDR</i>	F: CAGTTTGGGAGGTCGAGGTA R: FAM-CCTGGGTTCAATTTCTTCTGC	30 seg a 94°C 30 seg a 63°C 30 seg a 72°C x 40 ciclos	L S	190 184	Los fragmentos amplificados fueron resueltos por electroforesis capilar en el <i>ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer</i> (Applied Biosystems, California, USA). También pueden visualizarse en un gel de agarosa al 4% a 120V y 4°C durante 4 horas y tinción con bromuro de etidio (EtBr) o equivalente.
rs333 ( <i>CCR5Δ32</i> ) <i>Locus: CCR5</i>	F: TTAAAAGCCAGGCGGTCCAC R: GACCAGCCCCAAGATGACTA	60 seg a 94°C 60 seg a 65°C 60 seg a 72°C x35 ciclos	wt Δ32	204 172	Los fragmentos amplificados fueron resueltos en un gel de acrilamida del 12% y teñidos con <i>sybrgreen I nucleic acid gel stain</i> aunque también se pueden visualizar en un gel de agarosa del 3%.
	rs3217318			rs17878969	rs333
					
	Δ19/ Δ19/ i19			wtΔ32 wt/wt Δ32/Δ32	
				Inserción	

Continuación Tabla 6. Métodos de genotipado y primers utilizados.

SNP	Secuencia de los primers (5'-3')	Protocolo de amplificación <sup>a</sup>	Resultados esperados		Protocolo de detección	
			Código de ensayo TaqMan	Alelo		
<b>PCR &amp; RFLP</b>						
rs4516035 (A1012G) <i>Locus: VDR</i>	F: CCTCCTCTGTAGAGGGCAATAGCGAT R: GGACAGGTGAAAAAGATGGGGTTC	45 seg a 94°C 45 seg a 61°C 45 seg a 72°C x 40 ciclos		G (no corta) A (corta)	178 154+24	Los fragmentos amplificados se incubaron 4h a 37°C en presencia de 1U de EcoRV (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japón) y se resolvieron en un gel de agarosa al 3,5% seguido de tinción con <i>sybrgreen I nucleic acid gel stain</i> . La secuencia del primer forward fue modificada para introducir una diana para la enzima de restricción <i>EcoRV</i> (subrayado).
rs2107538 (-403A/G) <i>Locus: RANTES</i>	F: GCCTCAAATTTACAGTGTG R: TGCTTATTTCATTACAGATGTT	45 seg a 94°C 45 seg a 50°C 45 seg a 72°C x40 ciclos		A (no corta) G (corta)	135 112+23	Los fragmentos amplificados fueron incubados toda la noche a 55°C en presencia de 1 unidad de <i>MaeIII</i> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Los fragmentos fueron resueltos en un gel de agarosa del 3% y teñidos con <i>sybrgreen I nucleic acid gel stain</i> .
rs2280789 (Int1.1T/C) <i>Locus: RANTES</i>	F: CCTGTGCTTTGACCACCCACA R: GCTGACAGGATGAGTCAGA	50 seg a 94°C 50 seg a 63°C 50 seg a 72°C x40 ciclos		T (no corta) C (corta)	343 213+130	Los fragmentos amplificados fueron incubados durante 1 hora a 37°C en presencia de 1 unidad de <i>MbolI</i> (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japón). Los fragmentos fueron resueltos en un gel de agarosa del 1,5% y teñidos con <i>sybrgreen I nucleic acid gel stain</i> .
rs2228570 (FokI) <i>Locus: VDR</i>	F: AGTGGCCCTGGCACTGACTCTCTCT R: ATGGAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC	45 seg a 94°C 45 seg a 65°C 45 seg a 72°C x 35 ciclos		C (no corta) T (corta)	267 200+67	Los fragmentos amplificados fueron incubados durante 1 hora a 37°C en presencia de 1 unidad de <i>FokI</i> (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japón). Los fragmentos fueron resueltos en un gel de agarosa del 2% y teñidos con <i>sybrgreen I nucleic acid gel stain</i> .
rs1544410 (BsmI) <i>Locus: VDR</i>	F: AGTGTCCAGGGGATTCGTAG R: ATAGGAGAACCATCTCTCAG	45 seg a 94°C 45 seg a 65°C 45 seg a 72°C x 35 ciclos		A (no corta) G (corta)	192 110+82	Los fragmentos amplificados fueron incubados durante 1 hora a 65°C en presencia de 1 unidad de <i>BsmI</i> (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA, USA), fueron resueltos en un gel de agarosa del 2% y teñidos con EtBr.
AG	AA	GG	AA AG GG	CC TC TT	CT CC CT CC TT	GG AA GA

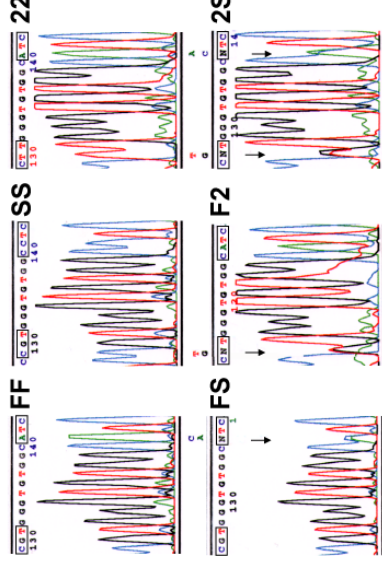
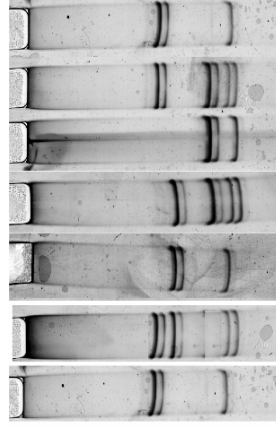
Continuación Tabla 6. Métodos de genotipado y primers utilizados.

SNP	Secuencia de los primers (5'-3')		Protocolo de amplificación <sup>a</sup>		Resultados esperados		Protocolo de detección
	Código de ensayo	TaqMan	amplificación <sup>a</sup>	Alelo	Tamaño (pb)		
rs7041 ( <i>Glu416Asp</i> )	F: ACATGTTAGTAAGACCTTAC	R: GATTGGAGTGCATACGTTTC	60 seg a 94°C	T	233	Se mezclaron 2µL de los fragmentos amplificados con 40µL de solución desnaturalizante (50% formamida, 0,05% SDS y 5 mmol/L EDTA) y se incubaron durante 10 minutos a 98°C y 45 minutos a 0°C (agua con hielo). Las cadenas sencillas se resolvieron en un gel de acrilamida del 12% no desnaturalizante durante 240 min a 120 V. Las bandas se visualizaron mediante tinción de plata. Los patrones de cadena sencilla se asignaron sin ambigüedad a cada genotipo.	
<i>Locus: GC</i>			60 seg a 50°C	G			
rs4588 ( <i>Thr420Lys</i> )			45 seg a 72°C	C			
<i>Locus: GC</i>			x35 ciclos	A			

Codificación haplotipos *Glu416Asp\_Thr420Lys*

-	416	-	417	-	418	-	419	-	420	-	
3' -	CTA	-	CGG	-	TGT	-	GGG	-	TTC	-	5'
5' -	GAT	-	GCC	-	ACA	-	CCC	-	AAG	-	3'
-	Asp	-	Ala	-	Thr	-	Pro	-	Lys	-	
3' -	CTA	-	CGG	-	TGT	-	GGG	-	TGC	-	5'
5' -	GAT	-	GCC	-	ACA	-	CCC	-	ACG	-	3'
-	Asp	-	Ala	-	Thr	-	Pro	-	Thr	-	
3' -	CTC	-	CGG	-	TGT	-	GGG	-	TGC	-	5'
5' -	GAG	-	GCC	-	ACA	-	CCC	-	ACG	-	3'
-	Glu	-	Ala	-	Thr	-	Pro	-	Thr	-	
	GAT/GAG								AAG/ACG		
	Asp/Glu								Lys/Thr		

Patrón de bandas por SSCP de los haplotipos de *Glu416Asp\_Thr420Lys*.



FF F2 22 S SS FS

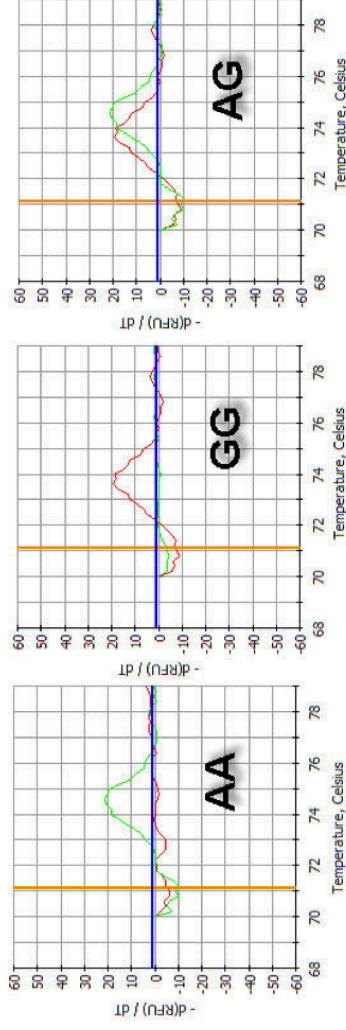
Codificación de los patrones de SSCP : 2 → *Glu416Asp-Thr420Lys-A* (aminoácidos Asp y Lys)  
 F → *Glu416Asp-Thr420Lys-C* (aminoácidos Asp y Thr)  
 S → *Glu416Asp-G Thr420Lys-C* (aminoácidos Glu y Thr)

Continuación Tabla 6. Métodos de genotipado y primers utilizados.

SNP	Secuencia de los primers (5'-3')	Código de ensayo TaqMan	Protocolo de amplificación <sup>a</sup>		Resultados esperados		Protocolo de detección
			amplificación <sup>a</sup>	amplificación <sup>a</sup>	Alelo	Tamaño (pb)	
<b>PCR específica de alelo</b>							
rs115168820 ( <i>Cdx2</i> )	CCCATATAAAGAAATAAGTTTTaA- <b>T</b> * CCCATATAAAGAAATAAGTTTTaA- <b>C</b> *		45 seg a 94°C 45 seg a 57°C 45 seg a 72°C x35 ciclos		G A	76	
<i>Locus: VDR</i>							
rs4646536	AGCCCTAGCCCTCATCTaG - <b>T</b> * AGCCCTAGCCCTCATCTaG - <b>C</b> *		45 seg a 94°C 45 seg a 59,2°C 45 seg a 72°C x35 ciclos		T C	86	
<i>Locus: CYP27B1</i>							
	Común: TGGGACAGGAGAAATTCCA						

Para cada polimorfismo se realizaron dos amplificaciones independientes utilizando un primer común y un primer específico de alelo. Los primers específicos difieren en la base del extremo 3', así tan solo se amplifica el alelo correcto. Además, para evitar amplificaciones inespecíficas se les incluyó un *mismatch* en la antepenúltima base del extremo 3'. Los fragmentos amplificados se incubaron con SYBR Green a 95°C descendiendo 0,2°C/15 seg hasta los 65°C. Se siguió la curva de *melting* en un *iCyclerIQ* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las amplificaciones fueron comprobadas en un gel de agarosa para confirmar que no había productos inespecíficos.

Ejemplo de curvas de *melting* para el polimorfismo *Cdx2*



Secuenciación de ADN

rs3782130	F: AAAGCTGGGAGATTCTTTT R: AGCAACATAGCAAGACTGT		45 seg a 94°C 45 seg a 49°C 45 seg a 72°C x35 ciclos		G C	350	
<i>Locus: CYP27B1</i>							

Se secuenció un fragmento de 388 pb mediante el equipo *ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y los resultados se analizaron con el programa *Sequencing Analysis 3.7*.

Continuación Tabla 6. Métodos de genotipado y primers utilizados.

SNP	Secuencia de los primers (5'-3')	Código de ensayo TaqMan	Protocolo de amplificación <sup>a</sup>		Resultados esperados		Protocolo de detección
			amplificación <sup>a</sup>	Tamaño (pb)	Alelo	Tamaño (pb)	
<b>Discriminación alélica. (TaqMan assay)</b>							
rs1804402 (no sinónimo) Locus: <i>BST-2</i>		C_43881041_10	15 seg a 92°C 60 seg a 62°C x40 ciclos	FAM VIC	G A		Amplificación en tiempo real mediante <i>TaqMan SNP allelic discrimination</i> assay (Applied Biosystems, California, USA) en un <i>iCyclerIQ</i> (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) que permite una asignación automática del genotipo según el fluorocromo asociado a cada alelo.
rs10415893 (tagSNP) Locus: <i>BST-2</i>		C_30162809_10	15 seg a 92°C 60 seg a 62°C x40 ciclos	FAM VIC	G A		
rs10877012 Locus: <i>CYP27B1</i>	F: GGGAGTAAGGAGCAGAGAGGTAAA R: AACAGAGAGGGCCGTGTCT F: VIC-CTGTGGGAGATTCTTTTA R: FAM-TGTGGGAGATTATTTTA		15 seg a 92°C 60 seg a 62°C x 40 ciclos	FAM VIC	G T		Amplificación en tiempo real con un kit de <i>TaqMan SNP allelic discrimination assay-by-design</i> (Applied Biosystems, California, USA) en un <i>iCyclerIQ</i> (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) que permite una asignación automática del genotipo según el fluorocromo asociado a cada alelo.

Gráfico de la amplificación en tiempo real del polimorfismo rs1804402. Todos los individuos son homocigotos CC.

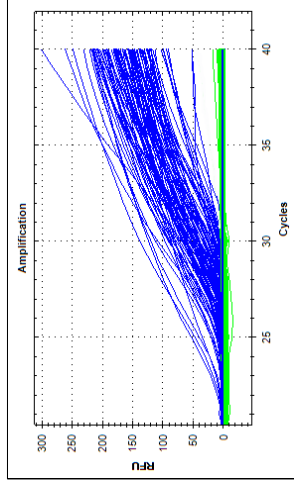
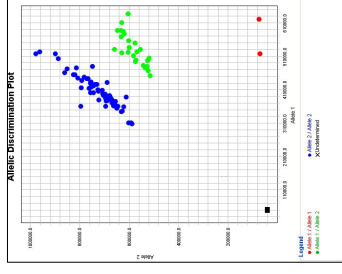


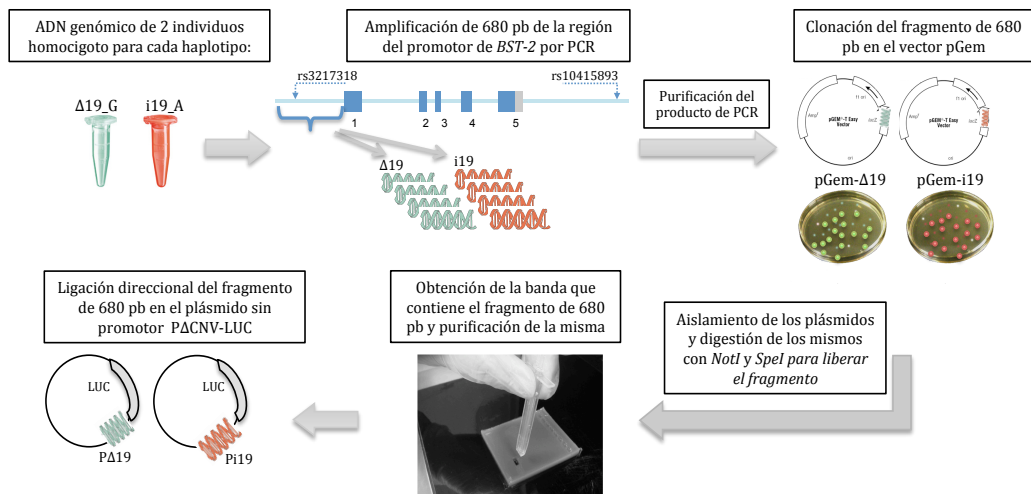
Gráfico de la discriminación alélica tras una amplificación a tiempo real.



### 3.- ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL PROMOTOR DE *BST-2*.

#### 3.1.- Clonación

Se amplificó por PCR un fragmento de 680 pb del promotor de *BST-2*, de la posición -640 a la 40, que contenía el polimorfismo rs3217318. La amplificación se realizó a partir de ADN genómico de 2 individuos homocigotos para los haplotipos  $\Delta 19\_G$  y  $i19\_A$ . Dada la complejidad de la región y su elevado contenido en guaninas y citosinas se utilizó el kit *Qiagen Multiplex PCR kit* (QIAGEN, Inc Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los primers utilizados fueron *NotI\_Forward*: 5'-ACTGACTAGTAGGAGCTTGTTCCTGCAGGTGCCAAGACAG-3' y *SpeI\_Reverse*: 5'-ACTGGCGGCCGCCAGATCTCCCCTTTA GAGTCTGGCCTGGAG-3' (dianas de enzimas de restricción subrayadas).



**Figura 31.** Protocolo de obtención de los plásmidos reporteros P- $\Delta 19$ -LUC y P-i19-LUC.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit *Genelute Clean-up kit* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y clonados en *pGEM easy vector system I* (Promega, Madison, Wisconsin, USA) generando los plásmidos pGEM- $\Delta 19$  y pGEM-i19 (Figura 31). La fidelidad de las amplificaciones de PCR y de la subclonación fue confirmada por secuenciación de los insertos de los plásmidos de ambas cadenas con el método de Sanger utilizando el kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* en el *Genetic Analyzer 3130* (Applied Biosystems, California, USA). Los plásmidos reporteros de luciferasa (LUC) fueron construidos mediante la digestión de las construcciones pGEM- $\Delta 19$  y pGEM-i19 con las enzimas de



restricción *NotI* y *SpeI* y los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, teñidos con azul de metileno, recortados del gel, purificados con el kit *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN, Inc Hilden, Alemania), ligados direccionalmente en el plásmido sin promotor P $\Delta$ CNV-LUC (García-Moruja et al. 2005); y se obtuvieron como resultado los plásmidos reporteros P- $\Delta$ 19-LUC y P-i19-LUC.

### 3.2.- Transfección y ensayo de luciferasa

Para evaluar la actividad luciferasa de las construcciones P- $\Delta$ 19-LUC y P-i19-LUC, se transfectaron células U373 con dichos plásmidos. El esquema de trabajo se resume en la Figura 32. Las células U373 fueron lavadas con PBS frío y se suspendieron en medio RPMI 1640 sin suero, suplementado con 10 mM de glucosa y 0,1 mM ditiotreitól (Gibco, Paisley, Scotland, UK). La transfección transitoria de las células U373 ( $3 \times 10^6$ ) se realizó por electroporación mediante el *Gene Pulser II electroporation system* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 260V, 1200 $\mu$ F y  $\infty \Omega$  con 2 $\mu$ g del plásmido reportero por cada  $10^6$  células U373 y cotransfectado con 625ng del plásmido reportero *PSV- $\beta$ -galactosidase reporter plasmid* (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Las células transfectadas fueron cultivadas en 10 mL de RPMI 1640 durante 24 horas y luego cultivadas en presencia (estimado) o ausencia (no estimulado) de 10ng/mL interferón- $\gamma$  durante 24 y 48 horas.

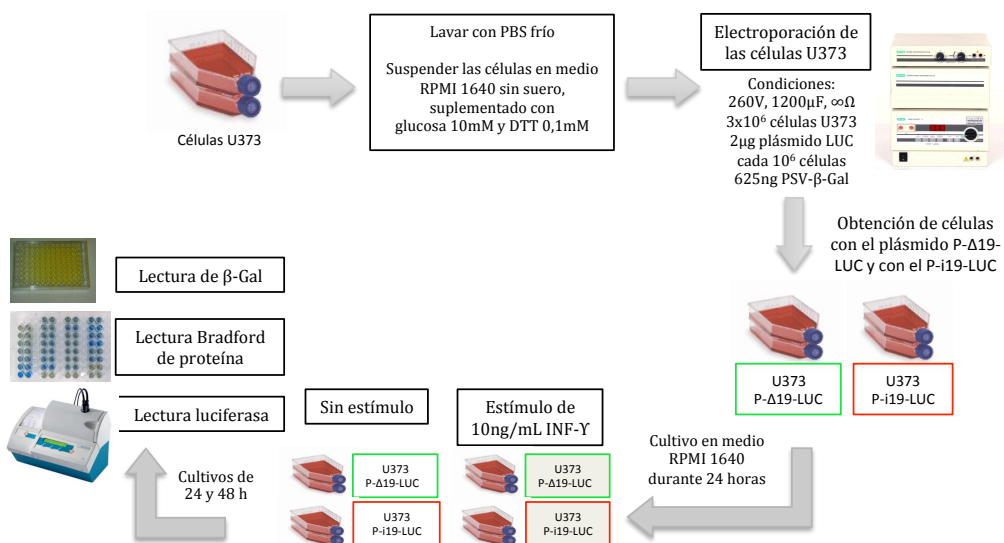


Figura 32. Esquema de trabajo utilizado en el ensayo de luciferasa.

La actividad luciferasa se midió en un luminómetro *Berthold Sirius V2* (Berthold, Bad Wildbad, Germany) siguiendo el protocolo descrito en (García-Moruja et al.

2005). Al mismo tiempo, las células fueron lavadas con PBS y se procesaron para un ensayo de  $\beta$ -galactosidasa con el kit  *$\beta$ -galactosidase chemiluminescent assay* (Roche) y una cuantificación de proteínas con el método Bradford con el *Bradford Protein Assay* (Bio-Rad). La eficiencia de transfección se calculó después de la normalización por  $\beta$ -galactosidasa y contenido de proteína. Todos los experimentos se repitieron un mínimo de 3 veces. Los resultados se expresaron como la media de actividad luciferasa normalizada ( $\pm$  desviación estándar). Las diferencias fueron evaluadas con una prueba de comparación de medias o t-test ( $P < 0,05$ ).

## 4.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A continuación se describen los métodos estadísticos utilizados en el análisis de los datos.

### 4.1.- Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg

Se testó el equilibrio Hardy-Weinberg de todos los polimorfismos genotipados en cada cohorte. Las frecuencias genotípicas se determinaron por recuento y se realizó la comparación del número de individuos observados y esperados para cada genotipo mediante un test de *chi*-cuadrado con un grado de libertad.

### 4.2.- Estadística descriptiva

Los parámetros descriptivos como la media, la mediana, intervalos de confianza, rangos intercuartiles o varianzas se obtuvieron mediante el paquete estadístico SPSS 18.0 (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois). Las diferencias en variables numéricas entre genotipos fueron evaluadas mediante un test ANOVA utilizando el programa estadístico SPSS 18.0.

### 4.3.- Test no paramétricos

Los test no paramétricos U de Mann-Whitney (comparación entre dos grupos) y Kruskal-Wallis, (comparación de más de dos grupos) se utilizaron en el análisis de los datos cuya distribución no se ajusta *a priori* a una distribución normal.

## 4.4.- Estudio de asociación

Los estudios de asociación se han evaluado mediante un diseño caso-control en los que se comparan frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas y diplotípicas entre individuos que manifiestan (casos) o no manifiestan (controles) una determinada característica.

La determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas en casos y controles, se realizó por recuento mediante el programa pLink (disponible en la página web <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) (Purcell et al. 2007). La comparación de la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles se realizó mediante tablas de contingencia utilizando el programa pLink y el software online *OpenEpi Web Resource* (disponible en la página web <http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>) (Kevin M Sullivan and Soe 2009). La asociación de los genotipos se evaluó asumiendo cuatro modelos genéticos distintos: modelo codominante, comparando todos los genotipos por parejas; modelo dominante, comparando la suma de los homocigotos para el alelo común más los heterocigotos con el total de homocigotos para el alelo raro; modelo recesivo, comparando la suma de los homocigotos para el alelo raro más los heterocigotos con el total de homocigotos para el alelo común; y el modelo sobredominante, comparando los heterocigotos respecto a la suma total de homocigotos. El P-valor utilizado ha sido el de la prueba exacta de Fisher, considerando valores de  $P < 0,05$  como estadísticamente significativos. Para las comparaciones que contienen casillas con valor cero, el *Odds Ratio* y el intervalo de confianza del 95% se estimaron mediante el método *Peto odds ratio* utilizando el software online (<http://www.hutchon.net/ConfidORnulhypo.htm>). Este método tiene la ventaja de aceptar casillas con un valor 0 sin generar infinito.

La corrección por comparaciones múltiples se ha realizado mediante los métodos de Bonferroni y de descomposición espectral de SNPs o SNPSpD (del inglés, *SNP spectral decomposition*) (<http://gump.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSpD>). El método de Bonferroni consiste en dividir el valor de P por el número total de test realizados (N). Alternativamente se ha utilizado el método SNPSpD que es una adaptación del método anterior a estudios de asociación con SNPs, que tiene en cuenta el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores analizados (Nyholt 2004). Dicho método permite determinar el valor de N, como el número efectivo de comparaciones independientes.

El desequilibrio de ligamiento entre *loci* se midió mediante el coeficiente normalizado  $D'$  (Lewontin 1988). Dicho coeficiente se estimó mediante el software Haploview 4.2 (Barrett et al. 2005). El rango absoluto de valores de  $D'$

oscila entre 0 y 1. Dos *loci* presentan un valor de  $D'=0$  (*loci* en equilibrio) cuando se observan los 4 haplotipos posibles con frecuencias igual al producto de las frecuencias de los alelos que los componen. Dos *loci* presentan un  $D'=1$  (*loci* en desequilibrio total), cuando solo se observan 2 de los 4 haplotipos posibles. En el presente estudio se ha considerado que dos *loci* contiguos están en desequilibrio de ligamiento si  $D'>0,8$ . La inferencia estadística de los haplotipos se ha realizado a partir de los datos de genotipos de la muestra mediante los softwares PHASE 2.1.1 (Stephens et al. 2001) y pLink.

## 4.5.- Estudios de supervivencia

Los estudios de progresión de la infección por VIH-1 se han realizado mediante análisis de supervivencia, en los que se ha considerado como variable el tiempo desde la primera fecha del test VIH-1 positivo hasta la manifestación de un evento de progresión.

Se han censurado aquellos individuos que han abandonado el estudio o han fallecido, por causas no relacionadas con la infección, antes del final del estudio sin haber desarrollado un evento de progresión.

El análisis de supervivencia se ha realizado mediante el estimador no paramétrico de Kaplan-Meier utilizando el programa estadístico SPSS 18.0. Las diferencias entre las curvas de supervivencia se han comparado mediante el test de logaritmo de los rangos (*Log-Rank test*) y los ratios de riesgo (*hazard ratios*) han sido estimados mediante el modelo de riesgos proporcionales o regresión de Cox que permite incorporar covariables explicativas.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





**VARIABILIDAD DE GENES DE RESPUESTA  
INMUNE EN SUSCEPTIBILIDAD A LA  
INFECCIÓN POR VIH-1 Y RITMO DE  
PROGRESIÓN A SIDA**





# 1.- PAPEL DE LA VARIABILIDAD DE *BST-2* EN SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA

El papel de los factores de restricción del huésped en el curso de la infección por VIH-1 ha sido ampliamente estudiado. Se ha demostrado que variantes de factores de restricción se asocian con susceptibilidad a la infección y ritmo de progresión. Dada la reciente descripción del factor de restricción *BST-2* como inhibidor de la liberación de partículas virales de las células infectadas por VIH-1, proponemos evaluar el posible papel de la variabilidad genética de dicho factor en la susceptibilidad a la infección por VIH-1 y el ritmo de progresión a sida. Para ello se han caracterizado variantes del gen con potenciales efectos funcionales y se ha realizado un estudio caso-control para evaluar la distribución de dichas variantes en las siguientes cohortes: controles sanos, AVIP y ENI. La cohorte de controles sanos está constituida por 188 sujetos obtenidos mediante un proceso de aleatorización de la cohorte total de controles. La cohorte AVIP es una subcohorte derivada de la cohorte AIDS-Lleida. Dicha subcohorte está compuesta por 185 pacientes VIH+ de los que se dispone de datos de seguimiento y progresión durante un periodo mínimo de 7 años. La cohorte ENI está compuesta por 171 sujetos seronegativos para el VIH-1 que han estado en situación de riesgo de infección por su condición de ADVP.

## 1.1- Selección de las variantes polimórficas de *BST-2*

La selección de los polimorfismos candidatos del gen *BST-2* se ha realizado siguiendo distintas estrategias. En una primera aproximación se ha calculado el desequilibrio de ligamiento de la región del *locus BST-2* para la población CEU (*Utah residents with ancestry from northern and western Europe*) utilizando la información disponible de HapMap (Barrett et al. 2005) mediante el software Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). Se ha considerado estructura de bloque para las parejas de marcadores que muestran una  $D' > 0,8$ , calculada con el método *Solid-spine* implementado en el programa Haploview. Los resultados muestran que el gen se localiza en una región con alto desequilibrio de ligamiento y que existe un bloque de ligamiento que captura la variabilidad de todo el gen. Dicho análisis ha permitido seleccionar el polimorfismo rs10415893, situado en la región 3'UTR, como marcador de bloque o *tagSNP*. Además de dicho *tagSNP* se han considerado aquellas variantes polimórficas de *BST-2* anotadas en la base de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) con un posible efecto funcional. Atendiendo a dicho criterio, se han seleccionado los polimorfismos rs71694748,

inserción/delección de 353 pb que cubre todo el cuarto intrón; rs1804402, SNP no sinónimo situado en el cuarto exón, consistente en un cambio de G por A que determina un cambio de aminoácido de Valina a Phenilalanina en la proteína; y por último, rs3217318, inserción/delección de 19 pb localizado en la posición -411 del promotor. A excepción del *tagSNP*, no existe información en las bases de datos en relación a la frecuencia de los polimorfismos seleccionados en población caucásica. La estructura del gen y la localización de dichos polimorfismos se muestran en la Figura 33.

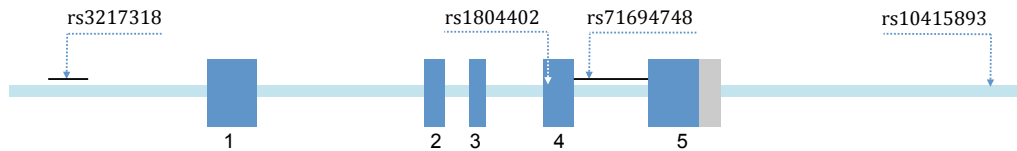


Figura 33. Estructura del gen *BST-2* y localización de los polimorfismos seleccionados.

## 1.2.- Estudio de las variantes de *BST-2* en susceptibilidad a la infección por VIH-1 y ritmo de progresión a sida

Se han genotipado todos los individuos de las cohortes y se han determinado las frecuencias alélicas y genotípicas mediante recuento. Tras el genotipado de todos los individuos, el polimorfismo de inserción/delección rs71694748 y el polimorfismo no sinónimo rs1804402 han resultado ser monomórficos en todas las cohortes. Por el contrario, tanto el *tagSNP* rs10415893 como el polimorfismo de inserción/delección rs3217318 han resultado ser polimórficos y su distribución genotípica se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para todas las cohortes.

Se han evaluado las posibles diferencias en la distribución de alelos y genotipos de las variantes rs3217318 y rs10415893 entre las cohortes. No se han observado diferencias significativas en la distribución global de frecuencias alélicas y genotípicas entre los sujetos de las cohortes VIH+, ENI y controles sanos (Tabla 7).

Se han evaluado las posibles diferencias en la distribución de alelos y genotipos de las variantes rs3217318 y rs10415893 en la cohorte AVIP agrupando a los pacientes de acuerdo a los criterios de progresión descritos por el CDC: CDC 1987 (n=49 (26,5%) progresores vs. 136 (73,5%) no progresores); y CDC 1993 (n=89 (48,1%) progresores vs. 96 (51,9%) no progresores). Asimismo, se ha considerado también como criterio de progresión, el descenso en el recuento de linfocitos CD4+ por debajo de 200/ $\mu$ L (n=75 (40,5%) progresores vs. 110 (59,5%) no progresores). No se han observado diferencias significativas entre los

Tabla 7. Distribución de genotipos, alelos y haplotipos de las variantes polimórficas del gen *BST-2*, rs3217318 y rs10415893, en todas las cohortes.

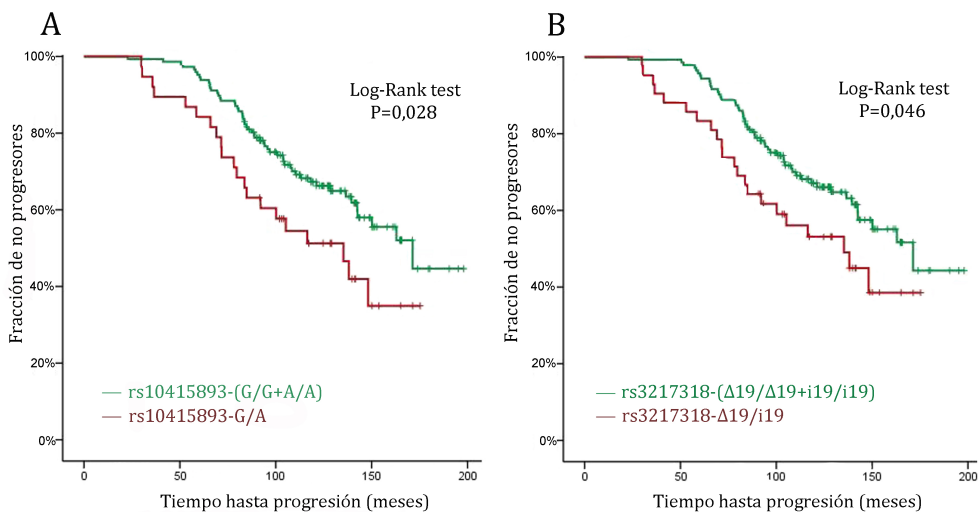
Variantes (código rs)	Prevalencia en las cohortes; n (%)					
		Controles		Pacientes VIH-1+		Expuestos no infectados
		Todos	Progresores <sup>a</sup>	No progresores		
rs3217318	Genotipo					
	Δ19/Δ19	129 (69)	137 (74)	51 (68)	86 (78,2)	117 (68,4)
	Δ19/i19	52 (27,8)	42 (22,7)	22 (29,3)	20 (18,2)	49 (28,7)
	i19/i19	6 (3,2)	6 (3,3)	2 (2,7)	4 (3,6)	5 (2,9)
rs10415893	Alelo					
	Δ19	310 (82,8)	316 (85,4)	124 (82,6)	186 (86,9)	283 (82,7)
	i19	64 (17,2)	54 (14,6)	26 (17,4)	28 (13,1)	59 (17,3)
rs10415893	Genotipo					
	GG	128 (68)	142 (76,8)	52 (69,3)	90 (81,8)	119 (70)
	GA	55 (29,3)	38 (20,5)	21 (28)	17 (15,5)	47 (27,7)
	AA	5 (2,7)	5 (2,7)	2 (2,7)	3 (2,7)	4 (2,3)
rs3217318_rs10415893	Alelo					
	G	311 (82,7)	322 (87)	125 (83,3)	197 (89,5)	285 (83,8)
	A	65 (17,3)	48 (13)	25 (16,7)	23 (10,5)	55 (16,2)
rs3217318_rs10415893	Recuento de haplotipos					
	Δ19_G	307 (82,1)	310 (85,2)	122 (82,4)	188 (87)	283 (83,2)
	i19_A	61 (16,3)	48 (13,2)	25 (16,9)	23 (10,6)	55 (16,2)
	i19_G	3 (0,8)	6 (1,6)	1 (0,7)	5 (2,3)	2 (0,6)
	Δ19_A	3 (0,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
rs3217318_rs10415893	Recuento de diplotipos					
	Δ19_G / Δ19_G	126 (67,4)	137 (74)	51 (68)	86 (78,2)	117 (68,8)
	Δ19_G / i19_A	50 (26,7)	37 (20)	21 (28)	16 (14,5)	47 (27,7)
	Otros (<5%) <sup>b</sup>	11 (5,9)	11 (6)	3 (4)	8 (7,3)	6 (3,5)

VIH+: pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Los genotipos perdidos son: 1 control sano para el rs3217318 y 1 expuesto no infectado para el rs10415893.

<sup>a</sup> Se consideraron como progresores aquellos pacientes que presentaron un descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200/μL.

<sup>b</sup> Otros diplotipos fueron: Δ19\_G/i19\_G (n=5, 2,7%), i19\_A/i19\_A (n=5, 2,7%) y i19\_G/i19\_A (n=1, 0,5%).

pacientes agrupados según CDC 1987 y CDC 1993 (datos no mostrados). Sin embargo, se observan diferencias significativas en la distribución de genotipos entre los pacientes agrupados de acuerdo con el criterio de progresión “descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200/ $\mu$ L” (Tabla 7). Atendiendo a dicho criterio de progresión, los alelos *rs3217318-i19* y *rs10415893-A* presentan una menor prevalencia en los pacientes no progresores. La comparación del alelo *rs10415893-A* entre sujetos no progresores y controles sanos es la que alcanza significación estadística (Odds Ratio (OR) =1,8; Intervalo de confianza (IC) 95%: 1,1-3; P=0,02) (Tabla 7). El genotipo *rs10415893-G/G* se encuentra sobrerrepresentado en los sujetos no progresores en comparación con los controles sanos (OR=2,1; IC95%: 1,2-3,7; P=0,01). Además, asumiendo un modelo de sobredominancia, se observa una menor prevalencia de heterocigotos *rs3217318- $\Delta$ 19/i19* en no progresores cuando se comparan con la distribución observada en los ENI (homocigotos vs. heterocigotos; OR=1,82; IC95%: 1-3,2; P=0,046). Asimismo los heterocigotos *rs10415893-G/A* son menos prevalentes en no progresores en comparación con controles sanos (OR=2,3; IC95%: 1,2-4,1; P=0,007), progresores (OR=2,1; IC95%: 1-4,4; P=0,04) y ENI (OR=2,1; IC95%: 1,1-3,9; P=0,017) (Tabla 7).



**Figura 34.** Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de los pacientes agrupados según el genotipo del locus *BST-2*. A) Gráfica de supervivencia de los pacientes agrupados según el genotipo del polimorfismo *rs10415893*. B) Gráfica de supervivencia de los pacientes agrupados según el genotipo del polimorfismo *rs3217318*. Criterio de progresión: primer descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200 $\mu$ L.

Atendiendo al criterio de progresión “descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200/ $\mu$ L” se ha llevado a cabo un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier evaluando el tiempo de progresión de los pacientes de la cohorte AVIP. Los resultados indican que el ritmo de progresión observado en los heterocigotos

*rs10415893-G/A* (tiempo medio de progresión 119 meses, IC95%: 102-136) es más rápido que el observado en los homocigotos *rs10415893-(G/G+A/A)* (150 meses, IC95%: 140-160) (Log-Rank test  $P=0,028$ ) (Figura 34A). Asimismo el ritmo de progresión de los heterocigotos *rs3217318-Δ19/i19* (121 meses, IC95%: 104-137) es más rápido que el observado en los homocigotos *rs3217318-(Δ19/Δ19+i19/i19)* (150 meses, IC95%: 140-160) (Log-Rank test  $P=0,046$ ) (Figura 34B). Se ha realizado una estimación de los riesgos proporcionales Cox bajo un modelo no ajustado y ajustando para sexo, edad en el primer test VIH+, y genotipo para el polimorfismo *CCR5Δ32*. Los riesgos proporcionales Cox para progresión en heterocigotos *rs10415893-G/A* y heterocigotos *rs3217318-Δ19/i19*, son significativos bajo el modelo no ajustado (*Unadjusted hazard ratio* ( $HR_U$ ) = 1,75; IC95%: 1-2,9;  $P=0,03$  y  $HR_U=1,6$ ; IC95%: 1-2,7;  $P=0,049$ , respectivamente). Asimismo, bajo el modelo ajustado, los riesgos proporcionales Cox se mantienen significativos en los heterocigotos *rs10415893-G/A* (*adjusted hazard ratio* ( $HR_A$ )=1,73; IC95%: 1-2,9;  $P=0,034$ ).

### 1.3.- Análisis de haplotipos y diplotipos

Dado el fuerte desequilibrio de ligamiento observado entre los polimorfismos *rs3217318* y *rs10415893* se ha realizado una inferencia estadística de los haplotipos y se han comparado las frecuencias entre grupos de progresión mediante el software pLink. La distribución global de haplotipos muestra diferencias al comparar no progresores con controles sanos ( $P=0,056$ ) y ENI ( $P=0,044$ ) (Tabla 7). El test específico de haplotipo revela una menor prevalencia del haplotipo *rs3217318-i19\_rs10415893-A* (a partir de ahora *i19\_A*) en no progresores (10,6%) en comparación con controles sanos (16,3%) ( $OR=1,6$ ; IC95%: 1-2,7;  $P=0,057$ ).

La imputación de diplotipos se realizó mediante el software pLink con una probabilidad de imputación  $>0,99$ . El recuento de diplotipos se muestra en la Tabla 7. Los homocigotos para el haplotipo *rs3217318-Δ19\_rs10415893-G* (*Δ19\_G/Δ19\_G*) se encuentran sobrerrepresentados en los pacientes no progresores, alcanzando diferencias significativas en la comparación con individuos control ( $OR=0,57$ ; IC95%: 0,33-0,99;  $P=0,047$ ). Sin embargo, hay una menor prevalencia de heterocigotos *Δ19\_G/i19\_A* en los individuos no progresores, y se alcanzan diferencias significativas en las comparaciones con controles sanos ( $OR=2,14$ ; IC95%: 1,1-4;  $P=0,01$ ), progresores ( $OR=2,2$ ; IC95%: 1,2-4,2;  $P=0,01$ ), y ENI ( $OR=2,3$ ; IC95%: 1,1-4,7;  $P=0,025$ ).

Las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes VIH+ agrupados según el diplotipo de *BST-2* se muestran en la Tabla 8. Los pacientes heterocigotos *Δ19\_G/i19\_A* se encuentran sobrerrepresentados en el estadio 3

(recuento de CD4+ <200 células/ $\mu$ L) (OR=2,3; IC95%: 1,1-4,8; P=0,041). Tanto el valor más bajo del recuento de linfocitos CD4+ inferior como el valor más alto de la carga viral superior se observan en los heterocigotos  $\Delta 19\_G/i19\_A$ , pero sólo la primera alcanza significación estadística (P=0,018). El reducido número de pacientes con datos fiables sobre la carga viral (n=135) puede haber debilitado el poder para alcanzar significación estadística para esta comparación.

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier del ritmo de progresión en función del diplotipo revela una tasa de progresión significativamente más rápida para los pacientes con diplotipo  $\Delta 19\_G/i19\_A$  (118 meses, IC95%: 101-135) en comparación con los de diplotipo  $\Delta 19\_G/\Delta 19\_G$  (150 meses, IC95%: 139-160) (Log-Rank test P=0,026) (Figura 35). Los riesgos proporcionales Cox del diplotipo  $\Delta 19\_G/i19\_A$  son significativamente más altos en comparación con el diplotipo  $\Delta 19\_G/\Delta 19\_G$ , tanto para el modelo no ajustado ( $HR_U = 1,8$ ; IC95%: 1-2,9; P=0,028) como para el modelo ajustado ( $HR_A = 1,7$ ; IC95%: 1-2,9; P=0,034).

En el análisis no se ha podido considerar el factor "inicio de tratamiento" como factor de corrección debido a que los pacientes sólo iniciaron el tratamiento como resultado de una evolución clínica negativa. Por consiguiente, el "inicio de tratamiento" es el principal factor de progresión en nuestra cohorte, y enmascara cualquier otro factor que podamos considerar. Para superar el efecto de esta limitación, se ha evaluado la asociación de los diplotipos de *BST-2* con progresión tras estratificar a los sujetos de acuerdo a su condición de haber iniciado o no tratamiento. En ambos grupos se observa una sobrerrepresentación de los heterocigotos  $\Delta 19\_G/i19\_A$  en progresores coincidiendo con el resultado obtenido en la muestra no estratificada. Así, en los pacientes que no iniciaron tratamiento (n=33) 1 de 3 (33,3%) heterocigotos  $\Delta 19\_G/i19\_A$  desarrollaron el criterio de progresión, mientras que sólo 2 de 28 (7,1%) homocigotos  $\Delta 19\_G/\Delta 19\_G$  desarrollaron dicho criterio. De forma similar, en los pacientes que iniciaron tratamiento (n=152) 20 de 34 (59%) heterocigotos  $\Delta 19\_G/i19\_A$  desarrollaron el criterio de progresión, mientras que 49 de 109 (45%) homocigotos  $\Delta 19\_G/\Delta 19\_G$  desarrollaron dicho criterio. Si bien estas diferencias no alcanzan significación estadística, probablemente debido a la reducción en el número de sujetos como consecuencia de la estratificación, estos resultados indican que el efecto de *BST-2* actúa de igual modo en pacientes que iniciaron o no el tratamiento antirretroviral.

Tabla 8. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes VIH+ agrupados según el diplotipo de *BST-2* (rs3217318\_rs10415893).

Características	Diplo tipos de <i>BST-2</i> (rs3217318_rs10415893)		
	Homocigotos $\Delta 19\_G/\Delta 19\_G$	Heterocigotos $\Delta 19\_G/i19\_A$	Otros diplotipos <sup>a</sup>
Sujetos [n (%)]	137	37	11
Hombres/mujeres [n]	105/32	29/8	4/7
Edad en primer test VIH positivo (edad) <sup>b</sup>	23 (21-27)	25 (22-28)	26 (24-27)
Tiempo de seguimiento (meses) <sup>b</sup>	127 (107-144)	128 (103-141)	138 (103-145)
Pacientes que han iniciado tratamiento antirretroviral [n (%)]	109 (79,6)	34 (91,9)	9 (81,8)
Pacientes VHC positivos [n (%)] <sup>c</sup>	124 (97,6)	35 (94,6)	11 (100)
<i>Exitus</i> [n (%)]	3 (2,2)	3 (8,1)	0 (0)
Recuento inferior de linfocitos CD4+ (células/ $\mu$ L) <sup>b</sup>	264 (99-370)	185 (100-276)	222 (169-361)
Carga viral superior (log10 copias/ $\mu$ L) <sup>b</sup>	4 (3,3-4,7)	4,2 (3-4,8)	4,2 (3,7-4,6)
Enfermedad definitiva de sida [n (%)]			
Tuberculosis	23 (65,7)	3 (33,3)	3 (60)
<i>Pneumocystis carinii pneumonia</i>	6 (17,1)	4 (44,5)	1 (20)
Toxoplasmosis	4 (11,5)	1 (11,1)	0 (0)
Otras <sup>e</sup>	2 (5,7)	1 (11,1)	1 (20)
Pacientes agrupados según categorías clínicas del CDC 1993 [n (%)]			
Categoría A	40 (29,2)	10 (27)	6 (54,5)
Categoría B	62 (45,3)	18 (48,7)	0 (0)
Categoría C	35 (25,5)	9 (24,3)	5 (45,5)
Pacientes agrupados según recuento de linfocitos CD4+ [n (%)]			
Estadio 1 ( $\geq 500$ células/ $\mu$ L)	17 (12,4)	3 (8,1)	1 (9,1)
Estadio 2 ( $200 \leq CD4 < 500$ cél./ $\mu$ L)	69 (50,4)	13 (35,1)	7 (63,6)
Estadio 3 ( $< 200$ células/ $\mu$ L)	51 (37,2)	21 (56,8)	3 (27,3)

<sup>a</sup> Otros diplotipos son:  $\Delta 19\_G/i19\_G$  (n=5, 2,7%),  $i19\_A/i19\_A$  (n=5, 2,7%) y  $i19\_G/i19\_A$  (n=1, 0,5%).

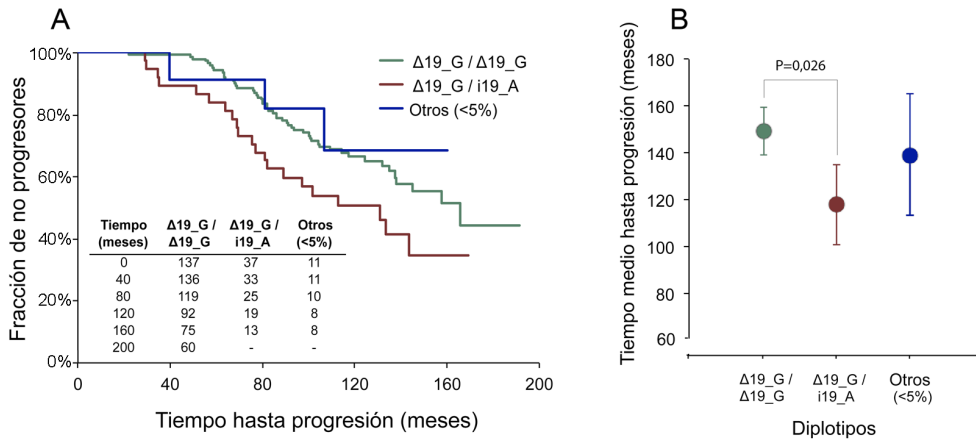
<sup>b</sup> Los datos se muestran como el valor de la mediana con los rangos intercuartiles entre paréntesis.

<sup>c</sup> Datos disponibles para n=175.

<sup>d</sup> Datos disponibles para n=135.

<sup>e</sup> Caquexia, encefalitis por VIH y neoplasia de cérvix.



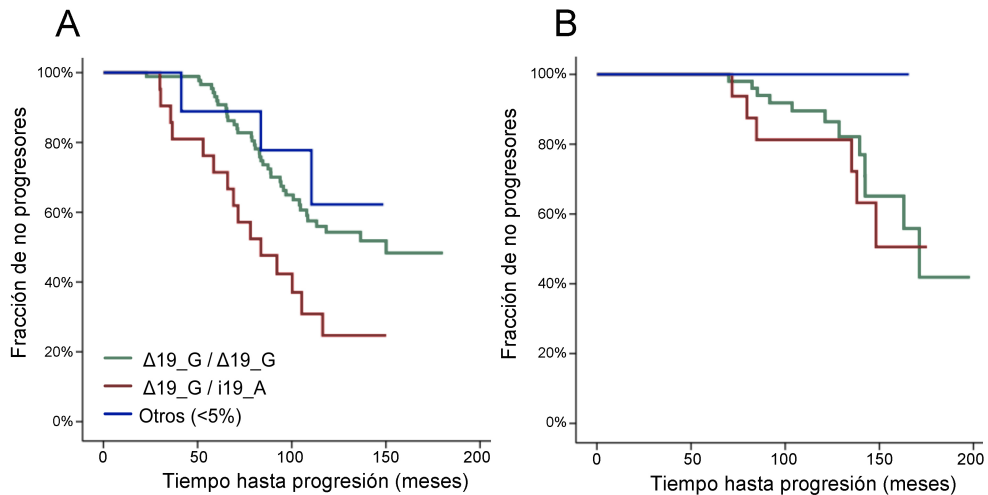


**Figura 35.** Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de los pacientes agrupados según el diplotipo formado por los polimorfismos rs3217318 y rs10415893. A) Fracción de individuos VIH+ que no han progresado durante el seguimiento. La tabla dentro de la figura indica el número de individuos de cada grupo en los tiempos de seguimiento seleccionados. B) Tiempo medio hasta la progresión (meses, IC $\pm$ 95%). Otros diplotipos son  $\Delta 19\_G/i19\_G$  (n=5; 2,7%),  $i19\_A/i19\_A$  (n=5; 2,7%),  $i19\_G/i19\_A$  (n=1; 0,5%). Criterio de progresión: primer descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200 $\mu$ L.

Cabe considerar que la evolución de la infección de los sujetos y su estado de progresor/no progresor podría variar en función del año de reclutamiento ya que los pacientes reclutados con anterioridad a 1997 fueron tratados con terapias de uno o dos fármacos, mientras que los pacientes reclutados a partir de 1997 tuvieron acceso a tratamientos con terapias combinadas de 3 fármacos (TARGA). Agrupando los pacientes según el año de reclutamiento anterior o posterior a 1997, se observa una mayor prevalencia de pacientes no progresores en el grupo reclutado entre los años 1997 y 1999 (pacientes no progresores reclutados entre 1983 y 1996 vs. reclutados entre 1997 y 1999; 54,5% vs. 45,4%;  $P=0,003$ ). Cabe considerar que el tratamiento antirretroviral TARGA recibido durante dicho periodo pueda ser el responsable de la mayor prevalencia de pacientes no progresores en dicho grupo, incorporando un sesgo en la selección de los pacientes que puede interferir en los resultados obtenidos. Asumiendo un posible papel del genotipo en el ritmo de progresión podemos considerar que dicho efecto sea mayor en el grupo de pacientes pre-TARGA y que éste queda diluido en el grupo de pacientes en tratamiento TARGA. Con el fin de evaluar esta hipótesis, se ha realizado un análisis de Kaplan-Meier estratificando la cohorte AVIP en pacientes reclutados entre 1983 y 1996 (n=117) y en el grupo de pacientes reclutados entre 1997 y 1999 (n=68).

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier del ritmo de progresión en función del diplotipo para los pacientes reclutados entre 1983 y 1996, revela una tasa de progresión significativamente más rápida para los pacientes con diplotipo  $\Delta 19\_G/i19\_A$  (90 meses, IC95%: 72-108) en comparación con los de diplotipo

$\Delta 19\_G/\Delta 19\_G$  (133 meses, IC95%: 122-144) (Log-Rank test  $P=0,005$ ) (Figura 36A). Sin embargo, no se observan diferencias en los ritmos de progresión para el grupo de pacientes reclutado entre 1997 y 1999 (Figura 36B). Para los pacientes reclutados entre 1983 y 1996, los riesgos proporcionales Cox para el genotipo  $\Delta 19\_G/i19\_A$  son significativamente más altos en comparación con los del genotipo  $\Delta 19\_G/\Delta 19\_G$ , tanto para el modelo no ajustado ( $HR_U=2,31$ ; IC95%: 1,27-4,2;  $P=0,006$ ) como para el modelo ajustado ( $HR_A=2,37$ ; IC95%: 1,29-4,4;  $P=0,005$ ).



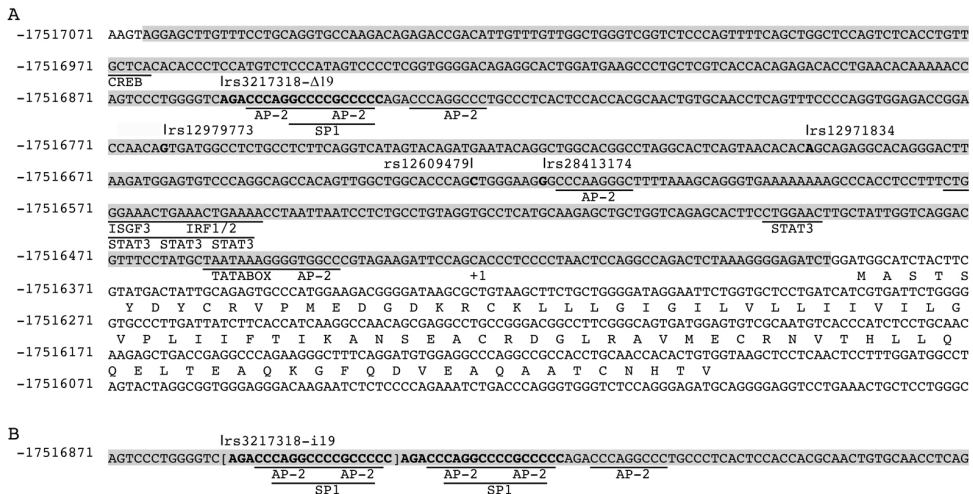
**Figura 36.** Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de los pacientes agrupados según el genotipo formado por los polimorfismos rs3217318 y rs10415893 según el año de reclutamiento. A) Gráfica de supervivencia de los pacientes reclutados entre 1983 y 1996. B) Gráfica de supervivencia de los pacientes reclutados entre 1997 y 1999. Otros genotipos son  $\Delta 19\_G/i19\_G$  ( $n=5$ ; 2,7%),  $i19\_A/i19\_A$  ( $n=5$ ; 2,7%),  $i19\_G/i19\_A$  ( $n=1$ ; 0,5%). Criterio de progresión: primer descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200 $\mu$ L.

## 1.4.- Estudio de expresión del promotor de *BST-2*

El polimorfismo rs3217318 se localiza en la región promotora de *BST-2*. El alelo inserción (*i19*) altera la secuencia de reconocimiento de factores de transcripción incorporando lugares de unión a los factores AP-2 y Sp1. La estructura de la región promotora definida por los alelos  $\Delta 19$  y *i19* se muestran en la Figura 37A y 36B, respectivamente. Mediante un ensayo de expresión de luciferasa se ha evaluado el efecto funcional de dichos alelos sobre la expresión mediada por el promotor.

Se han clonado y secuenciado 680 pb de la región promotora (Figura 37A, región sombreada en gris) de 8 individuos homocigotos para el haplotipo  $\Delta 19\_G$ , 2 individuos homocigotos para el haplotipo *i19\_G* y 6 individuos homocigotos para el haplotipo *i19\_A*. Las diferencias de secuencia de la región promotora de dichos

individuos se muestran en la Figura 38. Los fragmentos clonados de 680 pb procedentes de individuos con haplotipos *i19\_G* y *i19\_A* no muestran diferencias a nivel de secuencia. Por el contrario, la secuencia del haplotipo  $\Delta 19_G$  difiere de los otros dos haplotipos en 4 SNPs previamente descritos en la base de datos dbSNP (rs12979773, rs12971834, rs12609479, y rs28413174). Se confirma así el fuerte desequilibrio de ligamiento descrito para dicha región (Figura 38). Dada la coincidencia en la secuencia de la región promotora de los haplotipos derivados de los individuos homocigotos *i19\_G/i19\_G* y *i19\_A/i19\_A* sólo se ha considerado para el estudio de expresión la secuencia derivada de individuos homocigotos *i19\_A/i19\_A* (haplotipo *i19\_A*) y de los individuos homocigotos  $\Delta 19_G/\Delta 19_G$  (haplotipo  $\Delta 19_G$ ). Dichos haplotipos fueron clonados direccionalmente en el plásmido reportero P $\Delta$ CNV-LUC y se obtuvieron los plásmidos P- $\Delta$ 19-LUC y P-i19-LUC que fueron utilizados en la transfección transitoria de células U373.

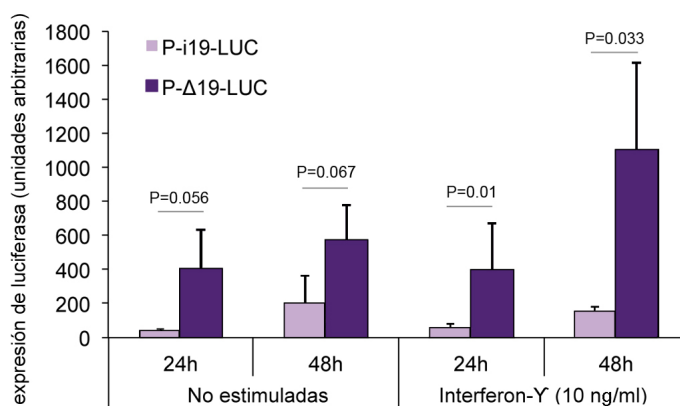


**Figura 37.** Región promotora de *BST-2* y localización de los polimorfismos analizados. A) Región promotora del gen *BST-2* que incluye los sitios de unión de factores de transcripción (descrito por Ohtomo et al. 1999). La región clonada de 680 pb se muestra sombreada. La localización de los polimorfismos se indica con una línea vertical junto al código rs correspondiente. La secuencia del polimorfismo inserción/delección rs3217318 (texto en negrita) está representada por el alelo  $\Delta 19$  (delección). B) Detalle de la secuencia adyacente al polimorfismo de inserción/delección rs3217318, cuyo alelo i19 (inserción) está representado entre corchetes. Se indica la duplicación de los sitios de unión de factores de transcripción que genera el alelo i19.

	5' (fragmento clonado de 680 pb)					Exón 4	Intrón 4	3'UTR							
posición	-411	-337	-262	-201	-193	1808	1938	4016							
código rs	rs3217318	rs12979773	rs12971834	rs12609479	rs28413174	rs1804402	rs71694748	rs10415893							
Haplotipo $\Delta 19\_G$	$\Delta 19$	-	A	-	G	-	T	-	G	//	G	//	353pbINS	//	G
Haplotipo $i19\_A$	$i19$	-	G	-	A	-	C	-	A	//	G	//	353pbINS	//	A
Haplotipo $i19\_G$	$i19$	-	G	-	A	-	C	-	A	//	G	//	353pbINS	//	G

**Figura 38.** Localización de los polimorfismos identificados en el *locus* *BST-2*. En la parte inferior de la figura se muestran las diferencias observadas en la secuencia de los individuos homocigotos para los haplotipos  $\Delta 19\_G$ ,  $i19\_A$  y  $i19\_G$ .

Las células U373 transfectadas se mantuvieron en cultivo durante 24 y 48 horas estimuladas o no con interferón- $\gamma$ . Los resultados muestran una sobreexpresión basal de la construcción de P- $\Delta 19$ -LUC, aunque no alcanza significación estadística con el umbral del 5% (P- $i19$ -LUC vs. P- $\Delta 19$ -LUC en 24h: 38,8 frente a 400,5,  $P=0,056$  y en 48 horas: 201,9 vs. 574,6,  $P=0,067$ , respectivamente) (Figura 39). En células inducidas por interferón- $\gamma$  las diferencias entre las construcciones P- $i19$ -LUC y P- $\Delta 19$ -LUC alcanzan significación estadística tanto a las 24 horas de cultivo (56,9 vs. 394,5;  $P=0,010$ ) como a las 48 horas (159,1 vs. 1100,6;  $P=0,033$ ). Además, tras 48 horas de estimulación se observa un incremento en la actividad luciferasa de la construcción P- $\Delta 19$ -LUC respecto a la condición basal, aunque sin alcanzar significación estadística (basal vs. estimulado a las 48h: 574,6 vs. 1100,6;  $P=0,174$ ). Sin embargo, tras 48 horas de estimulación no se observa incremento en la actividad luciferasa de la construcción P- $i19$ -LUC (basal vs. estimulado a las 48h: 201,9 vs. 159,1;  $P=0,67$ ).



**Figura 39.** Ensayo de luciferasa. Actividad luciferasa media ( $\pm$ desviación estándar) normalizada por  $\beta$ -galactosidasa y contenido de proteínas en células U373 transfectadas transitoriamente con los plásmidos reporteros P- $i19$ -LUC o P- $\Delta 19$ -LUC, a 24 y 48 horas de cultivo, no estimuladas o estimuladas con interferón- $\gamma$ .

## 1.5.- Discusión

Se han identificado factores genéticos del huésped que afectan a la susceptibilidad a la infección, así como factores que modulan el ritmo de progresión de la infección (Kaslow et al. 2005). Entre éstos, se han descrito factores celulares de restricción que interfieren con el ciclo vital del virus VIH-1. Entre ellos, los factores de restricción celular APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$  y el recientemente descrito BST-2, han sido ampliamente estudiados (Wolf and Goff 2008). Existen datos experimentales y estudios de asociación de variantes de los genes *APOBEC3G*, *TRIM5 $\alpha$*  que corroboran el papel de dichos genes en la susceptibilidad a la infección y en la progresión clínica. Sin embargo, las sólidas evidencias experimentales que apoyan el papel de BST-2 como factor de restricción del VIH-1 no se han complementado con estudios de asociación genética.

El análisis presentado en este apartado pretende evaluar el papel de la variabilidad del *locus* *BST-2* en la susceptibilidad a la infección por VIH-1 y en el ritmo de progresión de la enfermedad. Para ello se ha evaluado la prevalencia de variantes de *BST-2* en tres cohortes: sujetos control, pacientes VIH+ (cohorte AVIP) e individuos expuestos no infectados (cohorte ENI) previamente descritas en (Barber et al. 2001; Nieto et al. 2004; Sanchez et al. 2008). De las 4 variantes analizadas, sólo dos han resultado ser polimórficas: rs10415893 y rs3217318. Se ha utilizado como criterio de progresión el descenso en el recuento de linfocitos CD4+ por debajo de 200 células/ $\mu$ L. Este criterio forma parte de los requisitos de progresión considerados en CDC 1993 y puede ser considerado como una estimación de la competencia inmunológica del paciente.

Se ha detectado asociación con progresión para el *tagSNP* rs10415893, localizado en la región 3'UTR del gen *BST-2*. El alelo *rs10415893-A* y el genotipo heterocigoto *rs10415893-G/A* se asocian con una peor progresión tal y como refleja su menor prevalencia en los sujetos no progresores respecto a los progresores y controles sanos. Además, el análisis de supervivencia indica una progresión más rápida de los pacientes heterocigotos *rs10415893-G/A*. Asimismo se ha estudiado el polimorfismo rs3217318, situado en la región promotora de *BST-2*, y que presenta un fuerte desequilibrio de ligamiento con el *tagSNP* previamente comentado. La inserción de 19 pb que conlleva el alelo *rs3217318-i19*, incrementa el número de lugares de unión de los factores de transcripción AP-2 y Sp1. Estudios de expresión de la región promotora de *BST-2* en un ensayo de luciferasa, indican que existen diferencias significativas entre la expresión derivada de construcciones obtenidas a partir de ambos alelos. Por todo ello, el polimorfismo rs3217318 puede ser considerado un potencial polimorfismo causativo cuyo efecto es capturado por el *tagSNP* rs10415893. No obstante, el

análisis realizado con el polimorfismo rs3217318 no muestra asociación para el alelo *rs3217318-i19* mientras que se observa una asociación marginal con progresión para el genotipo heterocigoto *rs3217318-Δ19/i19*. El análisis de diplotipos incluyendo rs10415893 y rs3217318, nos permite detectar una asociación marginal con la infección para el haplotipo *i19\_A* y una asociación significativa con progresión más rápida para los pacientes portadores del diplotipo *Δ19\_G/i19\_A*. Estos resultados indican que, a pesar del efecto funcional observado para el polimorfismo rs3217318, éste no explica en su totalidad la asociación detectada mediante el *tagSNP* rs10415893, por lo que cabe esperar que en el bloque de ligamiento capturado por dicho *tagSNP* existan variaciones no identificadas que contribuyan a la asociación descrita.

La asociación con progresión alcanza mayor significación estadística en el grupo de pacientes reclutados en el periodo 1983-1996 (periodo de tratamiento pre-TARGA), mientras que dicha asociación pierde significación en el grupo de pacientes reclutados en el periodo 1997-1999 (TARGA). Según estos resultados, el efecto del genotipo podría haber quedado diluido en el periodo TARGA por la eficacia del tratamiento antirretroviral, mientras que dicho efecto se habría podido manifestar en el periodo pre-TARGA, confiriendo a los pacientes un ritmo de progresión diferencial según el genotipo.

La aplicación de la corrección por multiple testing determina un umbral de significación de  $P=0,025$  según Bonferroni y de  $P=0,043$  según el método de descomposición espectral de SNPs. Atendiendo al método más restrictivo las asociaciones descritas para el *tagSNP* y el diplotipo *Δ19\_G/i19\_A* se mantienen significativas.

Tal como refleja el ensayo de luciferasa, el haplotipo que contiene el alelo *rs3217318-i19* presenta menores niveles de expresión y de respuesta al estímulo con interferón- $\gamma$ . Este resultado sugiere que los individuos portadores del alelo *rs3217318-i19* podrían presentar menores niveles de proteína BST-2, así como una respuesta a estímulo comprometida. Dado que BST-2 inhibe la liberación de partículas virales de las células infectadas al retenerlas en la superficie celular, la disminución de los niveles de BST-2 podría implicar una menor capacidad para retener dichas partículas. De acuerdo con los resultados obtenidos, los pacientes VIH+ portadores del diplotipo heterocigoto *Δ19\_G/i19\_A* muestran una progresión más rápida, lo que indica que la heterocigosis para el haplotipo *i19\_A* podría ser un factor de riesgo para una progresión más rápida. Según estos resultados, la progresión a sida mediada por variantes del gen *BST-2* se ajusta a un modelo genético de sobredominancia, según el cual el fenotipo de los heterocigotos es más acusado que el de los homocigotos correspondientes. Los sistemas genéticos que se ajustan a un modelo de sobredominancia suelen referirse a variantes de la secuencia codificante que afectan a la estructura de la

proteína. No obstante, variantes de la región reguladora de un gen, que influyen en la cantidad de proteína, también pueden seguir un modelo genético de sobredominancia (Rockman and Wray 2002). Ejemplo de ello es la expresión de determinados alelos con especificidad de tejido. Así, en individuos heterocigotos para el *locus HLA-DQB1* (\*0301/\*0302), la expresión en células cutáneas primarias del alelo \*0301 es mayor que la observada para el alelo \*0302, mientras que la expresión en células mononucleares y linfocitos B de sangre periférica se invierte y es el alelo \*0302 el que muestra una mayor expresión (Beatty et al. 1999). Según este modelo, la expresión del *locus HLA-DQB1* sigue un modelo de sobredominancia, según el cual los heterocigotos \*0301/\*0302 manifiestan una expresión de *HLA-DQB1* en todos los tejidos mientras que en homocigotos la expresión está restringida al tejido en el cual se expresa el alelo correspondiente. Por otra parte, no se puede excluir que el modelo de sobredominancia negativa asignado a la combinación haplotípica  $\Delta 19\_G/i19\_A$  pueda ser consecuencia de una variación en la región codificante, no identificada en este estudio, que haya sido capturada por dicho haplotipo dado el elevado desequilibrio de ligamiento de la región.

Estudios sobre el antagonismo de BST-2 por lentivirus de primates han conducido a la hipótesis de que BST-2 proporciona una barrera a la transmisión del VIH-1 (y el VIH-2) de otras especies a los seres humanos. Esto, junto con la aparente falta de una actividad que contrarreste BST-2 en los virus del grupo 0 (cepas no pandémicas), ha llevado a determinados investigadores a considerar que el papel de BST-2 puede estar más relacionado con la inhibición de la transmisión que con la progresión de la enfermedad en los pacientes infectados (Sauter et al. 2009). Sin embargo, nuestros resultados apuntan hacia la conclusión opuesta, según la cual las variantes de *locus BST-2* están asociadas con el ritmo de progresión de la infección por VIH-1 sin modificar la susceptibilidad.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran asociación de los polimorfismos rs10415893 y rs3217318 del gen *BST-2* con el ritmo de progresión de la infección por VIH-1 en una cohorte de pacientes ADVP. Dichos resultados complementan los estudios experimentales sobre el papel de BST-2 en la infección por VIH-1. Estos resultados son la primera evidencia de asociación genética de variantes del gen *BST-2* con progresión en la infección por VIH-1 y deben ser considerados como una primera aproximación al estudio de variaciones de *BST-2* en la infección, que requieren ser replicados en otras cohortes ADVP y otros grupos de riesgo. Asimismo, se debe ampliar la búsqueda e identificación de variaciones funcionales en la región marcada por el *tagSNP* que contribuyan a explicar la asociación descrita.

## 2.- VARIABILIDAD DE GENES DE LA RUTA DE LA VITAMINA D Y RITMO DE PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN

En el estudio del papel de la variabilidad de genes de la ruta metabólica de la vitamina D en el ritmo de la infección por VIH-1 se ha evaluado la distribución de variantes polimórficas de 3 genes de la ruta en la cohorte de pacientes AVIP agrupados según su estado de progresión, utilizando como criterio el “descenso en el recuento de linfocitos CD4+ por debajo de 200 células/ $\mu$ L”. De acuerdo a dicho criterio los pacientes se han clasificado como progresores (n=75) y no progresores (n=110). Los genes seleccionados en el estudio han sido: el gen del receptor de la vitamina D (*VDR*), el gen que codifica la enzima encargada de la hidroxilación de la hormona (*CYP27B1*), paso limitante de su síntesis, y el gen de la proteína transportadora de vitamina D (*GC*). Los polimorfismos analizados en cada gen se enumeran en la Tabla 9. En el gen *VDR* se han seleccionado 5 polimorfismos que capturan la variabilidad de la región 5’UTR, codificante y 3’UTR. Para el *locus CYP27B1* se han seleccionado 3 polimorfismos en alto desequilibrio de ligamiento que capturan la variabilidad del gen. Para el gen *GC* se han seleccionado 2 polimorfismos no sinónimos. Todos los polimorfismos seleccionados han sido descritos en la literatura y sus efectos funcionales y características más significativas se han detallado en la introducción de esta tesis.

Tabla 9. Genes de la ruta fisiológica de la vitamina D y polimorfismos analizados.

<i>VDR</i>		<i>CYP27B1</i>		<i>GC</i>	
Código rs (alias)	Alelos <sup>a</sup>	Código rs	Alelos <sup>a</sup>	Código rs (alias)	Alelos <sup>a</sup>
rs11568820 ( <i>Cdx2</i> )	G>A	rs4646536	T>C	rs7041 ( <i>Glu416Asp</i> )	T>G
rs4516035 ( <i>A1012G</i> )	A>G	rs3782130	G>C	rs4588 ( <i>Thr420Lys</i> )	C>A
rs2228570 ( <i>FokI</i> )	C>T	rs10877012	G>T		
rs1544410 ( <i>BsmI</i> )	G>A				
rs17878969 ( <i>PolyA</i> )	L>S				

<sup>a</sup> Alelo más frecuente (común) > alelo menos frecuente (raro).



## 2.1.- Distribución de alelos y genotipos en los pacientes agrupados según el estado de progresión

Se han genotipado todos los pacientes de la cohorte y se han determinado las frecuencias alélicas y genotípicas mediante recuento. La distribución genotípica de los marcadores analizados se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg excepto para los polimorfismos *PolyA* y *A1012G*.

Tabla 10. Distribución de frecuencias alélicas de los polimorfismos de genes de la ruta fisiológica de la vitamina D en pacientes agrupados según criterio de progresión.

Marcador rs ( <i>alias</i> )	Alelo raro <sup>a</sup> n (%)		Asociación detectada OR; (IC95%) P valor
	Progresores n=75	No progresores n=110	
<b>VDR</b>			
rs11568820 ( <i>Cdx2</i> )	32 (21,3)	45 (20,5)	ns
rs4516035 ( <i>A1012G</i> )	55 (40)	101 (49)	ns
rs2228570 ( <i>Fok I</i> )	57 (38)	73 (33,2)	ns
rs1544410 ( <i>Bsm I</i> )	69 (46)	81 (36,8)	ns
rs17878969 ( <i>PolyA</i> )	82 (54,6)	89 (40,5)	1,8; (1,2-2,7) P=0,007
<b>CYP27B1</b>			
rs4646536	41 (27,3)	57 (25,9)	ns
rs3782130	38 (25,3)	51 (23,2)	ns
rs10877012	38 (28,4)	54 (24,8)	ns
<b>GC</b>			
rs7041 ( <i>Glu416Asp</i> )	69 (46)	106 (48,1)	ns
rs4588 ( <i>Thr420Lys</i> )	41 (27,3)	63 (28,6)	ns

<sup>a</sup> Véase Tabla 9 para la codificación de alelos.

Criterio de progresión: descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200/μL.

Número de individuos de los que falta genotipo: *A1012G*, 7 progresores y 7 no progresores y *rs10877012*, 1 progresor y 1 no progresor.

Se han comparado las frecuencias genotípicas y alélicas entre progresores y no progresores. La distribución global de alelos muestra diferencias estadísticamente significativas para el polimorfismo *PolyA* cuando se comparan los individuos no progresores con los progresores (OR=1,8; IC95%: 1,2-2,7; P=0,007) (Tabla 10). La distribución global de genotipos muestra diferencias significativas para los polimorfismos *PolyA* y *BsmI* (P=0,014 y P=0,017; respectivamente). Los heterocigotos *FokI-G/A* están sobrerrepresentados en los progresores y muestran asociación bajo un modelo sobredominante (OR=2; IC95%: 1,08-3,6; P=0,025). Además, los homocigotos *A1012G-G/G* se encuentran en menor prevalencia en los individuos progresores siguiendo un modelo recesivo (OR=0,45; IC95%: 0,2-0,96; P=0,038). Tanto los homocigotos *BsmI-A/A* como los *PolyA-S/S* se encuentran sobrerrepresentados en progresores y muestran asociación bajo un modelo recesivo (OR=3; IC95%: 1,34-6,7; P=0,0054 y OR=2,7; IC95%: 1,36-5,3; P=0,003, respectivamente) (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de frecuencias genotípicas de los polimorfismos de genes de la ruta fisiológica de la vitamina D en pacientes agrupados según criterio de progresión.

Marcador Código rs ( <i>alias</i> )	Distribución de genotipos						Modelo asociado con progresión	
	Progresores n=75			No progresores n=110			OR (IC95%) P valor	
	homocigoto alelo común	heterocigoto	homocigoto alelo raro	homocigoto alelo común	heterocigoto	homocigoto alelo raro	Recesivo	Sobredominante
<b>VDR</b>								
rs11568820 ( <i>Cdx2</i> )	47 (62,7)	24 (32)	4 (5,3)	70 (63,6)	35 (31,8)	5 (4,5)	ns	ns
rs4516035 ( <i>AI012G</i> )	24 (36)	33 (48)	11 (16)	33 (31,8)	39 (38,2)	31 (30)	0,45 (0,2-0,96) P=0,038	ns
rs2228570 ( <i>FokI</i> )	27 (36)	39 (52)	9 (12)	54 (49,1)	39 (35,5)	17 (15,5)	ns	2,0 (1,08-3,6) P=0,025
rs1544410 ( <i>BsmI</i> )	26 (34,6)	29 (38,7)	20 (26,7)	41 (37,3)	57 (51,8)	12 (10,9)	3,0 (1,34-6,7) P=0,0054	ns
rs17878969 ( <i>PolyA</i> )	21 (28)	26 (34,7)	28 (37,3)	41 (37,3)	49 (44,5)	20 (18,2)	2,7 (1,36-5,3) P=0,003	ns
<b>CYP27B1</b>								
rs4646536	41 (54,7)	27 (36)	7 (9,3)	59 (53,6)	45 (40,9)	6 (5,5)	ns	ns
rs3782130	42 (56)	28 (37,3)	5 (6,7)	65 (59,1)	39 (35,4)	6 (5,5)	ns	ns
rs10877012	42 (56,8)	27 (36,5)	5 (6,8)	61 (56)	42 (38,5)	6 (5,5)	ns	ns
<b>GC</b>								
rs7041 ( <i>Glu416Asp</i> )	21 (28)	39 (52)	15 (20)	29 (26,4)	56 (50,9)	25 (22,7)	ns	ns
rs4588 ( <i>Thr420Lys</i> )	42 (56)	25 (33,3)	8 (10,7)	57 (51,8)	43 (39,1)	10 (9,1)	ns	ns

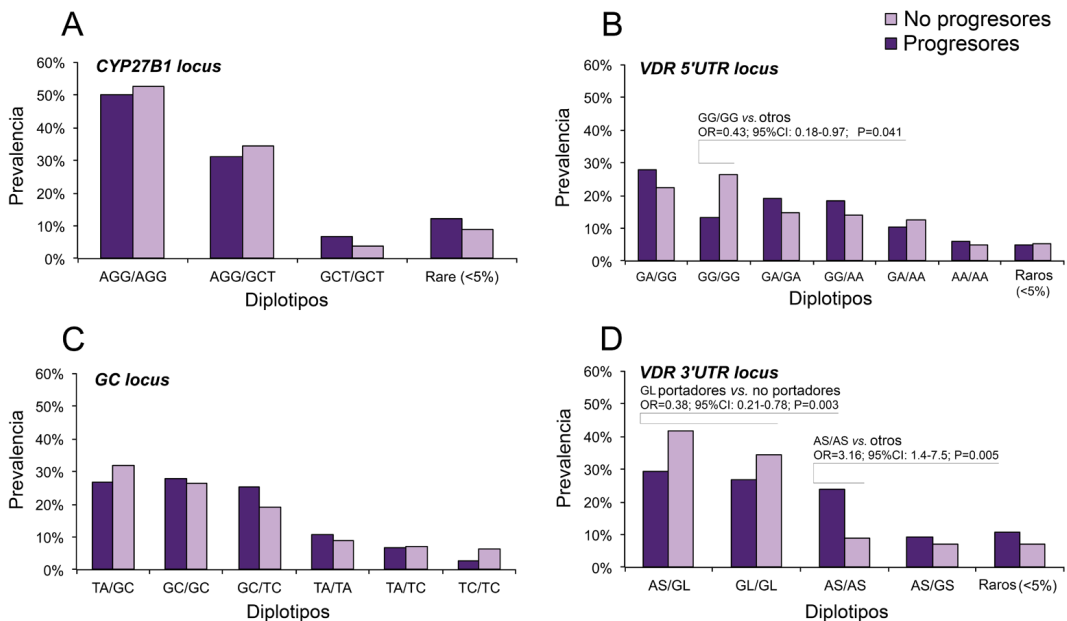
<sup>a</sup>Véase Tabla 9 para la codificación de alelos.

Criterio de progresión: descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200/ $\mu$ L.

Número de individuos de los que falta genotipo: *AI012G*, 7 progresores y 7 no progresores y *rs10877012*, 1 progresor y 1 no progresor.

## 2.2.- Distribución de haplotipos y diplotipos en los pacientes agrupados según el estado de progresión

A partir de los genotipos obtenidos se han inferido las frecuencias haplotípicas en los genes *VDR*, *CYP27B1* y *GC* mediante el programa pLink. Se observa un fuerte desequilibrio de ligamiento en los genes *CYP27B1* y *GC* que coincide con el patrón obtenido a partir de los datos disponibles de la población CEU en HapMap. Asimismo se observa un patrón fragmentado de desequilibrio de ligamiento en el locus *VDR* que concuerda con los datos disponibles para poblaciones caucásicas (Fang et al. 2005). Así, se observa una estructura de bloque ( $D' > 0,8$ ) para los marcadores *Cdx2* y *A1012G* en la región 5'UTR y para los marcadores *BsmI* y *PolyA* en la región 3'UTR. De acuerdo con dicho patrón de desequilibrio de ligamiento, los haplotipos para el locus *VDR* se han inferido de forma independiente para la región de 5' y 3'UTR.



**Figura 40.** Prevalencia de los diplotipos de los genes *CYP27B1*, *GC* y *VDR* en los pacientes agrupados según el criterio de progresión. A) Prevalencia de los diplotipos del locus *CYP27B1*. B) Prevalencia de los diplotipos de 5'UTR del locus *VDR*. C) Prevalencia de los diplotipos del locus *GC*. D) Prevalencia de los diplotipos de 3'UTR del locus *VDR*. Criterio de progresión: primer descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200 $\mu$ L.

La distribución global de haplotipos de los genes *GC*, *CYP27B1* y de la región 5'UTR del gen *VDR*, no muestran asociación con progresión. Sin embargo, se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos de la región 3'UTR del gen *VDR* (*BsmI*-*PolyA*) entre progresores y no progresores ( $P=0,045$ ). El test específico de haplotipo revela que el haplotipo *BsmI*-*G*-*PolyA*-*L* (*GL*) de 3'UTR presenta una menor prevalencia en los individuos progresores

(43,3% vs. 57,3%; OR=0,6; IC95%: 0,37-0,87; P=0,008). Asimismo, la distribución de diplotipos de la región 5'UTR revela una menor prevalencia del haplotipo *Cdx2-G\_A1012G-G (GG)* en homocigosis en progresores (13,2% vs. 26,2%; OR=0,43; IC95%: 0,18-0,97; P=0,041). Además, la distribución de diplotipos de la región 3'UTR revela una menor prevalencia en progresores de los portadores (homocigotos + heterocigotos) del haplotipo *GL* (26,7% vs. 34,5%; OR=0,38; IC95%: 0,21-0,78; P=0,003), así como una mayor prevalencia en progresores del haplotipo *BsmI-A\_PolyA-S (AS)* en homocigosis (24% vs. 9,1%; OR=3,16; IC95%: 1,4-7,5; P=0,005) (Figura 40).

### 2.3.- Ritmo de progresión de la infección y riesgo genético acumulado para el *locus VDR*

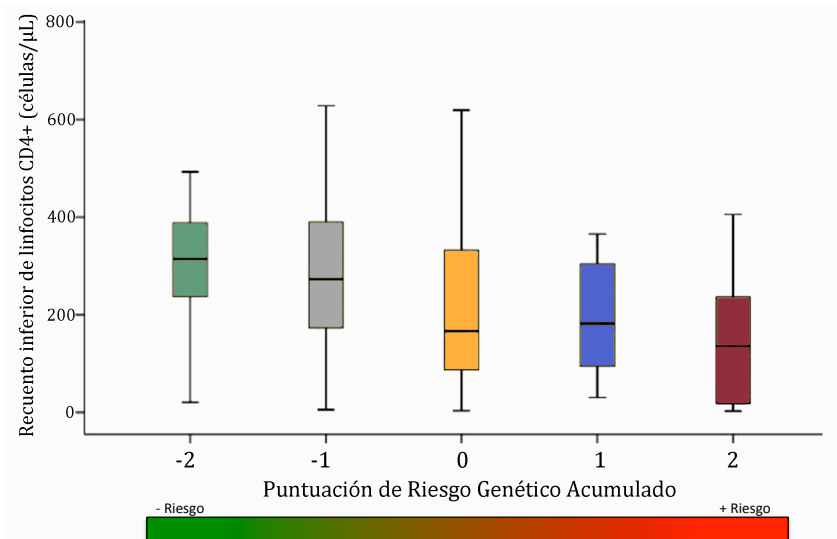
A partir de los resultados obtenidos en el análisis de genotipos y diplotipos del *locus VDR*, podemos considerar como factores de riesgo, el genotipo *FokI-C/T*, bajo un modelo sobredominante y el haplotipo *AS*, bajo un modelo recesivo. Asimismo, podemos considerar factor de protección el haplotipo *GL*, bajo un modelo dominante y haplotipo *GG*, bajo un modelo recesivo. Según este esquema, se ha estimado una puntuación de riesgo genético acumulado (RGA) para cada individuo, asignando una puntuación de +1 a los genotipos/diplotipos de riesgo y una puntuación de -1 a los genotipos/diplotipos de protección (Tabla 12). Cualquier otra combinación genotipo/diplotipo ha sido considerada como neutra y se le ha asignado una puntuación 0. Atendiendo a dicho esquema, se ha calculado la puntuación RGA de cada paciente.

Tabla 12. Esquema de la asignación de puntuaciones de riesgo/protección a cada genotipo/diplotipo del *locus VDR*.

Polimorfismo	Genotipo/diplotipo	Modelo	Riesgo/protección	Puntuación asignada
<b><i>FokI</i></b>	<b>Genotipo C/T</b>	<b>sobredominante</b>	<b>Riesgo</b>	<b>+1</b>
<b><i>BsmI_PolyA</i></b>	<b>Diplotipo AS/AS</b>	<b>recesivo</b>	<b>Riesgo</b>	<b>+1</b>
<b><i>BsmI_PolyA</i></b>	<b>Diplotipo GL/_</b>	<b>dominante</b>	<b>Protección</b>	<b>-1</b>
<b><i>Cdx2_A1012G</i></b>	<b>Diplotipo GG/GG</b>	<b>recesivo</b>	<b>Protección</b>	<b>-1</b>

La Tabla 13 resume las principales características de los pacientes de la cohorte AVIP agrupados según la puntuación RGA. Se observan diferencias significativas entre categorías RGA para las variables tiempo de seguimiento (P=0,017), estadios CD4+ (P=0,006) y recuento inferior de linfocitos CD4+ (P=0,004). La mediana del tiempo de seguimiento es menor en aquellos pacientes con puntuación de RGA de 0 en comparación con aquellos pacientes con puntuación RGA de -1 y -2 (Kruskal-Wallis P=0,018 y P=0,009; respectivamente). Dichos valores no representan un

sesgo en el estudio ya que los menores tiempos de seguimiento corresponden a los pacientes con puntuaciones RGA más elevadas, es decir, a los grupos de pacientes con mayor prevalencia de progresores. El valor del recuento inferior de linfocitos CD4+ es significativamente menor en aquellos pacientes que presentan una puntuación de RGA de 2 en comparación con pacientes con puntuación RGA de -1 y -2 (Kruskal-Wallis  $P=0,02$  y  $P=0,019$ , respectivamente) (Figura 41).



**Figura 41.** Recuento inferior de linfocitos CD4+. Medianas de los recuentos inferiores de linfocitos CD4+ en los pacientes agrupados según su puntuación de Riesgo Genético Acumulado.

La distribución de grupos de progresión en cada categoría se muestra en la Figura 42A. Se observa una menor prevalencia de progresores en las categorías RGA con puntuación -2; (-2 vs. el resto de categorías OR=0,33; IC95%: 0,11-1,03;  $P=0,048$ ) y -1 (-1 vs. el resto de categorías; OR=0,38; IC95%: 0,2-0,7;  $P=0,003$ ). Asimismo, se observa una mayor prevalencia de progresores en las categorías RGA con puntuación 0, 1 y 2, alcanzando una fuerte significación estadística al comparar las categorías con  $RGA \geq 0$  con las categorías con  $RGA < 0$  (OR=3,6; IC95%: 1,9-6,7;  $P=4 \times 10^{-5}$ ). La prevalencia relativa de progresores muestra un incremento progresivo con las puntuaciones RGA (Figura 42B).

Tabla 13. Características clínicas y epidemiológicas de los individuos agrupados según la puntuación genotípica acumulada para el VDR.

Características	Puntuación de Riesgo Genético Acumulado (RGA) <sup>a</sup>					
	RGA -2	RGA -1	RGA 0	RGA 1	RGA 2	
Sujetos [n (%)]	20 (10,8)	73 (39,5)	57 (30,8)	21 (11,4)	14 (7,6)	
Hombres/Mujeres [n]	13/7	55/18	41/16	17/4	12/2	
Edad en el primer test VIH positivo(años) <sup>b</sup>	25 (20-27)	24 (21-26)	24 (21-28)	22 (20-29)	28 (23-30)	
Tiempo de seguimiento (meses) <sup>b</sup>	139 (124-147)	129 (111-149)	121 (100-129)	141 (104-151)	124 (104-129)	
Pacientes en tratamiento antirretroviral [n (%)]	16 (80)	58 (79,5)	48 (84,2)	19 (90,5)	11 (78,6)	
Pacientes VHC positivos [n (%)] <sup>c</sup>	18 (100)	64 (97)	55 (96,5)	20 (100)	13 (92,9)	
<i>Exitus</i> [n (%)]	0 (0)	2 (2,7)	3 (5,3)	1 (4,8)	0 (0)	
Recuento inferior de linfocitos CD4+ (células/ $\mu$ L) <sup>b</sup>	315 (237-3388)	273 (174-390)	167 (88-333)	182 (95-304)	136 (19-236)	
Carga viral superior (log10 copias/ $\mu$ L) <sup>b,d</sup>	4,4 (3-4,6)	3,8 (3,3-4,6)	4,4 (3,4-5)	4,2 (3-4,7)	3,8 (3-4,8)	
Enfermedad definitiva de sida [n (%)]						
Tuberculosis	0 (0)	14 (63,6)	9 (56,3)	4 (57,1)	2 (50)	
<i>Pneumocystis carinii pneumonia</i>	0 (0)	4 (18,2)	4 (25)	1 (14,3)	2 (50)	
Toxoplasmosis	0 (0)	3 (13,6)	2 (12,5)	0 (0)	0 (0)	
Otras <sup>e</sup>	0 (0)	1 (4,5)	1 (6,3)	0 (0)	0 (0)	
Pacientes agrupados según categorías clínicas del CDC 1993 [n (%)]						
Categoría A	8 (40)	23 (31,5)	16 (28,1)	4 (19)	5 (35,7)	
Categoría B	12 (60)	28 (38,4)	25 (43,9)	10 (47,6)	5 (35,7)	
Categoría C	0 (0)	22 (30,1)	16 (28,1)	7 (33,3)	4 (28,6)	
Pacientes agrupados según recuento de linfocitos CD4+ [n (%)]						
Estadio 1 ( $\geq$ 500 células/ $\mu$ L)	1 (5)	13 (17,8)	4 (7)	2 (9,5)	1 (7,1)	
Estadio 2 (200 $\leq$ CD4 < 500 células/ $\mu$ L)	15 (75)	40 (54,8)	23 (40,4)	7 (33,3)	4 (28,6)	
Estadio 3 (< 200 células/ $\mu$ L)	4 (20)	20 (27,4)	30 (52,6)	12 (57,1)	9 (64,3)	

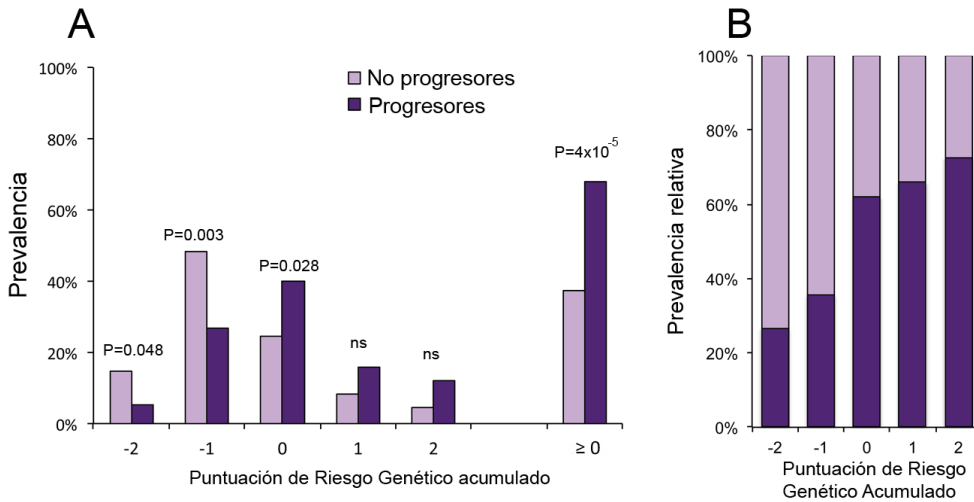
<sup>a</sup> Puntuación de riesgo genético acumulado: suma de las puntuaciones asignadas a cada individuo de acuerdo con su genotipo/haplotipo de riesgo/protección del gen VDR. La asignación de puntuaciones se ha establecido de acuerdo al siguiente esquema: homocigotos *Cdx2-G\_A1012G-G* y portadores del haplotipo *BsmI-G\_PolyA-L* puntuación -1; heterocigotos *FokI-C/T* y homocigotos *BsmI-A\_PolyA-S* puntuación +1, otras combinaciones puntuación 0.

<sup>b</sup> Los datos se muestran como el valor de la mediana con los rangos intercuartiles entre paréntesis.

<sup>c</sup> Datos disponibles para n=175.

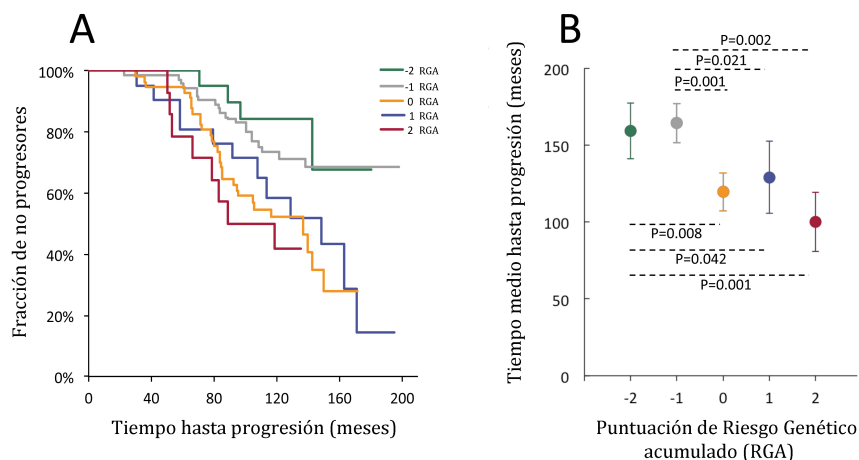
<sup>d</sup> Datos disponibles para n=135.

<sup>e</sup> Caquexia, encefalitis por VIH y neoplasia de cérvix.



**Figura 42.** Distribución de progresores y no progresores en los grupos de Riesgo Genético Acumulado para el locus *VDR*. Prevalencia absoluta (A) y prevalencia relativa (B). Criterio de progresión: primer descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200 $\mu$ L.

La Figura 43 muestra el ritmo de progresión asignado a cada categoría de puntuación RGA mediante un análisis de supervivencia Kaplan-Meier (Figura 43A) y los tiempos medios de progresión asignados a cada categoría (Figura 43B). Los valores más altos de tiempo medio de progresión se observan en los pacientes con puntuación RGA -2 (159 meses, IC95%: 141-177) y -1 (164 meses, IC95%: 152-177), mientras que dichos valores son más bajos en aquellos pacientes con puntuación RGA 0 (120 meses, IC95%: 107-132), 1 (129 meses, IC95%: 106-152) y 2 (100 meses, IC95%: 81-119). Las máximas diferencias se observan entre los pacientes con puntuaciones RGA extremas (categoría -2 vs. categoría 2; Log-Rank test P=0,001) (Figura 43B). Asimismo, los riesgos proporcionales Cox, bajo el modelo no ajustado, son significativamente más bajos en los pacientes con puntuación RGA -2 que en los pacientes con puntuación RGA 0 ( $HR_U=3,8$ ; IC95%: 1,3-10,8; P=0,012), 1 ( $HR_U=3,4$ ; IC95%: 1-10,5; P= 0,035) o 2 ( $HR_U=5,7$ ; IC95%: 1,7-18,5; P=0,004). Dichas diferencias se mantienen después de ajustar por sexo, edad en el primer test VIH+ y genotipo para el polimorfismo *CCR5Δ32* en las tres comparaciones realizadas ( $HR_A= 3,89$ ; IC95%: 1,37-11,11; P=0,011;  $HR_A=3,56$ ; IC95%: 1,14-11,12; P=0,029 y  $HR_A =5,36$ ; IC95%: 1,63-17,57; P=0,006).



**Figura 43.** Análisis de supervivencia Kaplan-Meier para los pacientes agrupados según el grupo de Riesgo Genético Acumulado del *locus VDR*. A) Curvas de supervivencia de los pacientes agrupados según su puntuación de Riesgo Genético Acumulado. B) Tiempo medio de progresión de los pacientes agrupados según su puntuación de Riesgo Genético Acumulado. Criterio de progresión: primer descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200 $\mu$ L.

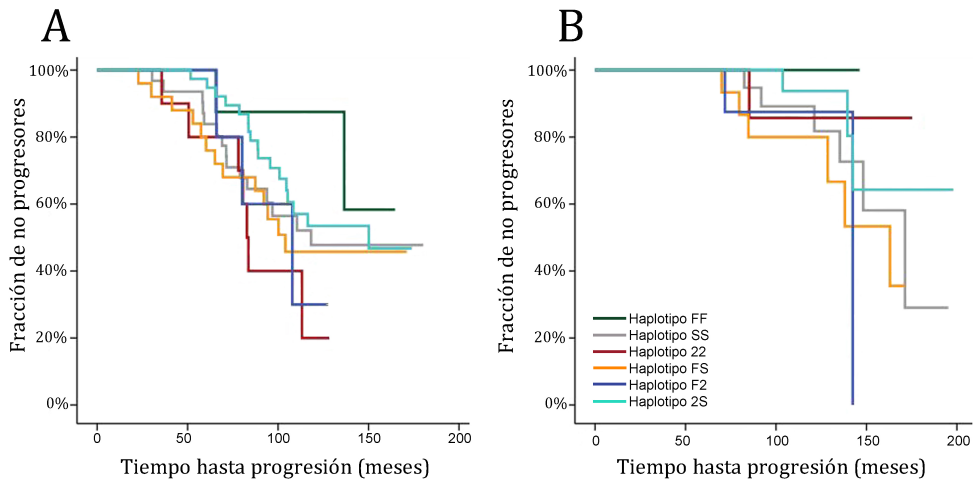
## 2.4.- Ritmo de progresión de la infección en pacientes agrupados según periodo de reclutamiento

Cabe considerar que la evolución de la infección de los sujetos y su estado de progresor/no progresor pueda variar en función de las terapias antirretrovirales administradas a cada paciente que en nuestro caso pueden estar condicionados por el año de reclutamiento. Asumiendo el posible papel del fondo genético en el ritmo de progresión, podemos considerar que dicho efecto sea mayor en el grupo de pacientes pre-TARGA y éste pueda verse diluido en el grupo de pacientes en tratamiento TARGA. Con el fin de evaluar esta hipótesis, se ha realizado un análisis de Kaplan-Meier estratificando la cohorte AVIP en dos grupos, pacientes reclutados entre 1983 y 1996 (n=117) y pacientes reclutados entre 1997 y 1999 (n=68).

El análisis de Kaplan-Meier en función de los diplotipos del *locus GC* para los pacientes reclutados entre 1983 y 1996, revela que el tiempo medio de progresión en los pacientes con diplotipo 2/2 (89,5 meses, IC95%: 70,8-108,1) es significativamente inferior al de los pacientes con diplotipo F/F (144 meses, IC95%: 119,7-168,4) (Log-Rank test P=0,018) (Figura 44A). Asimismo, los riesgos proporcionales Cox, bajo el modelo no ajustado, son significativamente más altos en los pacientes con diplotipo 2/2 que en los pacientes con diplotipo F/F (HRu= 5,26; IC95%: 1,08-25,5; P=0,039). Dichas diferencias se mantienen después de ajustar por sexo, edad en el primer test VIH+ y genotipo para el polimorfismo *CCR5Δ32* (HR<sub>A</sub> =5; IC95%: 1-24,3; P=0,046). Sin embargo, en el grupo de pacientes



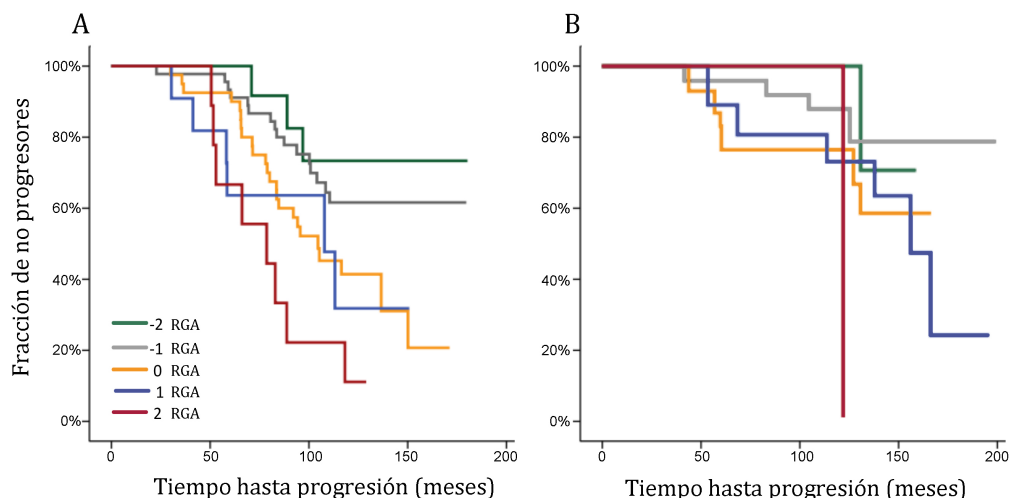
reclutados entre 1997 y 1999, no se observan diferencias significativas en los tiempos medios de progresión de los diplotipos del *locus GC* (Figura 44B).



**Figura 44.** Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de los pacientes agrupados según el diplotipo del *locus GC* en función del año de reclutamiento. A) Pacientes reclutados entre 1983 y 1996. B) Pacientes reclutados entre 1997 y 1999. Criterio de progresión: descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200µL.

El análisis Kaplan-Meier en función del riesgo genético acumulado del *locus VDR*, para los pacientes reclutados entre 1983 y 1996, revela valores altos del tiempo medio de progresión en los pacientes con puntuación RGA -2 (155 meses, IC95%: 130,6-179,6) y -1 (142,3 meses, IC95%: 127,4-157), mientras que dichos valores son menores en aquellos pacientes con puntuación RGA 0 (110,1 meses, IC95%: 95,8-125,5), 1 (100,3 meses, IC95%: 73-127,5) y 2 (79,9 meses, IC95%: 62,2-97,5) (Figura 45A). Las diferencias en los tiempos de progresión alcanzan significación estadística en las siguientes comparaciones: i) pacientes con puntuación RGA -2 con pacientes con puntuación RGA 0 y 2 (Log-Rank test  $P=0,035$  y  $P=0,001$ , respectivamente); ii) pacientes con puntuación RGA -1 con pacientes con puntuación RGA 0 (Log-Rank test  $P=0,016$ ) y iii) pacientes con puntuación RGA 0 con pacientes con puntuación RGA 2 (Log-Rank test  $P=0,043$ ). Asimismo, los riesgos proporcionales Cox, bajo el modelo no ajustado, son significativamente más altos en los pacientes con puntuación RGA 2 al compararlos con pacientes con puntuación RGA -2 ( $HR_u=7,1$ ; IC95%: 1,89-27,15;  $P=0,004$ ) y pacientes con puntuación RGA -1 ( $HR_u=7,1$ ; IC95%: 1,89-27,15;  $P=0,004$ ). Dichas diferencias se mantienen después de ajustar por sexo, edad en el primer test VIH+ y genotipo para el polimorfismo *CCR5Δ32* en las dos comparaciones realizadas ( $HR_A=6,27$ ; IC95%: 1,26-24,21;  $P=0,008$  y  $HR_A=3,9$ ; IC95%: 1,62-9,43;  $P=0,002$ , respectivamente). Sin embargo, en el grupo de pacientes reclutados entre 1997 y 1999, las diferencias en los tiempos medios de progresión son menores y sólo se observan diferencias significativas en los tiempos medios de progresión al

comparar los pacientes con puntuación RGA extremas, es decir, pacientea con puntuación RGA de -2 con los pacientea con puntuación RGA 2 (Log-Rank test  $P=0,014$ ) (Figura 45B).



**Figura 45.** Análisis de supervivencia Kaplan-Meier para los pacientes agrupados según su puntuación de Riesgo Genético Acumulado para el *locus VDR*, en función del año de reclutamiento. A) Pacientes reclutados entre 1983 y 1996. B) Pacientes reclutados entre 1997 y 1999. Criterio de progresión: descenso en el recuento de linfocitos CD4+ <200 $\mu$ L.

## 2.4.- Discusión

En este estudio se ha evaluado la asociación entre polimorfismos de los genes implicados en la vía fisiológica de la vitamina D con el ritmo de progresión de la infección por VIH-1. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, han descrito asociación de polimorfismos del gen *VDR* con la susceptibilidad a la infección por VIH-1 (Sanchez-de-la-Torre et al. 2008) y el ritmo de progresión (Barber et al. 2001; Nieto et al. 2004). En el presente estudio hemos ampliado el número de polimorfismos en el *locus VDR* y hemos incorporado los genes *CYP27B1* y *GC*, implicados en la ruta fisiológica de la vitamina D.

En el análisis de toda la cohorte, a diferencia de la asociación encontrada para los polimorfismos del *locus VDR*, no se identifica asociación con progresión para las variantes de los genes *GC* y *CYP27B1*. El análisis de los marcadores del *locus VDR* extiende la asociación descrita por nuestro grupo para el polimorfismo de 3'UTR *BsmI* al haplotipo definido por dicho marcador y el polimorfismo *PolyA*. Los resultados actuales permiten definir un haplotipo de protección y un haplotipo de riesgo, haplotipo *BsmI-G\_PolyA-L* y *BsmI-A\_PolyA-S*, respectivamente, en el extremo 3'UTR. Asimismo, se ha encontrado asociación con progresión de la infección por VIH-1 de variantes de la región 5'UTR del gen que definen un haplotipo de protección en la combinación haplotípica *Cdx2-G\_A1012G-G*. Esta asignación está

de acuerdo con resultados previos descritos relativos a la susceptibilidad a la infección atribuida a dichos haplotipos (Alagarasu et al. 2009; Sanchez-de-la-Torre et al. 2008).

Asumiendo un modelo aditivo de los efectos de las variantes del *locus VDR* en el riesgo de progresión de la infección, se ha calculado el riesgo genético acumulado (RGA) para cada paciente atendiendo a su combinación de genotipos y haplotipos de protección o riesgo. Ello ha permitido clasificar a los pacientes en 5 categorías de acuerdo a su puntuación RGA, en los que valores bajos indican combinaciones de protección y valores altos, combinaciones de riesgo. Tal y como cabría esperar, según el modelo propuesto, la proporción de progresores en cada categoría incrementa de forma paralela al incremento de la puntuación RGA. Así, la proporción de progresores en la categoría de menor puntuación RGA es del 26% mientras que en la categoría de máxima puntuación, la proporción de progresores alcanza el 73%, lo que apoya el papel del componente genético del *locus VDR* en el ritmo de progresión de la infección por VIH-1. La aplicación de la corrección por multiple testing determina un umbral de significación de  $P=0,005$  según Bonferroni y de  $P=0,0056$  según el método de descomposición espectral de SNPs. Atendiendo a estas correcciones, la asociación con progresión de los marcadores de 3'UTR del gen *VDR* y del haplotipo de 3'UTR, así como la asociación descrita para el riesgo genético acumulado y el análisis de supervivencia se mantienen significativos.

La estratificación de la cohorte en función del año de reclutamiento nos permite evitar el posible sesgo debido al tratamiento que se administra a estos pacientes. Asumiendo un posible papel del genotipo en el ritmo de progresión podemos considerar que su efecto sea mayor en el grupo de pacientes pre-TARGA (reclutados entre 1983 y 1996) mientras que éste efecto pueda quedar diluido en el grupo de pacientes en tratamiento TARGA (reclutados entre 1997 y 1999). Los resultados obtenidos apoyan esta hipótesis. Así, en el grupo de pacientes reclutados entre 1983 y 1996, se observa asociación con progresión para las variantes del *locus GC*, no observada al considerar la cohorte total, y una mayor significación en la asociación descrita para variantes del *locus VDR*.

La respuesta inmune contra el VIH-1 se organiza mediante dos mecanismos complementarios: la inducción de la síntesis de péptidos antimicrobianos, principalmente defensinas- $\alpha$  y el mantenimiento de una respuesta celular polarizada hacia Th1. En ambos procesos la vitamina D tiene un papel relevante aunque con efectos opuestos. Por una parte, promueve la síntesis de péptidos antimicrobianos que ejercen de barrera a la entrada del virus, mientras que por otra parte, induce una polarización hacia una respuesta Th2 que impide organizar una respuesta adecuada contra la infección.

Las variaciones de la región 5'UTR ejercen efectos funcionales que afectan la unión de factores de transcripción a la región promotora del gen, mientras que las variantes de la región 3'UTR se han asociado con la estabilidad del ARNm. Así, en la región 5'UTR, el alelo *A1012G-G* se ha asociado con una menor polarización de la respuesta inducida por GATA3 hacia Th2. Según ello, el haplotipo *Cdx2-G\_A1012G-G* confiere una menor polarización de la respuesta hacia Th2, que en el contexto de la respuesta a la infección por VIH-1 puede ser considerado un factor de protección. Por otra parte, se ha descrito que el haplotipo *BsmI-A\_PolyA-S* de la región 3'UTR se asocia con mayores niveles de expresión del gen (Morrison et al. 1992; Torres et al. 2010) y con una mayor estabilidad del ARNm (Fang et al. 2005). Ello confiere una mayor capacidad de respuesta a vitamina D, que en último término promueve la polarización de la respuesta hacia Th2, y puede ser considerado un factor de riesgo en el contexto de la infección por VIH-1.

Además, experimentos *in vitro* revelan que la inhibición de la maduración de células dendríticas, mediada por vitamina D, es mayor en individuos con genotipo *BsmI-A/A* (Torres et al. 2010), lo que interfiere en el curso de la respuesta contra el virus. Asimismo, se ha descrito que el VDR activa la LTR viral del VIH-1 (Antal et al. 2011), de forma dependiente de genotipo (Torres et al. 2010), con mayor activación en células con genotipo *BsmI-A/A*. Todo ello refuerza el papel del haplotipo *BsmI-A\_PolyA-S* como haplotipo de riesgo en la infección por VIH-1.

Se ha descrito que los niveles séricos de la vitamina D se correlacionan directamente con el recuento de linfocitos CD4+ en sangre y con supervivencia (Haug 1994). Ello concuerda con los resultados que indican que los niveles séricos de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> son bajos en pacientes VIH+ y que dichos niveles son aún menores en los pacientes que han desarrollado sida. Se puede pues afirmar que existen evidencias clínicas que indican que un déficit de vitamina D se asocia con un mal pronóstico de la infección. Ello contrasta con nuestros resultados que indican que el genotipo del *locus VDR* que promueve una activación de la respuesta a la vitamina D es desfavorable en la infección por VIH-1.

La deficiencia de vitamina D es una característica común en la población general que ha sido considerada como una epidemia en los países desarrollados. En los pacientes VIH+, la deficiencia en vitamina D conlleva alteraciones en el metabolismo mineral y un incremento en la prevalencia de enfermedades del metabolismo óseo. Existe cierta controversia en cuanto a que dicha deficiencia sea una consecuencia de la infección o una de las causas de su agravamiento. Se ha propuesto que el metabolismo de la vitamina D se altera significativamente durante el tratamiento antirretroviral, como consecuencia del efecto inhibitorio que determinados fármacos tienen sobre enzimas claves de dicho metabolismo. Así, se ha descrito que los inhibidores de proteasas interfieren en la actividad enzimática de la 25-hidroxilasa y la 1 $\alpha$ -hidroxilasa, enzimas claves en la síntesis de la forma

activa de la vitamina D (Cozzolino et al. 2003). No obstante, la insuficiencia en vitamina D se ha descrito tanto en pacientes tratados como en no tratados.

Los valores séricos de vitamina D provienen de la síntesis de la forma activa en riñón. Dicha vitamina D tiene efectos sistémicos y es la responsable del control del metabolismo mineral y de los denominados “efectos clásicos” de la hormona. Sin embargo, la acción inmunomoduladora de la vitamina D se debe a la hormona sintetizada en los tejidos extra-renales, como por ejemplo en macrófagos y células dendríticas, que actúa localmente de forma paracrina/autocrina. La síntesis de vitamina D en los tejidos extra-renales puede incrementar notablemente en el foco de infección y desencadenar los efectos inmunosupresores de la hormona. En un contexto genético que favorezca la respuesta a la vitamina D, como es el caso de las variaciones del *VDR* que conllevan mayor estabilidad del ARNm y mayor expresión del gen, el efecto local inmunosupresor se podría exacerbar. En un paciente VIH+ la exacerbación del efecto inmunosupresor causado por la vitamina D induciría una respuesta local polarizada hacia Th2, que sería desfavorable para un control adecuado de la infección. Dicha respuesta sería independiente de los niveles séricos de vitamina D del paciente.

La afinidad de la proteína GC por la vitamina D difiere según las variantes del *locus GC*, siendo el haplotipo 2 el que confiere una menor afinidad por la hormona mientras que el haplotipo F confiere una mayor afinidad. Nuestros resultados indican que los pacientes con diplotipo 2/2 reclutados en el periodo 1983-1996 presentan unos tiempos medios de progresión significativamente inferiores a los de los pacientes con diplotipo F/F. Ello indicaría un peor pronóstico de la infección en los pacientes con diplotipo 2/2. Si bien estos resultados coinciden con la asociación descrita del diplotipo 2/2 con susceptibilidad a tuberculosis, son opuestos a los descritos por Eals et al. 1987 en cuyo trabajo es el diplotipo F/F el que se asocia con progresión. No obstante, la asociación del diplotipo F/F con progresión no ha sido confirmada por estudios posteriores. Nuestros resultados retoman el debate sobre la posible asociación del *locus GC* con VIH-1 y refuerzan el papel de la ruta fisiológica de la vitamina D en la infección.

En el presente estudio se confirman resultados previos de nuestro laboratorio y de otros autores en cuanto al papel de la variabilidad del *locus VDR* en la infección por VIH-1. Según nuestros resultados, dicha asociación sigue un modelo aditivo en el que el incremento en puntuación de riesgo genético para el *VDR* se correlaciona directamente con progresión. Asimismo, el estudio de variantes de los genes de la ruta fisiológica de la vitamina D, *CYP27B1* y *GC*, no muestra asociación de variantes del *locus CYP27B1* mientras que se observa un potencial efecto de las variantes del *locus GC* en la progresión de la infección.

**VARIABILIDAD DE GENES DE RESPUESTA  
INMUNE Y ENVEJECIMIENTO NATURAL**



### 3.- VARIABILIDAD DEL GEN *VDR* Y ENVEJECIMIENTO NATURAL

El estudio del papel de la variabilidad del gen *VDR* en longevidad se ha llevado a cabo mediante un diseño caso-control comparando la prevalencia de variantes del gen *VDR* en una cohorte de individuos longevos (casos) y en una cohorte de controles sanos (controles). Se han seleccionado 5 marcadores polimórficos del gen *VDR* previamente descritos y asociados con enfermedades de edad avanzada (véase introducción): rs11568820 (*Cdx2*), rs4516035 (*A1012G*), rs2228570 (*FokI*), rs1544410 (*BsmI*) y rs17878969 (*PolyA*).

La cohorte de longevos está formada por 104 individuos de más de 85 años de edad, entre los cuales 72 son mujeres, con una edad media de 89,4 años (rango de edad entre 85 y 100 años) y 32 son hombres con una edad media de 89,4 años (rango de edad entre 85 y 97 años). La subcohorte de controles sanos está compuesta por 110 individuos, compuesta por 75 mujeres con una edad media de 28 años (rango de edad entre 17 y 39 años) y 35 hombres con una edad media de 29 años (rango de edad entre 17 y 40 años), obtenidos mediante un proceso de aleatorización de la cohorte total de controles sanos.

#### 3.1.- Distribución de genotipos y haplotipos

La distribución de genotipos se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para todos los marcadores analizados, tanto en la cohorte control como en la cohorte de individuos longevos. Hemos evaluado las diferencias en la distribución de alelos y genotipos entre los individuos longevos y control, en toda la cohorte y agrupando por sexo (Tabla 14). No se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución de alelos y genotipos entre controles y longevos (Tabla 14).

#### 3.2.- Desequilibrio de ligamiento de la región

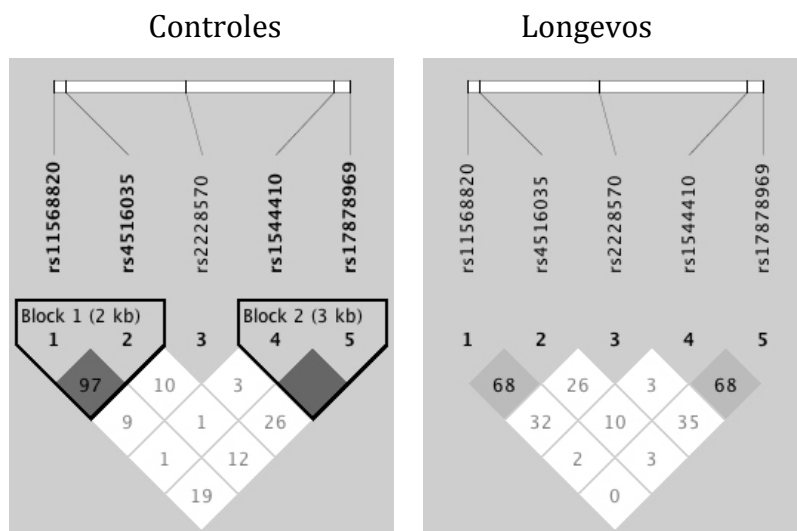
Se observa un patrón fragmentado de desequilibrio de ligamiento en la muestra de controles similar al descrito en poblaciones caucásicas (Fang et al. 2005). Así, se definen dos bloques de ligamiento, uno en la región 5'UTR que abarca los polimorfismos *Cdx2* y *A1012G* (bloque 1) y otro en el extremo 3'UTR que abarca los polimorfismos *BsmI* y *PolyA* (bloque 2) (Figura 46). Dichos bloques están separados por una región con bajo desequilibrio de ligamiento, en la que se localiza el polimorfismo del exón 2 *FokI*. Sin embargo, el patrón de desequilibrio de ligamiento en individuos longevos no permite definir los bloques previamente descritos en las regiones 5' y 3'UTR (Figura 46), lo que implica una mayor variabilidad haplotípica del *locus VDR* en dichos individuos.



Tabla 14. Distribución de alelos y genotipos del gen *VDR* en controles y longevos.

Marcadores Genotipos Alelos	Controles			Longevos		
	Todos n (%)	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	Todos n (%)	Hombres n (%)	Mujeres n (%)
<b>rs11568820 (<i>Cdx2</i>)</b>						
GG	61 (59,2)	21 (60)	40 (58,8)	63 (69,2)	18 (69,2)	45 (69,2)
GA	38 (36,9)	12 (34,3)	26 (38,2)	25 (27,5)	6 (23,1)	19 (29,3)
AA	4 (3,9)	2 (5,7)	2 (3)	3 (3,3)	2 (7,7)	1 (1,5)
G	160 (77,7)	54 (77,1)	54 (77,1)	151 (83)	42 (80,8)	109 (83,8)
A	46 (22,3)	16 (22,9)	16 (22,9)	31 (17,0)	10 (19,2)	21 (16,2)
Perdidos <sup>a</sup>	7 (6,4)	0 (0)	7(9,3)	13 (12,5)	6 (18,8)	7 (9,7)
<b>rs4516035 (<i>A1012G</i>)</b>						
GG	41 (37,6)	14 (40)	27 (36,5)	29 (29,3)	9 (30)	20 (29)
GA	56 (51,4)	18 (51,4)	38 (51,4)	55 (55,5)	15 (50)	40 (58)
AA	12 (11)	3 (8,6)	9 (12,1)	15 (15,2)	6 (20)	9 (13)
A	138 (63,3)	46 (65,7)	46 (65,7)	113 (57,1)	33 (55)	80 (58)
G	80 (36,7)	24 (34,3)	24 (34,3)	85 (42,9)	27 (45)	58 (42)
Perdidos <sup>a</sup>	1 (0,9)	0 (0)	1 (1,3)	5 (4,8)	3 (9,4)	2 (2,8)
<b>rs2228570 (<i>FokI</i>)</b>						
CC	43 (39,1)	13 (37,1)	30 (40)	46 (46,5)	15 (46,9)	31 (46,3)
CT	58 (52,7)	18 (51,4)	40 (53,3)	39 (39,4)	10 (31,2)	29 (43,3)
TT	9 (8,2)	4 (11,5)	5 (6,7)	14 (14,1)	7 (21,9)	7 (10,4)
C	144 (65,5)	44 (62,9)	44 (62,9)	131 (66,2)	40 (62,5)	91 (67,9)
T	76 (34,5)	26 (37,1)	26 (37,1)	67 (33,8)	24 (37,5)	43 (32,1)
Perdidos <sup>a</sup>	0 (0)	0(0)	0 (0)	5 (4,8)	0 (0)	5 (6,9)
<b>rs1544410 (<i>BsmI</i>)</b>						
GG	37 (33,6)	10 (28,6)	27 (36)	30 (29,2)	10 (31,2)	20 (28,2)
GA	50 (45,5)	17 (48,5)	33 (44)	56 (54,3)	20 (62,5)	36 (50,7)
AA	23 (20,9)	8 (22,9)	15 (20)	17 (16,5)	2 (6,3)	15 (21,1)
G	124 (56,4)	37 (52,9)	37 (52,9)	116 (56,3)	40 (62,5)	76 (53,5)
A	96 (43,6)	33 (47,1)	33 (47,1)	90 (43,7)	24 (37,5)	66 (46,5)
Perdidos <sup>a</sup>	0(0)	0(0)	0(0)	1(1,0)	0(0)	1(1,4)
<b>rs17878969 (<i>PolyA</i>)</b>						
LL	43 (39,8)	10 (28,6)	33 (45,2)	36 (35,3)	11 (34,4)	25 (35,7)
LS	48 (44,5)	17 (48,6)	31 (42,5)	44 (43,1)	12 (37,5)	32 (45,7)
SS	17 (15,7)	8 (22,8)	9 (12,3)	22 (21,6)	9 (28,1)	13 (18,6)
L	134 (62)	37 (52,9)	37 (52,9)	116 (56,9)	34 (53,1)	82 (58,6)
S	82 (38)	33 (47,1)	33 (47,1)	88 (43,1)	30 (46,9)	58 (41,4)
Perdidos <sup>a</sup>	2 (1,8)	0 (0)	2 (2,7)	2 (1,9)	0 (0)	2 (2,8)
Perdidos totales	10 (1,8)	0 (0)	10 (2,6)	26 (5,0)	9 (5,6)	17 (4,7)

<sup>a</sup> Número de individuos de los que falta genotipo.

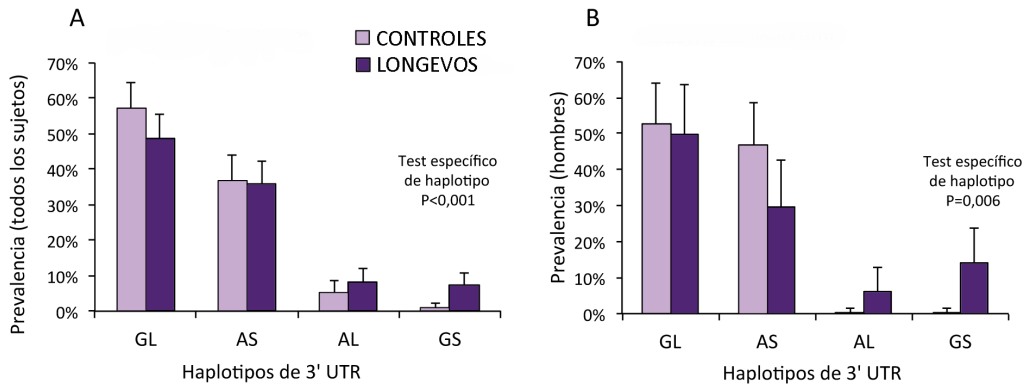


**Figura 46.** Patrón de desequilibrio de ligamiento del gen *VDR* en controles y longevos. Los valores  $D'$  se han calculado y representado con el programa Haploview 4.2. Los números de los recuadros corresponden a los valores de  $D' \times 100$ . La estructura de bloque se ha considerado para las parejas de marcadores con  $D' > 0,8$  siguiendo la definición de bloque "solid-spine" de Haploview.

### 3.3.- Distribución de haplotipos

De acuerdo con el patrón de desequilibrio de ligamiento observado, se han inferido los haplotipos para el *locus VDR* de forma independiente para la región 5' y 3'UTR.

No se observan diferencias significativas en la distribución de haplotipos del extremo 5'UTR entre individuos control y longevos. Sin embargo, se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos del extremo 3'UTR entre las cohortes ( $P=0,01$ ) (Figura 47A), principalmente debidas a las diferencias entre hombres de ambas cohortes ( $P=0,01$ ) (Figura 47B). El test específico de haplotipo revela que el haplotipo *BsmI-G\_PolyA-S* (*GS*) se encuentra sobrerrepresentado en longevos (7,3 vs. 0,8%; OR:15,3; IC95%: 2,3-637;  $P=0,001$ ) (Figura 47A). Esta diferencia se incrementa en la comparación de hombres entre cohortes (14,2% en longevos frente a 0,3% en controles;  $P=0,006$ ) (Figura 47B). La distribución de los portadores de al menos una copia del haplotipo *GS* se presenta en la Tabla 15. Los portadores de al menos una copia del haplotipo *GS* son más prevalentes en longevos que en controles (13,3 vs. 1,6%;  $P=0,008$ ). Dichas diferencias pueden atribuirse a la distribución observada en hombres. Así, los portadores de al menos una copia del haplotipo *GS* son más prevalentes en hombres longevos que en hombres controles (24,4 frente a 0,7%, respectivamente,  $P=0,013$ ), mientras que dichas diferencias no se observan al comparar las mujeres de ambas cohortes.



**Figura 47.** Prevalencia de los haplotipos del extremo 3'UTR del gen *VDR* en controles y longevos. A) Prevalencia en todos los sujetos. B) Prevalencia en hombres. Las barras indican el intervalo de confianza del 95%.

Asimismo se han inferido los haplotipos extendidos de los cinco marcadores del locus *VDR*. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos entre individuos control y longevos ( $P=0,02$ ) (Figura 48A), principalmente debidas a las diferencias entre hombres de ambas cohortes ( $P=0,02$ ) (Figura 48B). El test específico de haplotipo revela que el haplotipo *Cdx2-G\_A1012G-G\_FokI-C\_BsmI-G\_PolyA-S* (*GGCGS*) se encuentra sobrerrepresentado en longevos (4,1 vs. 0,25%; OR: 11,5; IC95%: 1,2-621;  $P=0,024$ ) (Figura 48A). Esta diferencia se incrementa en la comparación de hombres entre cohortes (9,5% en longevos frente a 0,07% en controles;  $P=0,014$ ) (Figura 48B). La distribución de los portadores de al menos una copia del haplotipo *GGCGS* se presenta en la Tabla 15. Los portadores de al menos una copia del haplotipo *GGCGS* son más prevalentes en longevos que en controles (8,3 vs. 0,5%;  $P=0,023$ ). Dichas diferencias pueden atribuirse a la distribución observada en hombres. Así, los portadores de al menos una copia del haplotipo *GGCGS* son más prevalentes en hombres longevos que en hombres control (18,9 vs. 0,1%,  $P=0,012$ ), mientras que dichas diferencias no se observan en la comparación de mujeres.

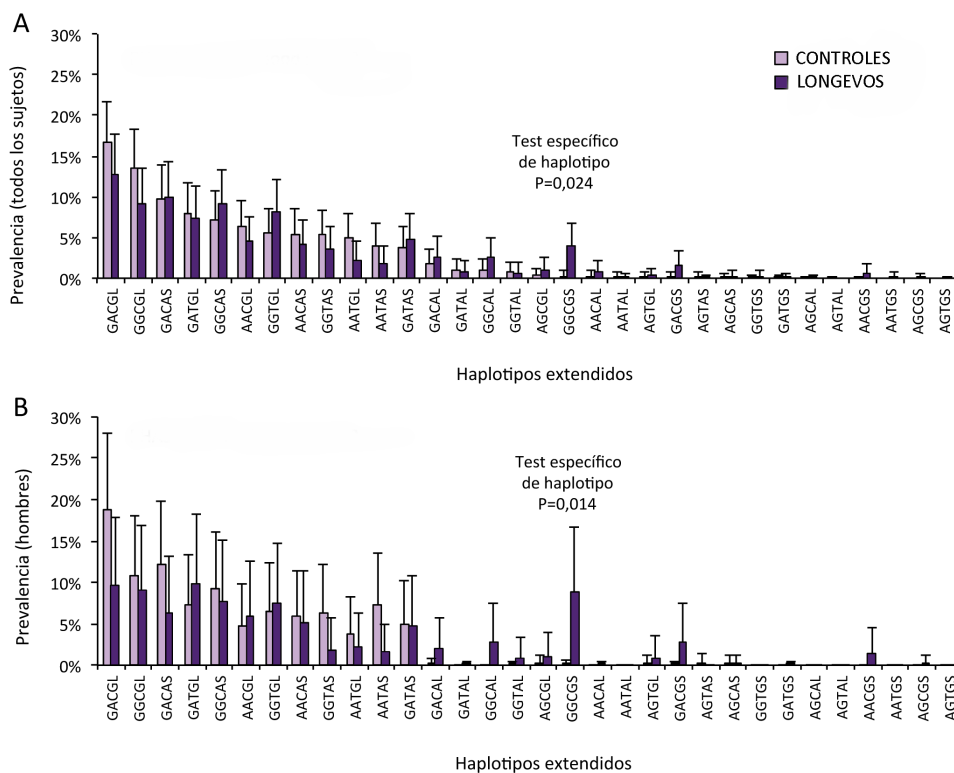
Tabla 15. Distribución de portadores de al menos una copia de los haplotipos seleccionados en controles y en longevos.

Portadores <sup>a</sup> de:	Controles, recuento <sup>b</sup> (%)			Longevos, recuento <sup>b</sup> (%)		
	Todos (n=101)	Hombres (n=35)	Mujeres (n=66)	Todos (n=86)	Hombres (n=25)	Mujeres (n=61)
Haplotipo de 3'UTR <i>GS</i> <sup>c</sup>	1,6 (1,6)	0,2 (0,7)	1,4 (2,1)	11,4 (13,3)	6,1 (24,4)	5,3 (8,7)
Haplotipo extendido <i>GGCGS</i> <sup>d</sup>	0,5 (0,5)	0,05 (0,1)	0,45 (0,7)	7,1 (8,3)	4,7 (18,9)	2,4 (3,9)

<sup>a</sup> Los portadores fueron aquellos individuos que llevaban una o dos copias del haplotipo correspondiente.

<sup>b</sup> El recuento se refiere al número de portadores de un haplotipo que fueron inferidos estadísticamente.

Nota: Como el número de portadores de cada haplotipo se infirió estadísticamente, los valores obtenidos para los recuentos son números fraccionarios.



**Figura 48.** Prevalencia de los haplotipos extendidos con los 5 marcadores en controles y longevos. A) Prevalencia en todos los sujetos. B) Prevalencia en hombres. Las barras indican el intervalo de confianza del 95%.

### 3.4.- Discusión

Los individuos longevos que han tenido un envejecimiento saludable son aquellos que han escapado o retrasado la manifestación de enfermedades limitantes que acortan la vida como son las infecciones crónicas, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Se ha descrito que la vitamina D juega un papel importante en dichas enfermedades (Holick 2005). Datos recientes indican que bajos niveles séricos de  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se asocian con todas las causas de mortalidad en la población general (Dobnig et al. 2008), así como en hombres y mujeres de edad avanzada (Pilz et al. 2009). Sin embargo, la cuestión sobre si la deficiencia de vitamina D es una causa o una consecuencia del mal estado de salud, sigue siendo tema de controversia.

Existen evidencias que apoyan el papel de la vitamina D en el proceso de envejecimiento (Lanske and Razzaque 2007; Tuohimaa 2009). Estudios en modelos animales han revelado un efecto paradójico de la vitamina D sobre el envejecimiento. Así, ratones modificados genéticamente que carecen de los genes

*FGF23* y *Klotho* exhiben rasgos de envejecimiento prematuro que se han relacionado con la alteración de la homeostasis mineral e hipervitaminosis D debida al aumento de la actividad 1- $\alpha$ -hidroxilasa (Razzaque and Lanske 2006). Al mismo tiempo, los ratones defectivos para el gen del *VDR*, en los que no se puede llevar a cabo la acción de la vitamina D, también muestran características relacionadas con el envejecimiento prematuro (Keisala et al. 2009). De acuerdo con esto, se ha propuesto que el envejecimiento muestra una dependencia hormética de las formas hormonales de la vitamina D, donde tanto una hipercomo una hipovitaminosis son factores de riesgo para un envejecimiento no saludable (Tuohimaa 2009). Este efecto bimodal (U-shaped) de los niveles de vitamina D también se ha descrito para el riesgo de enfermedades vasculares en niños sometidos a diálisis (Shroff et al. 2008) y para el riesgo de cáncer de próstata en los países nórdicos (Tuohimaa et al. 2004). Por lo tanto, podemos considerar que para tener un buen estado de salud y un envejecimiento saludable, se deben mantener concentraciones intermedias de vitamina D en suero.

El *VDR* actúa como receptor nuclear de vitamina D y es el responsable de su acción a nivel genómico. Se han descrito diversas variantes polimórficas del gen *VDR* que afectan la expresión (*Cdx2* y *A1012G*), la estructura de la proteína (*FokI*) y la estabilidad del ARNm (*BsmI* y *PolyA*) (Fang et al. 2005; Uitterlinden et al. 2004a). La variabilidad en el *locus VDR* se ha asociado con cáncer, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Uitterlinden et al. 2004b), así como con la infección por *Mycobacterium* (Bellamy and Hill 1998) e infecciones virales (Fibla and Caruz 2010).

Mientras que el efecto de la vitamina D sobre las enfermedades incapacitantes y el envejecimiento ha sido bien estudiado, el efecto de la variabilidad del gen *VDR* sólo se ha evaluado en relación a enfermedades y no existen datos acerca de su papel en el proceso de envejecimiento y longevidad. En esta tesis se ha llevado a cabo un estudio caso-control en el que hemos comparado la distribución de alelos, genotipos y haplotipos de cinco variantes del gen *VDR* entre individuos longevos y controles considerando el *VDR* como gen candidato que afecta al proceso de envejecimiento y longevidad. Nuestro estudio es el primero en presentar evidencias de una asociación entre los polimorfismos del gen *VDR* y longevidad, tal y como refleja la distribución diferencial de haplotipos de dicho gen entre controles y longevos. Se ha observado asociación con longevidad para el haplotipo *GS*, del extremo 3'UTR, y el haplotipo *GGCGS*, que incluye los cinco marcadores, en hombres, mientras que dicha asociación no se da en mujeres. Existen datos epidemiológicos que documentan una prevalencia clara de las mujeres en la población longeva, lo que sugiere que las tasas de mortalidad son específicas de sexo y que siguen trayectorias diferentes. En la literatura se han considerado factores de riesgo demográficos y de comportamiento, pero dichos factores no pueden explicar las diferencias en las tasas de mortalidad observadas entre sexos

(Wingard 1984). Además, el papel de los factores biológicos ha sido explorado con resultados contradictorios (Austad 2006). Nuestro hallazgo de una asociación específica de sexo va en la línea de datos previos que indican que polimorfismos de los genes *IL-6*, *IL-10* y *IFN- $\gamma$*  son marcadores específicos de longevidad en hombres (Bonafè et al. 2001; Di Bona et al. 2009; Giacconi et al. 2004; Lio et al. 2002a; Lio et al. 2002b), lo que concuerda con la teoría que la longevidad femenina es menos dependiente del fondo genético que la masculina (Franceschi et al. 2000b).

Con respecto a la importancia biogerontológica de la asociación observada, sólo podemos sugerir una posible explicación. Estudios funcionales han relacionado los haplotipos comunes de 3'UTR *GL* y *AS* con baja y alta estabilidad del ARNm, respectivamente (Fang et al. 2005). Sin embargo, no se ha asignado ningún efecto causal a los polimorfismos *BsmI* o *PolyA*. La principal hipótesis, considera que dichos polimorfismos son marcadores de un elemento causal desconocido ubicado en la región 3'UTR. En individuos longevos, se ha encontrado un incremento de la prevalencia del haplotipos *GS*, que combina elementos de los dos haplotipos comunes *GL* y *AS*, por lo que cabe esperar un fenotipo intermedio. Suponiendo que el efecto de la vitamina D en el proceso de envejecimiento sigue un modelo hormético (Tuohimaa 2009), los haplotipos que confieren una baja (*GL*) y alta (*AS*) estabilidad del ARNm del *VDR* contribuyen a una respuesta adversa a la vitamina D causada respectivamente por la deficiencia y la toxicidad. Sin embargo, los haplotipos que confieren una estabilidad media ARNm (es decir, *GS*) pueden considerarse como protectores, ya que la respuesta a la vitamina D puede permanecer en la región homeostática, sin producir ni deficiencia ni toxicidad. La aplicación de la corrección por multiple testing determina un umbral de significación de  $P=0,036$  para el análisis de haplotipos de dos marcadores y de  $P=0,011$  para el análisis de haplotipos compuestos por los 5 marcadores según el método de descomposición espectral de SNPs. Atendiendo a estas correcciones, la asociación con envejecimiento saludable descrita para el haplotipo de 3'UTR del gen *VDR* en hombres se mantiene significativa.

Ningún estudio previo ha evaluado específicamente las diferencias en las variantes del *VDR* entre individuos jóvenes y longevos. La literatura contiene datos indirectos sobre las frecuencias genotípicas de los marcadores del *VDR*, pero no es adecuado compararlas con nuestros datos debido a las diferencias en el origen de cada cohorte y en los criterios de selección aplicados.

En conclusión, nuestros resultados refuerzan el impacto bien documentado de los niveles de vitamina D en el proceso de envejecimiento y en enfermedades limitantes que pueden contribuir a una mortalidad prematura. Dichos resultados proponen un nuevo escenario en el que la variabilidad del gen *VDR* es relevante y enfatiza el papel del fondo genético en la determinación de los niveles óptimos de vitamina D para un envejecimiento saludable.

## 4.- VARIABILIDAD DE LOS GENES *RANTES* Y *CCR5* Y ENVEJECIMIENTO NATURAL

El papel de la variabilidad de los genes proinflamatorios *RANTES* y *CCR5* en longevidad se ha evaluado mediante un estudio de asociación caso-control. Se han definido como casos los sujetos de la cohorte de individuos longevos formada por 104 individuos de más de 85 años de edad, entre los cuales 72 son mujeres, con una edad media de 89,4 años (rango de edad entre 85 y 100 años) y 32 son hombres con una edad media de 89,4 años (rango de edad entre 85 y 97 años). Como controles se ha seleccionado una subcohorte de 110 individuos emparejados por sexo con la cohorte de individuos longevos obtenidos mediante un proceso de aleatorización de la cohorte total de controles sanos. Esta subcohorte control está formada por 75 mujeres con una edad media de 28 años (rango de edad entre 17 y 39 años) y 35 hombres con una edad media de 29 años (rango de edad entre 17 y 40 años). En el estudio se han seleccionado dos polimorfismos con efectos funcionales del locus *RANTES*, rs2107538 (-403G/A) y rs2280789 (*Int1.1T/C*) y un polimorfismo del locus *CCR5*, rs333 (*CCR5Δ32*). Se ha descrito que dichos polimorfismos tienen efecto en el estado inflamatorio. Así, el alelo -403-A incrementa la actividad transcripcional del gen y da lugar a altos niveles de *RANTES* en suero, lo que promueve un estado proinflamatorio (Zhernakova et al. 2006). Sin embargo, el alelo *Int1.1-C* se ha asociado con una baja expresión de *RANTES*, lo que promueve un estado anti-inflamatorio (An et al. 2002). El alelo *CCR5-Δ32* codifica una proteína no funcional que no se exporta a membrana (Liu et al. 1996), lo que impide la acción de *CCR5* como mediador proinflamatorio (Samson et al. 1996).

### 4.1.- Distribución de alelos y genotipos

Las distribuciones de genotipos de los polimorfismos *RANTES -403G/A* y *CCR5Δ32* se ajustan al equilibrio Hardy-Weinberg en controles y longevos. Sin embargo, el polimorfismo *RANTES Int1.1T/C* muestra una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg en la cohorte de longevos, y se observa un exceso de homocigotos para el alelo *RANTES Int1.1-C*.

La distribución global de genotipos de los polimorfismos *CCR5Δ32* y *-403G/A* no muestra diferencias significativas entre ambas cohortes. Sin embargo, la distribución global de genotipos del polimorfismo *Int1.1T/C* muestra diferencias estadísticamente significativas entre controles y longevos ( $P=0,03$ ) (Tabla 16). El alelo *Int1.1-C* se encuentra sobrerrepresentado en longevos mostrando asociación con longevidad bajo un modelo recesivo (Peto OR=8,8; IC95%=1,7-44,7;  $P=0,008$ ).

El análisis realizado agrupando las cohortes por sexo muestra que no existen diferencias significativas en la distribución de genotipos del polimorfismo *CCR5Δ32*. Sin embargo, se observan diferencias significativas en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del *locus RANTES*. Así, la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *-403G/A* difiere significativamente en la comparación de hombres entre ambas cohortes ( $P=0,012$  y  $P=0,029$ , respectivamente) (Tabla 16). El alelo *-403-A* se encuentra sobrerrepresentado en hombres longevos y asociado con longevidad siguiendo un modelo dominante ( $OR=4$ ;  $IC95\%=1,4-11,8$ ;  $P=0,01$ ). Asimismo, la distribución de frecuencias alélicas del polimorfismo *Int1.1T/C* difiere en la comparación de mujeres entre ambas cohortes (Tabla 16). El alelo *Int1.1-C* se encuentra sobrerrepresentado en las mujeres longevas y muestra asociación con longevidad bajo un modelo recesivo (Peto  $OR=8,4$ ;  $IC\ 95\% =1,4-49,9$ ;  $P=0,02$ ).

## 4.2.- Distribución de haplotipos del *locus RANTES*

Dado el fuerte desequilibrio de ligamiento observado entre los polimorfismos *-403G/A* y *Int1.1T/C* del *locus RANTES*, se han inferido los haplotipos correspondientes mediante el software pLink. De acuerdo con este análisis se han obtenido un total de 3 haplotipos distintos en controles y 4 en longevos (Tabla 16).

Se observan diferencias significativas en la distribución de haplotipos al comparar longevos y controles ( $P=0,02$ ). Asimismo, dichas diferencias se observan al comparar hombres ( $P=0,05$ ) y mujeres ( $P=0,04$ ) entre cohortes (Tabla 16).

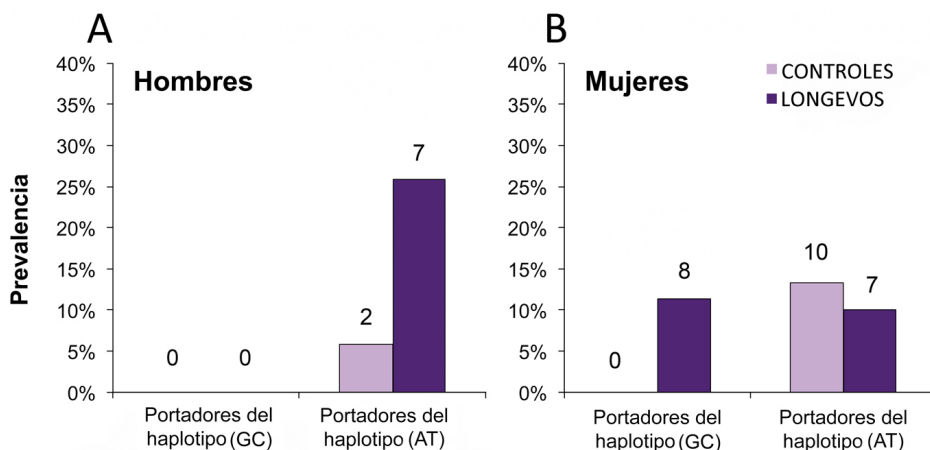
El test específico de haplotipo revela que el haplotipo *-403-G\_Int1.1-C (GC)* se encuentra sobrerrepresentado en la cohorte de longevos ( $P=0,04$ ), principalmente debido a la sobrerrepresentación en las mujeres ( $OR$  de Peto=  $8,3$ ;  $IC95\%= 2-34$ ;  $P=0,005$ ). Por el contrario, el haplotipo *-403-A\_Int1.1-T (AT)* se encuentra sobrerrepresentado en los hombres de edad avanzada ( $OR= 4,9$ ;  $IC95\%= 0,97-24,7$ ;  $P=0,03$ ).

La distribución de los portadores de los haplotipos *GC* y *AT* sigue un patrón diferente en hombres y mujeres (Tabla 16 y Figura 49). Así, los portadores del haplotipo *AT* son más prevalentes en hombres longevos que en hombres controles ( $26\%$  vs.  $6\%$ ;  $OR= 5,6$ ;  $IC95\%= 1,06-29,7$ ;  $P=0,038$ ), mientras que la prevalencia de portadores de dicho haplotipo no difiere significativamente al comparar las mujeres de ambas cohortes ( $10\%$  vs.  $13\%$ ). Sin embargo, las portadoras del haplotipo *GC* sólo se observan en mujeres longevas mientras que este haplotipo está ausente en mujeres controles ( $11,4\%$  vs.  $0\%$ ;  $OR$  de Peto =  $8,8$ ;  $IC95\% = 2,1-36,5$ ;  $P=0,0024$ ), así como en hombres longevos y controles.



Tabla 16. Distribución de alelos, genotipos y haplotipos de los polimorfismos *CCR5Δ32*, *RANTES -403G/A* y *RANTES Int1.1T/C* en controles y longevos.

Código (alias)	rs	Controles			Longevos		
		Todos los sujetos n (%)	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	Todos los sujetos n (%)	Hombres n (%)	Mujeres n (%)
<b>Genotipo, Alelo</b>							
<b>rs333 (<i>CCR5Δ32</i>)</b>							
	wtw	88 (80)	29 (82,9)	59 (78,7)	79 (76)	22 (68,8)	57 (79,2)
	w $\Delta$ 32	22 (20)	6 (17,1)	16 (21,3)	21 (20,2)	9 (28,1)	12 (16,7)
	$\Delta$ 32 $\Delta$ 32	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2,9)	1 (3,1)	2 (2,8)
	wt	198 (90)	64 (91,4)	134 (89,3)	179 (86,1)	53 (82,8)	126 (87,5)
	$\Delta$ 32	22 (10)	6 (8,6)	16 (10,7)	27 (13)	11 (17,2)	16 (11,1)
<b>rs2107538 (<i>RANTES-403G/A</i>)</b>							
	GG	75 (68,2)	28 (80)	47 (62,7)	66 (63,5)	16 (50)	50 (69,4)
	GA	34 (30,9)	7 (20)	27 (36)	35 (33,7)	15 (46,8)	20 (27,8)
	AA	1 (0,9)	0 (0)	1 (1,3)	3 (2,9)	1 (3,1)	2 (2,8)
	Portadores A	35 (31,8)	7(20)	28 (37,3)	38 (36,6)	16 (49,9)	22 (30,6)
	G	184 (83,6)	63 (90)	121 (80,7)	167 (80,3)	47 (73,4)	120 (83,3)
	A	36 (16,4)	7 (10)	29 (19,3)	41 (19,7)	17 (26,6)	24 (16,7)
<b>rs2280789 (<i>RANTES Int1.1T/C</i>)</b>							
	TT	86 (78,9)	29 (85,3)	57 (76)	71 (73,2)	21 (77,8)	50 (71,4)
	TC	23 (21,1)	5 (14,7)	18 (24)	20 (20,6)	5 (18,5)	15 (21,4)
	CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (6,2)	1 (3,7)	5 (7,2)
	T	195 (89,5)	63 (92,7)	132 (88)	162 (83,5)	47 (87)	115 (82,1)
	C	23 (10,5)	5 (7,3)	18 (12)	32 (16,5)	7 (13)	25 (17,9)
<b>Haplotipos</b>							
<b>rs2107538 &amp; rs2280789 (Haplotipo <i>RANTES</i>)</b>							
Recuento de haplotipos							
	GT	182 (83,3)	61 (89,6)	121 (80,5)	148 (76,2)	40 (74)	108 (77)
	AC	23 (10,4)	5 (7,3)	18 (11,9)	24 (12,3)	7 (12,9)	17 (12,1)
	AT	13 (6,1)	2 (3,1)	11 (7,6)	14 (7,3)	7 (13,1)	7 (5,1)
	GC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (4,2)	0 (0)	8 (5,8)



**Figura 49.** Prevalencia de portadores de los haplotipos *-403G\_Int1.1C (GC)* y *-403A\_Int1.1T (AT)* del gen *RANTES* en controles y longevos. A) Prevalencia en hombres. B) Prevalencia en mujeres. Los números en la parte superior de las columnas indican el recuento de sujetos de la combinación haplotípica indicada.

### 4.3.- Discusión

Nuestro estudio sobre la variabilidad genética en longevos españoles no revela asociación significativa entre el polimorfismo *CCR5Δ32* y longevidad. El papel de *CCR5* en las enfermedades relacionadas con la edad ha sido ampliamente revisado (Jones et al. 2011). Podemos asumir la hipótesis de que los alelos que favorecen la inflamación y las enfermedades relacionadas con ella, son perjudiciales para un envejecimiento saludable. Teniendo en cuenta el papel de *CCR5* como mediador de la respuesta inflamatoria y que el alelo *CCR5-Δ32* codifica un receptor no funcional que compromete dicha respuesta, cabría esperar una mayor prevalencia del alelo *CCR5-Δ32*, así como de portadores de dicho alelo, en individuos longevos. En nuestra cohorte, se observa una mayor prevalencia del alelo *CCR5-Δ32* en longevos, especialmente en hombres, aunque dicha diferencia no alcanza significación estadística. En la literatura existen pocos datos sobre la prevalencia de variantes de *CCR5* en longevos. Se ha observado una mayor prevalencia del alelo *CCR5-Δ32* en centenarios en comparación con individuos afectados de enfermedades que acortan la esperanza de vida, tales como el infarto agudo de miocardio y el cáncer de próstata (Balistreri et al. 2008; Balistreri et al. 2009). Según estos resultados, el alelo *CCR5-Δ32* sería un factor que favorecería un envejecimiento saludable. Sin embargo, en estos estudios la prevalencia de *CCR5-Δ32* observada en centenarios no difiere de la observada en la población control sana, lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Tan solo la comparación entre poblaciones con fenotipo extremo (centenarios frente a afectados) alcanza significación estadística. Ésto podría indicar una débil

asociación de *CCR5* con longevidad que sólo puede ser observada mediante un estudio con mayor potencia estadística.

En cuanto a la asociación de polimorfismos del gen *RANTES* con envejecimiento saludable y longevidad, nuestros resultados indican una asociación específica de sexo con variantes funcionales de *RANTES*. De acuerdo con el efecto asociado a inflamación atribuido tanto al polimorfismo *RANTES -403G/A* como al *Int1.1T/C*, podemos asignar un efecto anti-inflamatorio para el haplotipo *-403-G\_Int1.1-C (GC)* y el efecto contrario, proinflamatorio, para el haplotipo *-403-A\_Int1.1-T (AT)*.

Según nuestros resultados alelos y haplotipos de *RANTES* con efecto proinflamatorio tienen una mayor prevalencia en hombres longevos, mientras que alelos y haplotipos de *RANTES* con efecto anti-inflamatorio tienen una mayor prevalencia en mujeres longevas.

La aplicación de la corrección por multiple testing determina un umbral de significación de  $P=0,025$  según el método de Bonferroni y de  $P=0,02$  según el método de descomposición espectral de SNPs. Atendiendo a estas correcciones, la asociación descrita con longevidad, para el haplotipo *GC* en mujeres y para el haplotipo *AT* en hombres, continúan siendo significativas.

Se ha descrito que la elevación de los niveles circulantes de *RANTES* puede usarse como predictor de futuros eventos cardiovasculares adversos en pacientes con angina de pecho inestable (Jones et al. 2011). Asimismo, una elevación significativa de quimiocinas CC, incluyendo *RANTES*, durante el curso del infarto agudo de miocardio contribuyen activamente a la fisiopatología de la enfermedad. Por último, los estudios de asociación de los polimorfismos funcionales de *RANTES* que se han llevado a cabo revelan el papel de *RANTES* en enfermedades relacionadas con la edad como el asma, la esclerosis múltiple, la diabetes tipo 1 y enfermedades autoinmunes (Gade-Andavolu et al. 2004; Hizawa et al. 2002; Zhernakova et al. 2006).

La distribución de alelos/haplotipos de *RANTES* observada sugiere la existencia de un determinante genético de *RANTES* asociado a un fenotipo proinflamatorio en varones y a un fenotipo anti-inflamatorio en mujeres, lo que podría contribuir a las diferencias en el proceso envejecimiento entre sexos. Se ha observado dimorfismo sexual en el fondo genético de la respuesta inmune. Existen algunas evidencias de un aumento de los alelos anti-inflamatorios de la citocina *IL-10* en varones longevos (Lio et al. 2003) y se ha sugerido que existe dimorfismo sexual en la respuesta inmune del supratipo HLA A1B8Cw7DR3 (Rea and Middleton 1994).

Estudios previos han descrito que el índice de inflamación, calculado como la suma de los indicadores positivos, tales como proteína C-reactiva, fibrinógeno en plasma

y albúmina en orina, muestra diferencias entre sexos y varía con la edad (Yang and Kozloski 2011). Las mujeres tienen un índice de inflamación mayor durante todas las etapas de la vida en comparación con los hombres. Sin embargo, la tasa de incremento con la edad de dicho índice es menor en mujeres (Yang and Kozloski 2011). Por otra parte, se ha sugerido que el estrógeno aumenta la expresión de enzimas antioxidantes con lo cual mejora la resistencia a enfermedades degenerativas y modula la expresión de factores fibrinolíticos, lo que reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Eskes and Haanen 2007). Según ello, las mujeres tienen una mayor capacidad para recuperarse de un estado inflamatorio, probablemente debido a una mejor regulación de la respuesta inflamatoria, que, como nuestros datos señalan, puede ser debida al componente genético. El mejor control de la inflamación en las mujeres mayores podría estar vinculado con su mayor esperanza de vida.

El papel del sexo en las trayectorias de edad sigue sin resolverse. Nuestros datos muestran que el componente genético de *RANTES* difiere entre hombres y mujeres y podría contribuir a sus diferencias en las trayectorias de envejecimiento. La correcta regulación de la respuesta inflamatoria mediante el adecuado equilibrio de las citocinas pro- y anti-inflamatorias podría ser un factor importante para un proceso de envejecimiento saludable. Nuestros resultados alientan la realización de estudios adicionales que puedan replicar estos hallazgos, así como la incorporación de nuevos genes relacionados con inflamación que puedan definir un componente genético específico de sexo que contribuya a las diferencias observadas entre sexos en el proceso de envejecimiento saludable.

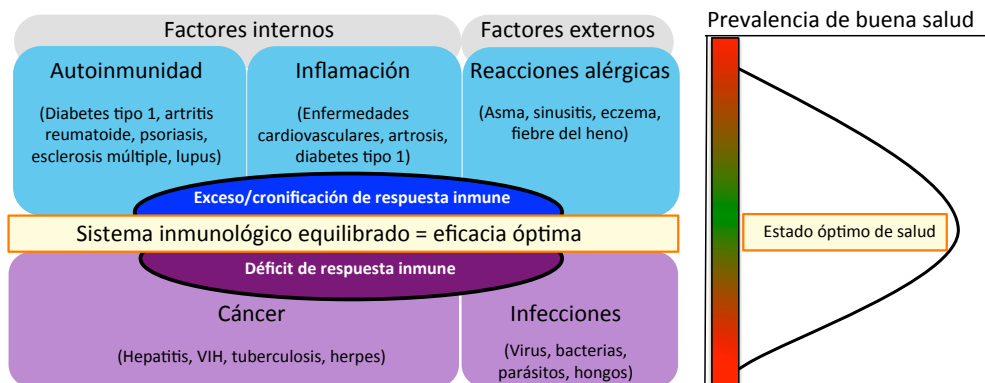


# DISCUSIÓN GENERAL





**E**l estudio de la variabilidad de genes implicados en la respuesta inmune y su relación con infecciones y patologías asociadas a disfunción del sistema inmunitario, ha sido abordado en los últimos años gracias al desarrollo de nuevas estrategias metodológicas y a la disponibilidad de marcadores genéticos ampliamente distribuidos por el genoma. Los estudios de asociación genética han resultado de utilidad para identificar variantes de genes de respuesta inmune implicadas en patologías que van desde el cáncer o las enfermedades cardiovasculares a infecciones como la tuberculosis o el VIH (Plenge and Rioux 2006). La capacidad de organizar una respuesta inmune contra agentes patógenos o células tumorales está en parte determinada por el fondo genético de cada individuo. La modulación inadecuada o el mantenimiento de forma crónica de la respuesta inmune, puede provocar efectos adversos en sistemas y órganos, y da lugar a la manifestación de patologías (Figura 50). La importancia de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune son pues un elemento clave para el mantenimiento de un estado de salud óptimo.



**Figura 50.** Disfunciones en la modulación de la respuesta inmune y efecto en el estado de salud.

En la presente tesis se ha estudiado la variabilidad de genes de respuesta inmune y su papel en dos modelos distintos: la infección por VIH-1 y el proceso de envejecimiento natural. En el primer modelo se ha estudiado la variabilidad del gen *BST-2*, seleccionado por su papel como factor de restricción en la infección por VIH-1, y de los genes *CYP27B1*, *GC* y *VDR*, implicados en la síntesis, transporte



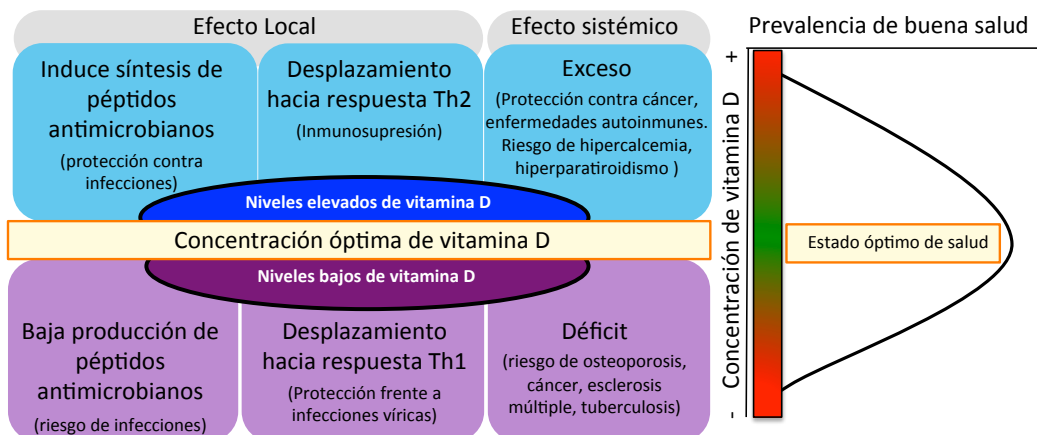
y acción genómica de la vitamina D, seleccionados dado el papel de dicha hormona en la modulación de la respuesta inmune. Asimismo, en el segundo modelo, se ha evaluado el efecto de la variabilidad del gen *VDR* y de los genes *RANTES* y *CCR5*, seleccionados por su implicación en la mediación de la respuesta inmune e inflamatoria.

Los resultados obtenidos sobre la variabilidad del factor de restricción *BST-2* complementan con datos genéticos las evidencias experimentales sobre su papel en la infección por VIH-1. Se han identificado dos variantes del gen *BST-2* asociadas con progresión, una que captura la variabilidad de la región genómica y otra con potencial efecto funcional. No obstante, dado el elevado desequilibrio de ligamiento de la región circundante del gen *BST-2*, no se puede excluir que en la asociación descrita puedan estar implicadas variantes causativas adicionales no identificadas en este estudio, arrastradas por el elevado desequilibrio de ligamiento de la región.

El estudio de variantes de los genes de la ruta fisiológica de la vitamina D, *VDR*, *CYP27B1* y *GC* en relación al ritmo de progresión de la infección, ha permitido confirmar y ampliar el número de marcadores del gen *VDR* que muestran asociación con progresión y detectar asociación de las variantes del gen *GC* con progresión en el grupo de pacientes reclutados en el período 1983-1996. Sin embargo, no se ha detectado asociación para las variantes analizadas del gen *CYP27B1*. La asociación con progresión de variantes del *VDR*, descrita en este estudio, sigue un modelo aditivo en el que un incremento de factores de riesgo genético se correlaciona directamente con progresión. Asimismo, al evaluar el papel de variantes del gen *VDR* en el proceso de envejecimiento natural, se ha revelado la asociación de los polimorfismos de 3'UTR y del haplotipo extendido de los cinco marcadores, con el envejecimiento saludable en hombres. La vitamina D tiene un efecto dual en la respuesta inmune, que conlleva que tanto el exceso como el déficit de la hormona tengan efectos negativos; el primero por promover un estado inmunodeprimido en el que predomina una respuesta Th2 y el segundo por comprometer la producción de péptidos antimicrobianos. Las variantes que se asocian a una peor progresión de la infección por VIH-1 son aquellas que confieren alta capacidad de respuesta a la hormona y por tanto, que determinan una mayor capacidad de síntesis de péptidos antimicrobianos y un desplazamiento de la respuesta inmune hacia Th2. En el contexto de la progresión de la infección por VIH-1, el desplazamiento hacia Th2 dificultaría una respuesta adecuada contra la infección que no sería compensada por la inducción de la síntesis de péptidos antimicrobianos, cuyo efecto está más relacionado con el control de las primeras fases de la infección.

El efecto dual de la vitamina D sobre la respuesta inmune puede ser también el argumento que permita explicar los resultados obtenidos sobre la distribución de

variantes del *VDR* en relación al envejecimiento saludable. En este caso las variantes asociadas con envejecimiento saludable en hombres son aquellas que confieren una capacidad de respuesta intermedia a la vitamina D. Se ha descrito que tanto los niveles elevados como los niveles bajos de vitamina D tienen efectos adversos en el proceso de envejecimiento (Figura 51). Sin embargo, los efectos desfavorables del exceso o déficit de vitamina D podrían ser modulados por la constitución genética en el *locus VDR*. En este sentido, una constitución genética que capacite para una respuesta intermedia a la hormona sería un factor de protección que favorecería un envejecimiento saludable. Nuestros resultados refuerzan el impacto bien documentado de los niveles de vitamina D en el proceso de envejecimiento y en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad. Dichos resultados proponen un nuevo escenario en el que la variabilidad del gen *VDR* también es relevante y enfatiza el papel del fondo genético en la determinación de los niveles óptimos de vitamina D para un envejecimiento saludable.



**Figura 51.** Variaciones en la concentración local y sistémica de vitamina D y efecto en el estado de salud.

El modelo de envejecimiento saludable ha sido también evaluado en relación a polimorfismos de los genes *CCR5* y *RANTES*, mediadores de la respuesta inflamatoria. Si bien no se ha encontrado asociación significativa para el *locus CCR5*, los resultados muestran un incremento de la variante no funcional y, por lo tanto, peor mediadora de la respuesta inflamatoria en individuos longevos. En cuanto a las variaciones del gen *RANTES*, los resultados indican una asociación específica de sexo que sugiere la existencia de un determinante genético de *RANTES* propenso a un fenotipo proinflamatorio en los varones y a un fenotipo anti-inflamatorio en las mujeres.

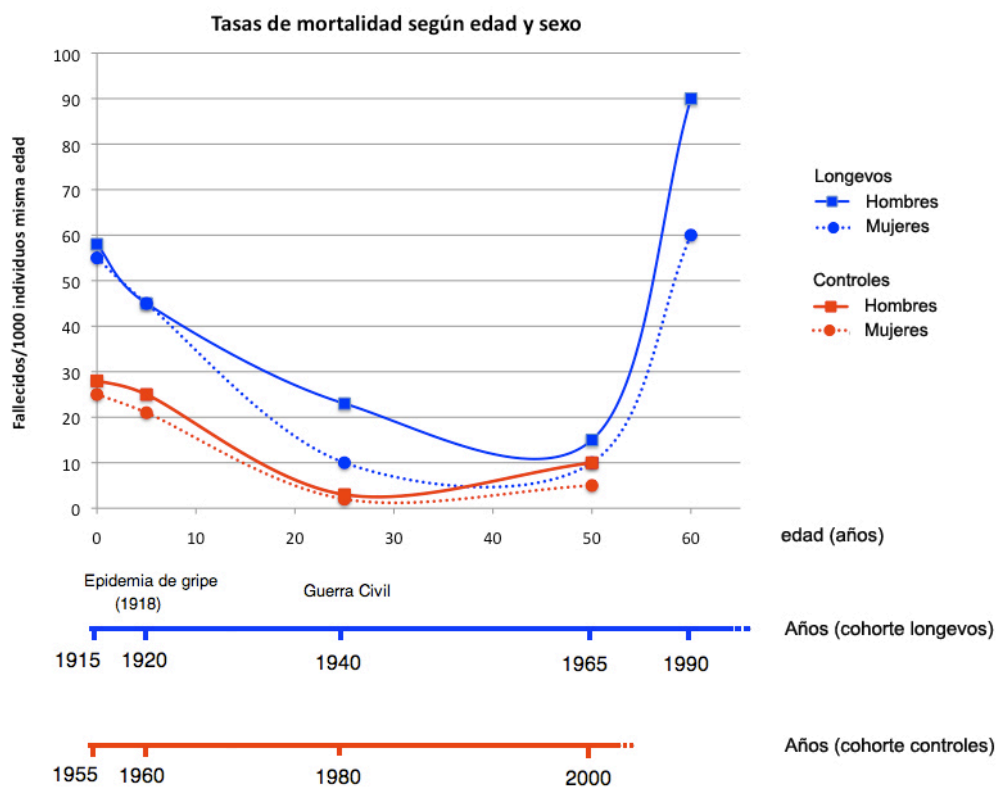
Los resultados obtenidos sobre la variabilidad de los genes *VDR*, *RANTES* y *CCR5* en envejecimiento natural, refuerzan la hipótesis de que hombres y mujeres siguen trayectorias distintas en el proceso de envejecimiento natural. La ausencia de asociación de variantes del *VDR* en mujeres concuerda con la idea de que, a diferencia de la longevidad masculina, la longevidad femenina es menos dependiente del fondo genético. Asimismo, el efecto contrapuesto de las variantes de respuesta inflamatoria en hombres y mujeres podría contribuir a las diferencias observadas entre sexos en el proceso de envejecimiento. Podemos concluir, que para lograr un envejecimiento saludable se requiere una correcta regulación de la respuesta inflamatoria mediante un equilibrio adecuado de citocinas pro- y anti-inflamatorias, así como un correcto balance de la respuesta celular Th1/Th2.

## Limitaciones del estudio

Los estudios de asociación presentan una serie de limitaciones *per se*. Entre ellas, cabe destacar la correcta selección de las cohortes de casos y controles, el número de individuos en cada cohorte y los ajustes y métodos estadísticos utilizados. El primer aspecto es relevante en cuanto a evitar la detección de asociaciones espurias o sesgos de selección, el segundo es relevante en cuanto a que un reducido número de individuos puede limitar de forma significativa la potencia del análisis, y el tercero es relevante en cuanto a garantizar la validez de las asociaciones detectadas y evitar que éstas sean fruto de la realización de un número elevado de ensayos.

El proceso de selección de las cohortes debe garantizar que éstas difieran exclusivamente en el fenotipo a analizar para evitar errores o sesgos en los resultados. Las cohortes utilizadas en esta tesis han sido seleccionadas atendiendo a estrictos criterios de inclusión. En todos los estudios se ha procurado un emparejado correcto entre casos y controles. Tienen una consideración especial las cohortes de individuos longevos y controles utilizadas en esta tesis. Aunque las cohortes de individuos caucásicos de más de 85 años pueden presentar características históricas y socioeconómicas comunes, tales como la limitada atención médica disponible hasta la década de 1950, la cohorte de longevos presenta características singulares a destacar. En particular, podemos considerar dos hechos históricos que han modelado dicha cohorte: la epidemia de la gripe española acontecida a principios del siglo XX, que tubo efectos devastadores sobre la población infantil, y la Guerra Civil española (1936-1939) que tuvo un impacto especialmente importante en la mortalidad masculina (Gonzalez et al. 1996). El primer evento se desarrolló entre los años 1918 y 1920 y afectó a los individuos de la cohorte cuando éstos tenían edades comprendidas

entre 0 y 10 años. Este evento, podría haber actuado como factor de selección de aquellos sujetos con una mejor capacidad para superar la infección. Sin embargo, el segundo evento tuvo un efecto estocástico que afectó principalmente a la mortalidad masculina, sin que pueda derivarse un efecto de selección. La comparación de dicha cohorte con una cohorte de controles, cuya trayectoria vital se ha desarrollado en un espacio temporal distinto, puede dar lugar a un factor de sesgo (Figura 52).



**Figura 52.** Tasas de mortalidad de las cohortes de nacimiento de 1915 (azul) y 1955 (roja) en la población española. Dichas cohortes corresponden a la cohorte de longevos y controles, respectivamente. En la gráfica se presentan los eventos histórico-sociales más significativos, capaces de alterar las trayectorias de mortalidad.

Algunos autores defienden que para minimizar dicho sesgo las cohortes control en estudios de longevidad deben obtenerse de individuos de generaciones lo más cercanas posibles a las de la cohorte de longevos (Capri et al. 2008). Si bien éste puede ser un objetivo encomiable, consideramos que la cohorte control utilizada en este estudio es apropiada. No cabe esperar que se hayan producido alteraciones en el apareamiento aleatorio, ni que existan factores selectivos atribuibles a los *loci* considerados, que puedan haber actuado antes de la edad reproductiva modificando las frecuencias alélicas de los mismos. En este sentido, el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los *loci* analizados en

la cohorte control nos permite afirmar que las frecuencias genóticas y alélicas se han mantenido de generación en generación y son similares a las frecuencias esperadas en la cohorte de longevos. De este modo, las diferencias observadas entre ambas cohortes pueden ser atribuidas a la condición de “envejecimiento saludable” que caracteriza a la cohorte de individuos longevos.

En cuanto al factor limitante del número de individuos de las cohortes debemos diferenciar entre los estudios de progresión de la infección y el referente al envejecimiento saludable. En el primer caso, considerando una prevalencia del fenotipo analizado del 40% (prevalencia de progresores en la población analizada) y un factor x2 al alelo de riesgo, el número de individuos de la cohorte (185 pacientes) nos permite alcanzar un poder estadístico del 75%. Dicho poder estadístico se reduce significativamente en el estudio sobre envejecimiento. En este caso, asumiendo una prevalencia del fenotipo analizado de <5% (proporción de sujetos que alcanzan un envejecimiento saludable) y un factor x2 al alelo de riesgo, con una cohorte de 200 sujetos (controles + casos), la potencia se reduce al 40%. Ello nos hace ser precavidos al valorar los resultados negativos en cuanto a la asociación de *CCR5* y envejecimiento saludable, ya que no podemos descartar que dicho resultado negativo sea debido a la reducida potencia del estudio.

Finalmente, cabe comentar las limitaciones derivadas del análisis estadístico de los datos. La realización de un número elevado de test supone el incremento paralelo en la probabilidad de errores Tipo I (falsos positivos). La forma más común para evitar dichos errores es reducir la probabilidad de significación en una cantidad proporcional al número de ensayos. Así, en la corrección de Bonferroni, la probabilidad de significación correspondiente a un error Tipo I del 5% ( $P=0,05$ ) se debe dividir por el número de ensayos realizados. En este contexto, el número de ensayos se corresponde con el número de polimorfismos analizados. Sin embargo, una aplicación drástica de dicho método de corrección parece excesivamente restrictiva al no tener en consideración la correlación entre polimorfismos, es decir, el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores analizados. Existe pues cierta controversia en la utilización de este método en los estudios de asociación genética y se han propuesto métodos alternativos basados en el principio de descomposición espectral que, teniendo en cuenta la correlación entre marcadores, permite corregir el nivel de significación de cada estudio.

En esta tesis se ha procurado evitar en todo lo posible el efecto de los aspectos limitantes anteriormente citados. Aun así, hemos de ser conscientes de que algunos de los resultados obtenidos deben ser valorados y considerados teniendo en cuenta las limitaciones aquí comentadas. La significación de algunas de las asociaciones descritas indican, sugieren o proponen tendencias que, sólo después de una confirmación en cohortes adicionales, deberán ser consideradas como

validadas. Los resultados aquí presentados justifican la continuación y profundización de estos estudios incorporando nuevos sistemas genéticos y ampliando el número de cohortes.

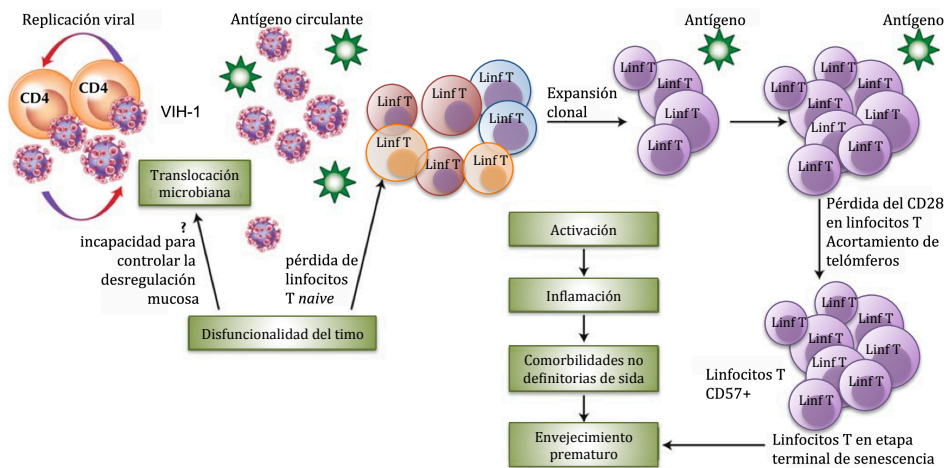
## **Perspectivas de los estudios de envejecimiento**

Existe un interés creciente por el estudio del proceso de envejecimiento y la caracterización de los factores genéticos y ambientales que promueven un envejecimiento saludable. En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios genómicos sobre longevidad y envejecimiento mediante estudios de asociación de genes candidatos y análisis global de genoma (Slagboom et al. 2010). En este sentido, cabe destacar los estudios realizados con los genes relacionados con la inflamación como *IL-6*, *IL-10*, *TNF $\alpha$*  y *TNFB1*. Se ha descrito que los sujetos con variantes que disminuyen la expresión de la interleucina proinflamatoria *IL-6*, e incrementan la expresión de la interleucina antiinflamatoria *IL-10*, en combinación con alelos anti-inflamatorios de *TNF $\alpha$* , tienen más probabilidades de alcanzar edades extremas.

El fenotipo de envejecimiento prematuro se ha propuesto como modelo de estudio del envejecimiento natural. Dicho fenotipo se observa en enfermedades como la progeria, el Síndrome de Werner y el Síndrome de Down o por efecto de factores ambientales como la exposición a radiación solar capaz de generar fenocopias. Asimismo, el envejecimiento prematuro se ha descrito como parte del fenotipo de determinadas enfermedades infecciosas que cursan con inmunodeficiencia. En estos casos el curso de la infección guarda cierto paralelismo con la pérdida de función y de capacidad de respuesta del sistema inmune observado en el envejecimiento natural. Un ejemplo de ello es el fenotipo de envejecimiento prematuro que diversos autores han asociado con el curso de la infección por VIH-1 (Desai and Landay 2010). Tal y como se ha comentado anteriormente, gracias a los tratamientos TARGA la infección ha derivado en una enfermedad crónica. Sin embargo, las personas seropositivas siguen presentando serias alteraciones inmunológicas asociadas a la infección como pueden ser la persistente activación inmune y un estado inflamatorio crónico. Las alteraciones inmunológicas y fisiológicas, así como las comorbilidades observadas en los pacientes infectados por VIH-1 presentan un gran paralelismo con el proceso de envejecimiento natural, lo que sugiere que una de las manifestaciones derivadas de la infección por VIH-1 es el envejecimiento prematuro.

Según el modelo propuesto por Desai and Landay 2010 los individuos VIH+ en tratamiento presentan una replicación residual del virus que mantiene la activación de las células inmunes. A ello se suman un incremento de la

translocación microbiana debida a la depleción de los linfocitos Th-17 del intestino, que aumenta la carga antigénica, y la pérdida de función tímica, que altera la homeostasis de linfocitos T. La activación inmune, debida a la circulación de antígenos, es el evento central de la vía de inmunosenescencia. Los linfocitos activados experimentan expansión clonal en respuesta a la persistencia del antígeno, y dan como resultado la diferenciación y acumulación de células no funcionales que caracteriza la etapa terminal de inmunosenescencia. Los linfocitos activados liberan mediadores inflamatorios y causan inflamación que finalmente se traduce en un incremento de comorbilidades no definitorias de sida y envejecimiento prematuro (Figura 53).



**Figura 53.** Modelo del envejecimiento prematuro en la infección por VIH-1. Imagen adaptada de Desai and Landay 2010.

Existe poca información sobre los factores genéticos implicados en el fenotipo de envejecimiento prematuro en VIH-1. Cabe considerar que aquellos factores que promueven un estado inflamatorio contribuyan a la progresión de la infección a través de su papel en el envejecimiento prematuro. El uso de población longeva con envejecimiento saludable como cohorte adicional de referencia podría ser una estrategia válida para identificar factores de progresión vinculados a envejecimiento prematuro.

El descenso en el ratio CD4+/CD8+, definido por ciertos autores como “*Immune Risk Profile*” (IRP) es un marcador de envejecimiento natural y predictor de mortalidad en la población general (Ferguson et al. 1995). Dicho descenso también se observa en el curso de la infección por VIH-1, y adquiere valor pronóstico de riesgo de progresión a sida (Fahey et al. 1990). Esta disminución no se observa en individuos longevos con envejecimiento saludable. Así, en cuanto al parámetro IRP, la población de longevos se diferencia tanto de aquellos

sujetos que experimentan un envejecimiento natural no saludable como de los pacientes VIH+ que experimentan un envejecimiento prematuro.

Las cohortes de longevos han sido utilizadas como cohorte extrema de referencia en estudios de asociación con infarto agudo de miocardio y cáncer de próstata (Balistreri et al. 2009; Balistreri et al. 2008). La utilización de dichas cohortes como referencia ampliaría la potencia del análisis y facilitaría la identificación de factores relacionados con el envejecimiento natural y prematuro.





## CONCLUSIONES





## Genes de respuesta inmune e infección por VIH-1.

1. Variaciones en la región promotora y 3' UTR del *locus BST-2* se asocian con el ritmo de progresión de la infección por VIH-1 en una cohorte de pacientes ADVP. No existen evidencias de asociación de dichas variantes con susceptibilidad a la infección. Los pacientes con diplotipo  $\Delta 19\_G/\Delta 19\_G$  presentan una progresión de la infección más lenta que los pacientes con diplotipo  $\Delta 19\_G/i19\_A$ .
2. Las variaciones en el promotor de *BST-2* tienen efectos funcionales. El ensayo de luciferasa indica que la construcción que incluye el alelo *rs3217318- $\Delta 19$*  presenta una mayor expresión y una mayor respuesta a la inducción por IFN- $\gamma$  que la construcción portadora del alelo *rs3217318-i19*.
3. Las diferencias funcionales de los alelos  $\Delta 19$  e *i19* explican en parte la asociación con progresión. No obstante, cabe esperar que existan variaciones causativas, no identificadas en esta tesis, que también contribuyan a la asociación descrita.
4. Los resultados de asociación genética presentados en esta tesis complementan los estudios experimentales sobre el papel de *BST-2* como factor de restricción en la infección por VIH-1 y refuerzan su papel en el control de la infección.
5. No se ha detectado asociación con progresión de la infección por VIH-1 para las variantes del gen *CYP27B1*, implicado en la síntesis de la vitamina D activa.
6. Las variantes del *locus GC* se asocian con el ritmo de progresión de la infección por VIH-1 en pacientes reclutados entre 1983 y 1996.
7. La variabilidad en la región promotora, codificante y 3'UTR del *locus VDR* se asocia con el ritmo de progresión de la infección por VIH-1. Considerando un modelo aditivo, el incremento en la puntuación de riesgo genético acumulado para el *locus VDR* se correlaciona directamente con progresión.
8. Las variaciones del *locus VDR* asociadas con progresión son aquellas que comportan una mayor capacidad de respuesta a la vitamina D. En el contexto de la infección por VIH-1 la activación local de la respuesta a la vitamina D tendría un componente desfavorable.

9. El incremento de la significación de la asociación con progresión de las variantes de los *loci* *BST-2* y *VDR* en el grupo de pacientes reclutados en el periodo pre-TARGA (1983 y 1996) y la asociación de variantes del *locus* *GC* detectada exclusivamente en dicho grupo, indican que el efecto del genotipo sobre la progresión es máximo en los pacientes que recibieron tratamiento pre-TARGA, mientras que éste queda diluido en los pacientes reclutados a partir de 1997, debido a la eficacia del tratamiento TARGA.

Genes de respuesta inmune y envejecimiento natural.

10. La variabilidad del *locus* *VDR* se asocia con envejecimiento natural en hombres. El haplotipo *GS* de la región 3'UTR y el haplotipo extendido *GGCGS* pueden considerarse como factores favorables para un envejecimiento saludable en hombres.
11. La ausencia de asociación de variantes del *locus* *VDR* con envejecimiento natural en mujeres indica una menor dependencia de genotipo del envejecimiento en mujeres.
12. Los haplotipos del *locus* *VDR* asociados con envejecimiento saludable son aquellos que confieren una capacidad de respuesta intermedia a la vitamina D. Tanto un exceso como un defecto en la acción mediada por la vitamina D pueden tener efectos adversos en el envejecimiento. Los sujetos que alcanzan un envejecimiento saludable son aquellos que presentan una respuesta intermedia a la vitamina D.
13. No se ha detectado asociación con envejecimiento natural para la variante *CCR5-Δ32* del gen *CCR5*. No obstante, la mayor prevalencia del alelo *CCR5-Δ32* en longevos, en el límite de significación, justifica la realización de estudios adicionales con una mayor potencia estadística.
14. La variabilidad del *locus* *RANTES* se asocia con envejecimiento natural de forma diferencial en hombres y mujeres. En hombres, el haplotipo asociado a longevidad tiene un efecto proinflamatorio (haplotipo *AT*), mientras que en mujeres, el haplotipo asociado a longevidad tiene un efecto anti-inflamatorio (haplotipo *GC*).

# BIBLIOGRAFÍA





**- A -**

- Adams J (2006) Vitamin D as a defensin. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:344–346.
- Adams J, Gacad MA (1985) Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J Exp Med* 161:755–765.
- Adams JS, Hewison M (2008) Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:80–90.
- Adorini L, Giarratana N, Penna G (2004) Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol* 16:127–134.
- Agrawal A, Agrawal S, Cao J-N, et al. (2007) Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol* 178:6912–6922.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675–680.
- Alagarasu K, Selvaraj P, Swaminathan S, et al. (2009) 5′ regulatory and 3′ untranslated region polymorphisms of vitamin D receptor gene in south Indian HIV and HIV-TB patients. *J Clin Immunol* 29:196–204.
- Alonso A, Montesino M, Iturralde MJ, et al. (1990) GC subtyping and HIV infection in a Spanish population: no evidence of an association between GC subtypes and AIDS. *Hum Hered* 40(1):34–37.
- An P, Nelson GW, Wang L, et al. (2002) Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10002–10007.
- Andrew AJ, Miyagi E, Kao S, Strebel K (2009) The formation of cysteine-linked dimers of BST-2/tetherin is important for inhibition of HIV-1 virus release but not for sensitivity to Vpu. *Retrovirology* 6:80–96.
- Anonymous. (1987) Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR Atlanta* 14;36(1S):1S–15S.
- Anonymous. (1993) 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 41:961–963.
- Antal AS, Dombrowski Y, Koglin S, et al. (2011) Impact of vitamin D3 on cutaneous immunity and antimicrobial peptide expression. *Int J Hyg Environ Health* 3:17–21.
- Anzala OA, Nagelkerke NJ, Bwayo JJ, et al. (1995) Rapid progression to disease in African sex workers with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 171:686–689.
- Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, et al. (2001a) The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res* 16:1256–1264.



- Arai Y, Hirose N, Yamamura K, et al. (2001b) Serum insulin-like growth factor-1 in centenarians: implications of IGF-1 as a rapid turnover protein. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:M79–82.
- Austad SN (2009) Comparative biology of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64:199–201.
- Austad SN (2006) Why women live longer than men: sex differences in longevity. *Gender medicine : official journal of the Partnership for Gender-Specific Medicine at Columbia University* 3:79–92.

## - B -

- Baggio G, Donazzan S, Monti D, et al. (1998) Lipoprotein(a) and lipoprotein profile in healthy centenarians: a reappraisal of vascular risk factors. *FASEB J* 12:433–437.
- Bailey R, Cooper JD, Zeitels L, et al. (2007) Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes* 56:2616–2621.
- Balistreri CR, Candore G, Caruso M, et al. (2008) Role of polymorphisms of CC-chemokine receptor-5 gene in acute myocardial infarction and biological implications for longevity. *Haematologica* 93:637–638.
- Balistreri CR, Carruba G, Calabrò M, et al. (2009) CCR5 proinflammatory allele in prostate cancer risk: a pilot study in patients and centenarians from Sicily. *Ann N Y Acad Sci* 1155:289–292.
- Barber Y, Rubio C, Fernández E, et al. (2001) Host genetic background at CCR5 chemokine receptor and vitamin D receptor loci and human immunodeficiency virus (HIV) type 1 disease progression among HIV-seropositive injection drug users. *J Infect Dis* 184:1279–1288.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265.
- Bartnof HS (1995) Long-term non-progressors, survivors and HIV positives. *BETA* 29–32.
- Beatty JS, Sukiennicki TL, Nepom GT (1999) Allelic variation in transcription modulates MHC class II expression and function. *Microbes and Infection* 1(11):919–927.
- Bella Della S, Bierti L, Presicce P, et al. (2007) Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. *Clin Immunol* 122:220–228.
- Bellamy RJ, Hill AVS (1998) Host genetic susceptibility to human tuberculosis. *Novartis Found Symp* 217:3–13; discussion 13–23.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657–700.
- Bhushan M, Cumberbatch M, Dearman RJ, et al. (2002) Tumour necrosis factor-alpha-induced migration of human Langerhans cells: the influence of ageing. *Br J Dermatol* 146:32–40.
- Bodineau A, Coulomb B, Folliguet M, et al. (2007) Do Langerhans cells behave similarly in elderly and younger patients with chronic periodontitis? *Arch Oral Biol* 52:189–194.

- Bonafè M, Olivieri F, Cavallone L, et al. (2001) A gender--dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 31:2357-2361.
- Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. (2001) 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 167:4974-4980.
- Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, et al. (1999) NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol* 34:253-265.
- Brand D, Srinivasan K, Sodroski J (1995) Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein. *J Virol* 69:166-171.
- Brennan A, Katz DR, Nunn JD, et al. (1987) Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology* 61:457-461.
- Broder CC, Berger EA (1993) CD4 molecules with a diversity of mutations encompassing the CDR3 region efficiently support human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion. *J Virol* 67:913-926.
- Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, et al. (1999) A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54:M357-364.
- Burns EA, Goodwin JS (1997) Immunodeficiency of aging. *Drugs Aging* 11:374-397.

## - C -

- Candore G, Balistreri CR, Listi F, et al. (2006) Immunogenetics, gender, and longevity. *Ann N Y Acad Sci* 1089:516-537.
- Capri M, Salvioli S, Monti D, et al. (2008) Human longevity within an evolutionary perspective: the peculiar paradigm of a post-reproductive genetics. *Exp Gerontol* 43:53-60.
- Carrieri G, Marzi E, Olivieri F, et al. (2004) The G/C915 polymorphism of transforming growth factor beta1 is associated with human longevity: a study in Italian centenarians. *Aging Cell* 3:443-448.
- Carrington M, Nelson GW, Martin MP, et al. (1999) HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science* 283:1748-1752.
- Chan DC, Kim PS (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* 93:681-684.
- Chen TC, Chimeh F, Lu Z, et al. (2007) Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 460:213-217.
- Chiricolo M, Bartolini G, Orlandi M, et al. (1986) Prostaglandin and thromboxane biosynthesis in resting and activated platelet-free monocytes from aged subjects. *Gerontology* 32:69-73.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85:1135-1148.

- Christensen K, Johnson TE, Vaupel JW (2006) The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. *Nat Rev Genet* 7:436–448.
- Clerici M, Levin JM, Kessler HA, et al. (1994) HIV-specific T-helper activity in seronegative health care workers exposed to contaminated blood. *JAMA* 271:42–46.
- Cleve H, Weidinger S, Gürtler LG, Deinhardt F (1988) AIDS: no association with the genetic systems GC (D-binding protein), ORM (orosomuroid = alpha-1-acid glycoprotein), and A2HS (alpha-2-HS-glycoprotein). *Infection* 16(1):31–35.
- Cohen J (2004) Medicine. Microbicide shuts the door on HIV. *Science* 306:387.
- Courtenay MD, Gilbert JR, Jiang L, et al. (2012) Mitochondrial haplogroup X is associated with successful aging in the Amish. *Hum Genet* 131:201–208.
- Cozzolino M, Vidal M, Arcidiacono MV, Tebas P, Yarasheski KE, Dusso AS (2003) HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D. *AIDS* 17(4):513–520.
- Cross HS, Bareis P, Hofer H, et al. (2001) 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 66:287–292.

## - D -

- Dam TN, Møller B, Hindkjaer J, Kragballe K (1996) The vitamin D3 analog calcipotriol suppresses the number and antigen-presenting function of Langerhans cells in normal human skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1:72–77.
- Danescu LG, Levy S, Levy J (2009) Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine* 35:11–17.
- Dasari P, Nicholson IC, Zola H (2008) Toll-like receptors. *J Biol Regul Homeost Agents* 22:17–26.
- Daugherty BL (1996) Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *Journal of Experimental Medicine* 183:2349–2354.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L (2006) Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol* 80:219–227.
- Deeks SG, Walker BD (2007) Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *J Virol* 81:406–416.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661–666.
- Desai S, Landay A (2010) Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep* 7:4–10.
- Di Bona D, Vasto S, Capurso C, et al. (2009) Effect of interleukin-6 polymorphisms on human longevity: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* 8:36–42.

- Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, et al. (2008) Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 168:1340–1349.
- Donlon TA, Krensky AM, Wallace MR, et al. (1990) Localization of a human T-cell-specific gene, RANTES (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* 6:548–553.
- Douglas JL, Viswanathan K, McCarroll MN, Gustin JK, Früh K, Moses AV (2009) Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta}TrCP-dependent mechanism. *J Virol* 83(16):7931–7947.

## - E -

- Eales LJ, Nye KE, Parkin JM, et al. (1987) Association of different allelic forms of group specific component with susceptibility to and clinical manifestation of human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 1(8540):999–1002.
- Edwards DL, Avis FP (1979) Antibody-dependent cellular cytotoxicity effector cell capability among normal individuals. *J Immunol* 123:1887–1893.
- Erikson E, Adam T, Schmidt S, et al. (2011) In vivo expression profile of the antiviral restriction factor and tumor-targeting antigen CD317/BST-2/HM1.24/tetherin in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(33):13688–13693.
- Eskes T, Haanen C (2007) Why do women live longer than men? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 133:126–133.
- Evans DT, Serra-Moreno R, Singh RK, Guatelli JC (2010) BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends Microbiol* 18:388–396.

## - F -

- Fahey JL, Taylor JM, Detels R, et al. (1990) The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 322:166–172.
- Fang Y, van Meurs JBJ, d'Alesio A, et al. (2005) Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet* 77:807–823.
- Fellay J, Shianna KV, Ge D, et al. (2007) A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 317:944–947.
- Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, et al. (1995) Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50:B378–382.
- Fernandes G, Gupta S (1981) Natural killing and antibody-dependent cytotoxicity by lymphocyte subpopulations in young and aging humans. *J Clin Immunol* 1:141–148.
- Fibla J, Caruz A (2010) Vitamin D and HIV infection. *Soluble Factors Mediating Immune Response to HIV Infection*. Bentham eBooks 180–229.

- Fietta A, Merlini C, Santos Dos C, et al. (1994) Influence of aging on some specific and nonspecific mechanisms of the host defense system in 146 healthy subjects. *Gerontology* 40:237–245.
- Fitzpatrick K, Skasko M, Deerinck TJ, et al. (2010) Direct restriction of virus release and incorporation of the interferon-induced protein BST-2 into HIV-1 particles. *PLoS Pathog* 6:e1000701.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, et al. (2000a) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244–254.
- Franceschi C, Motta L, Valensin S, et al. (2000b) Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? Italian Multicenter Study on Centenarians (IMUSCE). *Aging (Milano)* 12:77–84.
- Franceschi C, Valensin S, Bonafè M, et al. (2000c) The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 35:879–896.
- Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, et al. (1999) Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol* 34:911–921.
- Freund JN, Domon-Dell C, Kedinger M, Duluc I (1998) The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem Cell Biol* 76:957–969.
- Fulop T, Larbi A, Douziech N, et al. (2004) Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 3:217–226.

## - G -

- Gade-Andavolu R, Comings DE, MacMurray J, et al. (2004) RANTES: a genetic risk marker for multiple sclerosis. *Mult Scler* 10:536–539.
- Galli G, Annunziato F, Cosmi L, et al. (2001) Th1 and th2 responses, HIV-1 coreceptors, and HIV-1 infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 15:308–313.
- García-Moruja C, Alonso-Lobo JM, Rueda P, et al. (2005) Functional characterization of SDF-1 proximal promoter. *J Mol Biol* 348:43–62.
- Garland CF, Gorham ED, Mohr SB (2009) Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* 19:468–483.
- Gauzzi MC, Purificato C, Donato K, et al. (2005) Suppressive effect of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J Immunol* 174:270–276.
- Gelderblom HR (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5:617–637.
- Ghanekar SA, Stranford SA, Ong JC, et al. (2001) Decreased HIV-specific CD4 T cell proliferation in long-term HIV-infected individuals on antiretroviral therapy. *AIDS* 15:1885–1887.

- Giacconi R, Cipriano C, Albanese F, et al. (2004) The -174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Exp Gerontol* 39:621–628.
- Giovannini L, Panichi V, Migliori M, et al. (2001) 1,25-dihydroxyvitamin D(3) dose-dependently inhibits LPS-induced cytokines production in PBMC modulating intracellular calcium. *Transplant Proc* 33:2366–2368.
- Gläser R, Navid F, Schuller W, et al. (2009) UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123:1117–1123.
- Goffinet C, Schmidt S, Kern C, et al. (2010) Endogenous CD317/Tetherin limits replication of HIV-1 and murine leukemia virus in rodent cells and is resistant to antagonists from primate viruses. *J Virol* 84:11374–11384.
- Gomez CR, Boehmer ED, Kovacs EJ (2005) The aging innate immune system. *Curr Opin Immunol* 17:457–462.
- Gomez CR, Nomellini V, Faunce DE, Kovacs EJ (2008) Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* 43:718–728.
- Gonzalez ER, Benavides FG, Mestre JB (1996) La transición sanitaria en España desde 1900 a 1990. *Rev Esp Salud pública* 70:221–233.
- Gouni-Berthold I, Krone W, Berthold HK (2009) Vitamin D and cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 7:414–422.
- Gregori S, Giarratana N, Smioldo S, et al. (2002) A 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 51:1367–1374.
- Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, et al. (1996) The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 11:1850–1855.

## - H -

- Habermann A, Krijnse-Locker J, Oberwinkler H, et al. (2010) CD317/tetherin is enriched in the HIV-1 envelope and downregulated from the plasma membrane upon virus infection. *J Virol* 84:4646–4658.
- Halsall JA, Osborne JE, Potter L, et al. (2004) A novel polymorphism in the 1A promoter region of the vitamin D receptor is associated with altered susceptibility and prognosis in malignant melanoma. *Br J Cancer* 91:765–770.
- Hammonds J, Wang J-J, Yi H, Spearman P (2010) Immunoelectron microscopic evidence for Tetherin/BST2 as the physical bridge between HIV-1 virions and the plasma membrane. *PLoS Pathog* 6:e1000749.
- Hart PH, Grimbaldston MA, Hosszu EK, et al. (1999) Age-related changes in dermal mast cell prevalence in BALB/c mice: functional importance and correlation with dermal mast cell expression of Kit. *Immunology* 98:352–356.

- Haug CJ, Müller F, Aukrust P, Froland SS (1994) Subnormal serum concentration of 1,25-vitamin D in human immunodeficiency virus infection: correlation with degree of immune deficiency and survival. *J Infect Dis* 169(4):889–893.
- Hauser H, Lopez LA, Yang SJ, et al. (2010) HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment. *Retrovirology* 7:51.
- Hayes DP (2010) Vitamin D and ageing. *Biogerontology* 11:1–16.
- Heaney RP (2008) Vitamin D: criteria for safety and efficacy. *Nutr Rev* 66:S178–181.
- Hewison M, Burke F, Evans KN, et al. (2007) Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:316–321.
- Hewison M (2012) An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol* 76(3):315–325.
- Hinz A, Miguet N, Natrajan G, et al. (2010) Structural basis of HIV-1 tethering to membranes by the BST-2/tetherin ectodomain. *Cell Host Microbe* 7:314–323.
- Hitt R, Young-Xu Y, Silver M, Perls T (1999) Centenarians: the older you get, the healthier you have been. *Lancet* 354:652.
- Hizawa N, Yamaguchi E, Konno S, et al. (2002) A functional polymorphism in the RANTES gene promoter is associated with the development of late-onset asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 166:686–690.
- Ho C, Lee S, Wong K, Cheng L, Lam M (2007) Setting a minimum threshold CD4 count for initiation of highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *HIV Med* 8(3):181–185.
- Holick MF (1981) The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol* 77:51–58.
- Holick MF (2005) Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. *South Med J* 98:1024–1027.
- Holick MF, Chen TC (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87:1080S–1086S.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, et al. (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421:182–187.
- Homann S, Smith D, Little S, Richman D, Guatelli JC (2011) Upregulation of BST-2/Tetherin by HIV infection in vivo. *J Virol* 85(20):10659–10668.
- Honda Y, Honda S (2002) Oxidative stress and life span determination in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 959:466–474.
- Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, et al. (2011) Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474(7353):658–661.
- Huang DC, Papavasiliou V, Rhim JS, et al. (2002) Targeted disruption of the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in ras-transformed keratinocytes demonstrates that locally produced 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses growth and induces differentiation in an autocrine fashion. *Mol Cancer Res* 1:56–67.

**- I -**

Ingles SA, Haile RW, Henderson BE, et al. (1997a) Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidem Biomark* 6:93–98.

Ingles SA, Ross RK, Yu MC, et al. (1997b) Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst* 89:166–170.

Ishikawa J, Kaisho T, Tomizawa H, et al. (1995) Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics* 26(3):527–534.

**- J -**

Jones KL, Maguire JJ, Davenport AP (2011) Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 162:1453–1469.

Jouvenet N, Neil S, Zhadina M, et al. (2009) Broad-Spectrum Inhibition of Retroviral and Filoviral Particle Release by Tetherin. *J Virol* 83:1837–1844.

Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, et al. (2000) The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol* 14:401–420.

**- K -**

Kaletsky RL, Francica JR, Agrawal-Gamse C, Bates P (2009) Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2886–2891.

Kaslow RA, Carrington M, Apple R, et al. (1996) Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 2:405–411.

Kaslow RA, Dorak T, Tang JJ (2005) Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. *J Infect Dis* 191 Suppl 1:S68–77.

Kasper JD, Shapiro S, Guralnik JM, et al. (1999) Designing a community study of moderately to severely disabled older women: the Women's Health and Aging Study. *Ann Epidemiol* 9:498–507.

Keisala T, Minasyan A, Lou Y-R, et al. (2009) Premature aging in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem* 115:91–97.

Kidd P (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8:223–246.

Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, et al. (2004) Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432:769–775.



- Kirkwood TB, Kowald A (1997) Network theory of aging. *Exp Gerontol* 32:395–399.
- Krishnaraj R, Bhooma T (1996) Cytokine sensitivity of human NK cells during immunosenescence. 2. IL2-induced interferon gamma secretion. *Immunol Lett* 50:59–63.

## - L -

- Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. (2011) SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474(7353):654–657.
- Lamberg-Allardt C (2006) Vitamin D in foods and as supplements. *Prog Biophys Mol Biol* 92:33–38.
- Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, et al. (2011) Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol* 54:887–893.
- Lanske B, Razzaque MS (2007) Vitamin D and aging: old concepts and new insights. *J Nutr Biochem* 18:771–777.
- Laplana M, Sanchez-de-la-Torre M, Aguiló A, et al. Tagging long-lived individuals through vitamin-D receptor (VDR) haplotypes. *Biogerontology* 11(4):437–446.
- Laplana M, Fibla J (2012) Distribution of functional polymorphic variants of inflammation-related genes RANTES and CCR5 in long-lived individuals. *Cytokine* 58:10–13.
- Lash RW, Nicholson JM, Velez L, et al. (2009) Diagnosis and management of osteoporosis. *Prim Care* 36(1):181–198.
- Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, et al. (2004) Female premenopausal fracture risk is associated with gc phenotype. *J Bone Miner Res* 19:875–881.
- Lee H-C, Wei Y-H (2012) Mitochondria and aging. *Adv Exp Med Biol* 942:311–327
- Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL (1995) Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 125:1704S–1708S.
- Leng S, Xue Q-L, Huang Y, et al. (2005) Total and differential white blood cell counts and their associations with circulating interleukin-6 levels in community-dwelling older women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60:195–199.
- Lewontin RC (1988) On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120:849–852.
- Li F, Jiang L, Willis-Owen SA, et al. (2011) Vitamin D binding protein variants associate with asthma susceptibility in the Chinese Han population. *BMC Med Genet* 12:103.
- Licastro F, Candore G, Lio D, et al. (2005) Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun ageing* 2:8.
- Lio D, Scola L, Crivello A, et al. (2002a) Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun* 3:30–33.

- Lio D, Scola L, Crivello A, et al. (2002b) Allele frequencies of +874T-->A single nucleotide polymorphism at the first intron of interferon-gamma gene in a group of Italian centenarians. *Exp Gerontol* 37:315–319.
- Lio D, Scola L, Crivello A, et al. (2003) Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 -1082 promoter SNP and its interaction with TNF-alpha -308 promoter SNP. *J Med Genet* 40:296–299.
- Lips P (2006) Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92:4–8.
- Lopez LA, Yang SY, Hauser H, et al. (2010) Ebola virus glycoprotein counteracts BST-2/Tetherin restriction in a sequence-independent manner that does not require Tetherin surface removal. *J Virol* 84:7243–7255.
- Liu PT, Stenger S, Li H, et al. (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311:1770–1773
- Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367–377.
- Lloberas J, Celada A (2002) Effect of aging on macrophage function. *Exp Gerontol* 37:1325–1331.
- Lopez ER, Zwermann O, Segni M, et al. (2004) A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. *Eur J Endocrinol* 151:193–197.

## - M -

- Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ (1996) CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol* 26:315–319.
- Mahbub S, Brubaker AL, Kovacs EJ (2011) Aging of the Innate Immune System: An Update. *Curr Immunol Rev* 7:104–115.
- Majumder B, Janket ML, Schafer EA, et al. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr impairs dendritic cell maturation and T-cell activation: implications for viral immune escape. *J Virol* 79:7990–8003.
- Mangus DA, Evans MC, Jacobson A (2003) Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4(7):223.
- Mannucci PM, Mari D, Merati G, et al. (1997) Gene polymorphisms predicting high plasma levels of coagulation and fibrinolysis proteins. A study in centenarians. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:755–759.
- Mari D, Mannucci PM, Coppola R, et al. (1995) Hypercoagulability in centenarians: the paradox of successful aging. *Blood* 85:3144–3149.
- Mari D, Mannucci PM, Duca F, et al. (1996) Mutant factor V (Arg506Gln) in healthy centenarians. *Lancet* 347:1044.

- Mariani E, Meneghetti A, Neri S, et al. (2002) Chemokine production by natural killer cells from nonagenarians. *Eur J Immunol* 32:1524–1529.
- Mariani E, Pulsatelli L, Meneghetti A, et al. (2001) Different IL-8 production by T and NK lymphocytes in elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 122:1383–1395.
- Martin-Serrano J, Neil SJD (2011) Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat Rev Micro* 9:519–531.
- Martineau AR, Leandro ACCS, Anderson ST, et al. (2010) Association between Gc genotype and susceptibility to TB is dependent on vitamin D status. *Eur Respir J* 35(5):1106–1012.
- Mathur SK, Schwantes EA, Jarjour NN, Busse WW (2008) Age-related changes in eosinophil function in human subjects. *Chest* 133:412–419.
- McMichael AJ, Rowland-Jones SL (2001) Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410:980–987.
- Milde P, Hauser U, Simon T, et al. (1991) Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 97:230–239.
- Minsky M (1994) Will robots inherit the earth? *Sci Am* 271:108–113.
- Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R, et al. (2003) Metallothioneins/PARP-1/IL-6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply. *Mech Ageing Dev* 124:459–468.
- Montagna W, Carlisle K (1990) Structural changes in ageing skin. *Br J Dermatol* 122 Suppl 35:61–70.
- Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. (1994) Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367:284–287.
- Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA (1992) Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6665–6669.
- Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, et al. (1985) Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313:450–458.
- Muthian G, Raikwar HP, Rajasingh J, Bright JJ (2006) 1,25 Dihydroxyvitamin-D3 modulates JAK-STAT pathway in IL-12/IFN $\gamma$  axis leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 83:1299–1309.

## - N -

- Neil SJD, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD (2006) HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2(5):e39.
- Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425–430.

- Nejentsev S, Godfrey L, Snook H, et al. (2004) Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. *Hum Mol Genet* 13:1633–1639.
- Nguyen M, Pace AJ, Koller BH (2005) Age-induced reprogramming of mast cell degranulation. *J Immunol* 175:5701–5707.
- Nieto G, Barber Y, Rubio MC, et al. (2004) Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:199–207.
- Norris PJ, Rosenberg ES (2001) Cellular immune response to human immunodeficiency virus. *AIDS* 15 Suppl 2:S16–21.
- Nyholt DR (2004) A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 74:765–769.

## - O -

- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, et al. (1996) The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382:833–835.
- Ogawa T, Kitagawa M, Hirokawa K (2000) Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. *Mech Ageing Dev* 117:57–68.
- Ohtomo T, Sugamata Y, Ozaki Y, et al. (1999) Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 258:583–591.
- Omdahl JL, Gray RW, Boyle IT, et al. (1972) Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium. *Nature New Biol* 237:63–64.
- Ozel M, Pauli G, Gelderblom HR (1988) The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch Virol* 100:255–266.

## - P -

- Panda A, Arjona A, Sapey E, et al. (2009) Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 30:325–333.
- Paolisso G, Ammendola S, Del Buono A, et al. (1997) Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy centenarians: relationship with plasma leptin and lipid concentrations, insulin action, and cognitive function. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2204–2209.
- Pascual G, Mendieta C, García-Honduvilla N, et al. (2007) TGF-beta1 upregulation in the aging varicose vein. *J Vasc Res* 44:192–201.

- Peralbo E, Alonso C, Solana R (2007) Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: two different T cell subsets that are differentially affected by ageing. *Exp Gerontol* 42:703–708.
- Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, et al. (2009) Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 139:499–511.
- Philip J R, Goulder, Watkins DI (2008) Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nature reviews Immunology* 8:619–630.
- Pike JW (1991) Vitamin D3 receptors: structure and function in transcription. *Annu Rev Nutr* 11:189–216.
- Pilz S, Dobnig H, Nijpels G, et al. (2009) Vitamin D and mortality in older men and women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71:666–672.
- Pinós T, Nogales-Gadea G, Ruiz JR, et al. (2012) Are mitochondrial haplogroups associated with extreme longevity? A study on a Spanish cohort. *Age* 34:227–233.
- Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ (2004) Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol* 76:291–299.
- Plenge R, Rioux JD (2006) Identifying susceptibility genes for immunological disorders: patterns, power, and proof. *Immunol Rev* 210:40–51.
- Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, et al. (2004) Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 3:161–167.
- Potteaux S, Combadiere C, Esposito B, et al. (2006) Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol* 26:1858–1863.
- Proudfoot AEI (2000) The BBXB Motif of RANTES Is the Principal Site for Heparin Binding and Controls Receptor Selectivity. *J Biol Chem* 276:10620–10626.
- Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC (1983) 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science* 221:1181–1183.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81:559–575.

## - R -

- Razzaque MS, Lanske B (2006) Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice. *Trends Mol Med* 12:298–305.
- Rea IM, Middleton D (1994) Is the phenotypic combination A1B8Cw7DR3 a marker for male longevity? *J Am Geriatr Soc* 42:978–983.
- Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH (2000) Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 21:479–483.
- Rockman MV, Wray GA (2002) Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol Biol Evol* 19:1991–2004.

- Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, et al. (2009) A CD317/tetherin-RICH2 complex plays a critical role in the organization of the subapical actin cytoskeleton in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 184:721–736.
- Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, et al. (2007) Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif. *Journal of Cell Science* 120:3850–3858.
- Romagnani S, Del Prete G, Manetti R, et al. (1994) Role of TH1/TH2 cytokines in HIV infection. *Immunol Rev* 140:73–92.
- Rowe PM (1996) A cofactor for HIV-1 entry into cells is identified. *Lancet* 347(9012):1395.

## - S -

- Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. (2006) Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* 36:361–370.
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, et al. (1996) Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722–725.
- Sanchez-de-la-Torre M, Torres C, Nieto G, et al. (2008) Vitamin D receptor gene haplotypes and susceptibility to HIV-1 infection in injection drug users. *J Infect Dis* 197:405–410.
- Saunders RDC, Boubriak I, Clancy DJ, Cox LS (2008) Identification and characterization of a Drosophila ortholog of WRN exonuclease that is required to maintain genome integrity. *Aging Cell* 7:418–425.
- Sauter D, Schindler M, Specht A, et al. (2009) Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe* 6:409–421.
- Schubert HL, Zhai Q, Sandrin V, et al. (2010) Structural and functional studies on the extracellular domain of BST2/tetherin in reduced and oxidized conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17951–17956.
- Schwarz T (2009) The Dark and the Sunny Sides of UVR-Induced Immunosuppression: Photoimmunology Revisited. *Journal of Investigative Dermatology* 130:49–54.
- Sebastián C, Espia M, Serra M, et al. (2005) Macrophage Aging: a cellular and molecular review. *Immunobiology* 210:121–126.
- Shodell M, Siegal FP (2002) Circulating, interferon-producing plasmacytoid dendritic cells decline during human ageing. *Scand J Immunol* 56:518–521.
- Shroff R, Egerton M, Bridel M, et al. (2008) A bimodal association of vitamin D levels and vascular disease in children on dialysis. *J Am Soc Nephrol* 19:1239–1246.
- Singh VK, Mehrotra S, Agarwal SS (1999) The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy. *Immunol Res* 20:147–161.

- Skytthe A, Pedersen NL, Kaprio J, et al. (2003) Longevity studies in GenomEUtwin. *Twin Res* 6:448–454.
- Slagboom PE, Beekman M, Passtoors WM, et al. (2010) Genomics of human longevity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366:35–42.
- Slimani H, Charnaux N, Mbemba E, et al. (2003) Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1617:80–88.
- Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, et al. (2012) HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci Transl Med* 4(123):123ra25.
- Solana R, Mariani E (2000) NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 18:1613–1620.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978–989.
- Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, et al. (2001) Diverging binding capacities of natural LD78beta isoforms of macrophage inflammatory protein-1alpha to the CC chemokine receptors 1, 3 and 5 affect their anti-HIV-1 activity and chemotactic potencies for neutrophils and eosinophils. *Eur J Immunol* 31:2170–2178.
- Sullivan KM, Dean A, Soe MM (2009) OpenEpi: A Web-based Epidemiologic and Statistical Calculator for Public Health. *Public Health Reports* 124:471–474.

## - T -

- Terry DF, Wilcox MA, McCormick MA, et al. (2004) Lower all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in centenarians' offspring. *J Am Geriatr Soc* 52:2074–2076.
- The International HIV Controllers Study (2010) The Major Genetic Determinants of HIV-1 Control Affect HLA Class I Peptide Presentation. *Science* 330:1551–1557.
- Thursz MR, Thomas HC, Greenwood BM, Hill AVS (1997) Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection. *Nat Genet* 17:11–12.
- Torres C, Sanchez-de-la-Torre M, García-Moruja C, et al. (2010) Immunophenotype of vitamin D receptor polymorphism associated to risk of HIV-1 infection and rate of disease progression. *Curr HIV Res* 8:487–492.
- Tortorella C, Simone O, Piazzolla G, et al. (2007) Age-related impairment of GM-CSF-induced signalling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins. *Ageing Res Rev* 6:81–93.
- Tuohimaa P (2009) Vitamin D and aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* 114:78–84.
- Tuohimaa P, Tenkanen L, Ahonen M, et al. (2004) Both high and low levels of blood vitamin D are associated with a higher prostate cancer risk: a longitudinal, nested case-control study in the Nordic countries. *Int J Cancer* 108:104–108.

**- U -**

- Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, et al. (2004a) Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338:143–156.
- Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, et al. (2004b) Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:187–193.

**- V -**

- Van Damme N, Goff D, Katsura C, et al. (2008) The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3:245–252.
- Van den Biggelaar AHJ, Huizinga TWJ, de Craen AJM, et al. (2004) Impaired innate immunity predicts frailty in old age. The Leiden 85-plus study. *Exp Gerontol* 39:1407–1414.
- Van Duin D, Mohanty S, Thomas V, et al. (2007) Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *J Immunol* 178:970–975.
- VB Hjelmberg J, Iachine I, Skytthe A, et al. (2006) Genetic influence on human lifespan and longevity. *Hum Genet* 119:312–321.
- Veldman CM, Cantorna MT, Deluca HF (2000) Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 374:334–338.
- Vignola AM, Bonanno A, Profita M, et al. (2003) Effect of age and asthma duration upon elastase and alpha1-antitrypsin levels in adult asthmatics. *Eur Respir J* 22:795–801.
- Visser M, Deeg DJH, Lips P, Longitudinal Aging Study Amsterdam (2003) Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5766–5772.

**- W -**

- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B (2009) The aging of the immune system. *Transpl Int* 22:1041–1050.
- Westendorp RGJ, van Heemst D, Rozing MP, et al. (2009) Nonagenarian siblings and their offspring display lower risk of mortality and morbidity than sporadic nonagenarians: The Leiden Longevity Study. *J Am Geriatr Soc* 57:1634–1637.
- Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, et al. (2001) Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 177:145–159.
- Wilke RA, Simpson RU, Mukesh BN, et al. (2009) Genetic variation in CYP27B1 is associated with congestive heart failure in patients with hypertension. *Pharmacogenomics* 10(11):1789-1797.



- Wingard DL (1984) The sex differential in morbidity, mortality, and lifestyle. *Annu Rev Public Health* 5:433–458.
- Wolf D, Goff SP (2008) Host restriction factors blocking retroviral replication. *Annu Rev Genet* 42:143–163.
- Wu L, Gerard NP, Wyatt R, et al. (1996) CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384:179–183.

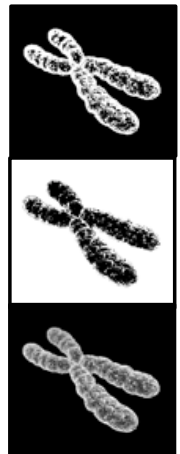
## **- Y -**

- Yamamoto H, Miyamoto K, Li B, et al. (1999) The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *J Bone Miner Res* 14:240–247.
- Yamamoto N, Ushijima N, Koga Y (2009) Immunotherapy of HIV-infected patients with Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF). *J Med Virol* 81(1):16–26.
- Yang H, Wang J, Jia X, et al. (2010) Structural insight into the mechanisms of enveloped virus tethering by tetherin. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18428–18432.
- Yang Y, Kozloski M (2011) Sex differences in age trajectories of physiological dysregulation: inflammation, metabolic syndrome, and allostatic load. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66:493–500.

## **- Z -**

- Zhang J, Liang C (2010) BST-2 diminishes HIV-1 infectivity. *J Virol* 84(23):12336–12343.
- Zehnder D, Bland R, Chana RS, et al. (2002) Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* 13:621–629.
- Zhernakova A, Alizadeh BZ, Eerligh P et al. (2006) Genetic variants of RANTES are associated with serum RANTES level and protection for type 1 diabetes. *Genes Immun* 7:544-549.
- Zhou L, Zhang X, Chen X, et al. (2012) GC Glu416Asp and Thr420Lys polymorphisms contribute to gastrointestinal cancer susceptibility in a Chinese population. *Int J Clin Exp Med* 5(1):72–79.

**ANEXO**



**ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS**



Laplana M, Sánchez-de-la-Torre M, Aguiló A, Casado I, Flores M, Sánchez-Pellicer R, et al. [Tagging long-lived individuals through vitamin-D receptor \(VDR\) haplotypes](#). Biogerontology. 2010; 11(4): 437-46. DOI 10.1007/s10522-010-9273-8

Laplana M, Fibla J. [Distribution of functional polymorphic variants of inflammation-related genes RANTES and CCR5 in long-lived individuals](#). Cytokine. 2012; 58(1): 10-3. DOI 10.1016/j.cyto.2011.12.021

Laplana M, Caruz A, Pineda JA, Puig T, Fibla J. Association of BST-2 gene variants with HIV disease progression underscores the role of BST-2 in HIV type 1 infection. J Infect Dis. 2013; 207(3): 411-9. DOI 10.1093/infdis/jis685

Biogerontology (2010) 11:437–446  
DOI 10.1007/s10522-010-9273-8

RESEARCH ARTICLE

## Tagging long-lived individuals through vitamin-D receptor (VDR) haplotypes

Marina Laplana · Manuel Sánchez-de-la-Torre ·  
Alicia Aguiló · Ignasi Casado · Miquel Flores ·  
Ramon Sánchez-Pellicer · Joan Fibla

Received: 31 January 2010 / Accepted: 6 April 2010 / Published online: 21 April 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** Longevity is a complex phenomenon involving multiple environmental and biological factors. Genetic studies of longevity have focussed on DNA repair, oxidative damage correction and immune-related genes. Vitamin-D works by modulating mineral homeostasis and key physiological processes such as cell proliferation and immune response. Vitamin-D insufficiency has been largely considered a risk factor for life-limiting illnesses including cardiovascular and immune-related diseases and cancer. Vitamin-D acts through vitamin-D-receptor (VDR), which regulates the expression of vitamin-D-response genes. *VDR* variants have been associated with susceptibility to cancer, bacterial and viral infections, autoimmune diseases, and allergies. In the present study we evaluated *VDR* as candidate gene involved in human longevity. We selected five polymorphisms of the *VDR* gene that capture variability at the 5', coding and 3' regions. Genotype data was obtained from 104 octogenarians (>85 years) and 114 controls (17–40 years). Although differences

in genotype and allele distribution did not reach statistical significance, haplotype distribution was distinctive, mainly for 3' region haplotypes and particularly in males. Our results suggest a role for *VDR* gene variability in aging and longevity.

**Keywords** Vitamin-D · VDR · Haplotypes · Polymorphism · Longevity · Octogenarians

### Introduction

Longevity is a complex phenomenon in which environmental, social, stochastic and biological factors are involved. Maximum lifespan potential of individuals has a strong biological component; population life expectancy is a multifactorial trait based on both biological and non-biological factors. In humans, as in other species, long-lived individuals emerge as a result of a successful life, lack of stochastic damaging factors and healthy aging. Recent socioeconomic improvements and advances in prevention and treatment of diseases have reduced infant mortality as well as allowing individuals to survive to extreme old age. As a result, life expectancy in humans has increased in developed countries, with no effect on maximum lifespan potential. Social and technological improvements have been crucial to increased human longevity, creating a new scenario in which longevity-related biological factors

M. Laplana · M. Sánchez-de-la-Torre · J. Fibla (✉)  
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Unitat de  
Genètica Humana, IRBLleida, Universitat de Lleida,  
C/Montserrat Roig, 2, 25199 Lleida, Spain  
e-mail: joan.fibla@cmb.udl.cat

A. Aguiló · I. Casado · M. Flores · R. Sánchez-Pellicer  
Centre de Salut Balàfia-Pardinyes-Secà, Àrea Bàsica de  
Lleida, Institut Català de la Salut, C/Vidal i Codina, s/n,  
25005 Lleida, Spain

have been able to operate. The aging process has been considered the result of the accumulation of damages in cells and tissues that, left uncorrected, produces a systemic dysfunction concluding in death. Throughout the lifespan, however, cell maintenance mechanisms, such as DNA-repairing enzymes, correction of oxidative damage and immune system response against pathogens and tumour cells, attempt to correct the damage.

Among environmental factors acting on health status, vitamin-D has been largely considered protective and a promoter of good health (Holick and Chen 2008). Pleiotropic effects of vitamin-D have been largely known to affect mineral metabolism, cell proliferation and immune response modulation. Vitamin-D status has been described as involved in life-limiting diseases (Heaney 2008) such as cancer (Garland et al. 2009), cardiovascular diseases (Gouni-Berthold et al. 2009), osteoporosis (Lash et al. 2009), sarcopenia (Roth et al. 2004; Visser et al. 2003) and diabetes (Danescu et al. 2009). In addition, vitamin-D has an important role in the modulation of the immune response, inducing microbicide factors against bacterial infections (Wang et al. 2004) and controlling the exacerbation of the cellular immune response (Deluca and Cantorna 2001). Based on this, it has been proposed a major positive role for vitamin-D in biogerontology by reducing susceptibility in the elderly to chronic degenerative diseases (Hayes 2010).

Sources of vitamin-D come from dietary intake, mainly oily fish such as salmon, mackerel and sardines (Chen et al. 2007) and egg yolks (Lamberg-Allardt 2006), and from endogenous synthesis by photolytic reaction of vitamin-D precursors in the skin (Lips 2006). Both types of sources are strongly linked to environment, such as climate and latitude, and social behaviour, such as daily diet, sun exposure and clothing. In addition, demographic factors must be considered, such as culture habits, gender and age, which act in several ways to change social behaviour as well as race, which is related to melanin pigmentation (Chen et al. 2007). Genes coding for vitamin-D metabolic enzymes and downstream mediators of vitamin-D signalling constitute a complex gene network. Vitamin-D receptor (*VDR*) plays a pivotal role in this network, acting as a ligand-dependent transcription factor that modulates the expression of vitamin-D responsive genes (Pike 1991).

Several *VDR* polymorphisms with functional effects have been described in the promoter, coding and 3' untranslated region (UTR) (Uitterlinden et al. 2004a). Two common polymorphisms, *Cdx* (rs1568820) and *A1012G* (rs4516035), have been located in the 5' regulatory region that affect binding to transcription factors. The rs1568820 polymorphism is a G to A transition between exons 1f and 1e that alters the recognition site for the intestinal-specific transcription factor "caudal-related homeodomain protein-2" (*Cdx-2*), affecting vitamin-D-*VDR*-mediated intestinal calcium absorption (Arai et al. 2001). The rs4516035 polymorphism is an A to G transition located between 1e and 1a exons that modifies the GATA-3 transcription factor recognition sequence, involved in the regulation of Th2 polarization (Halsall et al. 2004). In addition, a common *FokI* (rs10735810) polymorphism has been described in the *VDR* coding region that alters the first ATG start site to an alternate ACG sequence, giving rise to a *VDR* protein that is three amino acids shorter (424 aas versus 427 aas) (Gross et al. 1996). Functional differences among rs10735810 genotypes shows that *VDR* protein coded by the *C-VDR* allele (short 424 aas) interacted more efficiently with TFIIB and showed greater transcriptional activity than the full-length *VDR* protein coded by *T-VDR* allele (Jurutka et al. 2000). Finally, a common restriction fragment length polymorphism (RFLP), designated as *BsmI* (rs1544410), and a microsatellite polymorphism, designated as *PolyA* (rs17878969), has been described in the 3'-UTR region (Morrison et al. 1994; Ingles et al. 1997). Functional effects of 3'-UTR variants have been related to alterations in *VDR* mRNA stability (Fang et al. 2005).

Knowledge of the genomic architecture is important for designing association studies of complex phenotypes, as revealed by recent research on the linkage disequilibrium (LD) pattern of the human genome. LD refers to the non-random transmission of alleles of neighbouring *loci* that is high for closer *loci* and decreases with distance. In addition, recombination rate is a determinant factor for decreasing LD. The underlying structure of LD in the human genome reveals a series of discrete blocks of high LD interrupted by hotspot recombination sites. LD blocks range from 5 to 50 kb and are characterized by a reduced diversity of allelic combinations (haplotypes) (Wall and Pritchard 2003). Studies of the *VDR* genomic region in Caucasians have revealed a

scattered LD pattern with rs1568820 and rs4516035 polymorphisms included in a single block of the *VDR* promoter and rs1544410 and rs17878969 polymorphisms included in a 3'UTR block. Blocks are separated by a hotspot recombination region that includes the rs10735810 polymorphism (Fang et al. 2005).

Several studies reveal that polymorphisms at *VDR* locus are associated with life-limiting diseases such as cancer, cardiovascular diseases and immune system disturbances (Uitterlinden et al. 2004b). Therefore, we propose *VDR* as a candidate gene involved in human longevity as a result of its protection from age-related diseases and modulation of the immune response. Taking advantage of the known haplotype block structure of the *VDR* genomic region, we performed an association study for longevity considering both single genotypes and haplotypes.

## Materials and methods

### Subjects

In total, 214 Caucasian subjects from the city of Lleida in northeast Spain were included between January and June 2004: 104 octogenarians (>85 years), 72 women (mean age  $89.4 \pm 3.6$ ; range 85–100) and 32 men (mean age  $89.4 \pm 3.2$ ; range 85–97), and 110 sex-matched healthy young individuals, 75 women (mean age  $28 \pm 5.8$ ; range 17–39) and 35 men (mean age  $29 \pm 8.6$ ; range 17–40), were selected as cases and controls, respectively. A comprehensive medical history was obtained from each octogenarian, focussing on the absence of vitamin-D related illness such as osteoporosis, autoimmune diseases, immunodeficiency and cancer. Written informed consent for enrolment in the study and for personal data management was obtained from all subjects in accordance with Spanish laws. The Ethics Committee for our institution approved the study.

### DNA sources and genotyping

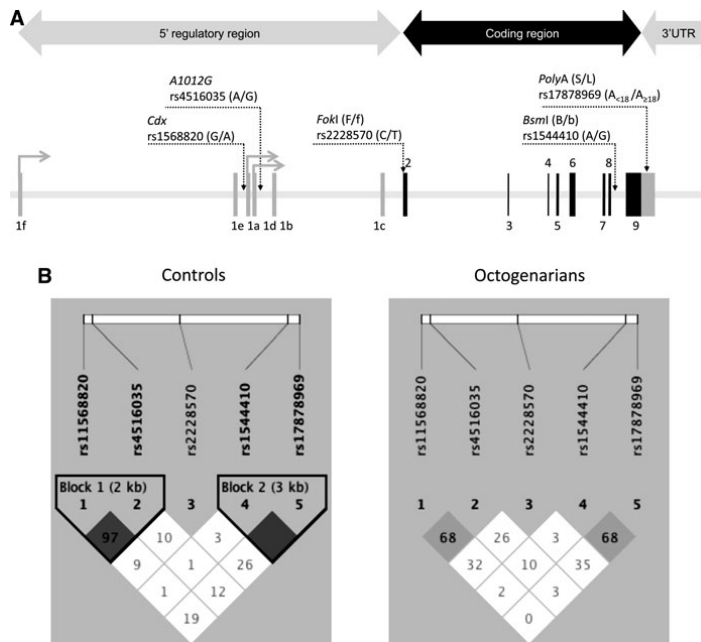
Genomic DNA from controls was extracted from peripheral blood lymphocytes using a KG-Midi extraction kit (Camgen, Cambridge, UK). DNA from octogenarians was obtained from buccal swabs using the BuccalAmp DNA extraction kit (Epicentre,

Madison, USA). *VDR* genotyping followed protocols described by de la Torre et al. (2008). For each subject we obtained genotype information from five polymorphic variants located in the *VDR* gene at: 5' promoter region, rs11568820 and rs4516035; coding region, rs10735810 and 3'UTR, rs1544410 and rs17878969 (Fig. 1a). All markers were coded as biallelic, including the rs17878969 microsatellite polymorphism that shows a biphasic distribution of short (<18 adenosine repeats, S) and long ( $\geq 18$  adenosine repeats, L) allele populations (Ingles et al. 1997).

### Statistical analysis

We compared genotype and allele distribution between controls and octogenarians by contingency table analysis performed by the OpenEpi web resource (Sullivan et al. 2009). Fisher exact test *P* values were considered in each comparison. Correction for multiple testing was done applying the SNP spectral decomposition approach, which takes into account the linkage disequilibrium between markers (Nyholt 2004). The significance threshold required to maintain a Type I error rate of 5% was  $P = 0.036$  for two-marker haplotypes and  $P = 0.011$  for five-marker haplotypes. Pair-wise linkage disequilibrium was measured by the normalized *D'* coefficient (Lewontin 1988) that was estimated using Haploview 4.2 software (Barrett et al. 2005). Absolute *D'* values range from 0 (no disequilibrium), indicating that alleles are randomly distributed and all expected haplotypes are observed, to 1 (complete disequilibrium), indicating a non random distribution of alleles with a less observed haplotypes than expected.

We used PHASE 2.1.1 software (Stephens et al. 2001) to perform statistical inference of haplotypes from our sample data. Only data from fully genotyped subjects, 86 octogenarians (25 males) and 101 controls (35 males), were considered. We used the "out\_pair" PHASE output file to assign haplotypes for each individual, with their corresponding probability. Haplotype counts were estimated by obtaining the cumulative probability of each haplotype. In brief, for an individual bearing haplotype A with probability 0.3 and haplotype B with probability 0.7, 0.3 and 0.7 were added to the corresponding counts of haplotypes A and B, respectively. Following the same rationale, we estimated the presence of 0, 1 or 2 copies of a specific haplotype in each individual.



**Fig. 1** Gene structure of the *VDR* locus and linkage disequilibrium (LD) pattern of populations analysed. **(a)** Graphical representation of the *VDR* gene with the location of polymorphisms selected. Polymorphisms are named according to *rs* code and alias. Small open arrows indicate alternative *VDR* promoters that incorporate alternative exon 1 (1a–1f). Grey boxes correspond to untranslated exons, empty boxes to coding exons. UTR untranslated region. All markers were coded as biallelic including the rs17878969 microsatellite polymorphism that shows a biphasic distribution of short (<18 adenosine repeats, S) and long (≥18 adenosine repeats, L) allele

populations (Ingles et al. 1997). **(b)** Graphical representation of the LD pattern in Controls and Octogenarians.  $D'$  values were calculated and plotted by Haploview 4.2 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). Numbers inside boxes correspond to  $D' \times 100$ . Block structure was considered for marker pairs showing  $D' > 0.8$ , following the “solid-spine” block definition implemented in Haploview. In controls, two blocks were identified, block-1 at the 5' regulatory region including markers rs4516035–rs11568820 and block-2 at the 3'UTR region including markers rs17878969–rs1544410. No block pattern was observed in octogenarians

Comparison of global haplotype distribution between controls and octogenarians was done by the “product of approximate conditionals” (PAC)-likelihood test implemented in PHASE 2.1.1 (Li and Stephens 2003). Differences between groups for specific haplotypes were evaluated by  $2 \times 2$  contingency table analysis performed by the OpenEpi web resource.

**Results**

The genotype and allele distribution conform to Hardy–Weinberg equilibrium for all markers in both the control and octogenarian samples. We evaluated

differences in genotype and allele distribution between octogenarians and controls, considering all subjects, gender between groups and gender within each group (Table 1). No statistical differences were observed for single-marker genotype association modelled as dominant (common allele homozygotes and heterozygotes versus rare allele homozygotes), recessive (rare allele homozygotes versus common allele homozygotes and heterozygotes) and codominant (cross genotype comparison). Allele distribution did not differ in any comparison performed (Table 1).

Linkage disequilibrium pattern in the control sample was in accordance with available data for Caucasian populations (Fang et al. 2005) and block



structure ( $D' > 0.8$ ) was observed for markers rs11568820–rs4516035 (block-1, Fig. 1b) and markers rs1544410–rs17878969 (block-2, Fig. 1b). Exon-2 polymorphism (rs10735810) did not show any significant  $D'$  with the 5' or 3'UTR markers. In contrast, a modest  $D'$  value ( $D' < 0.68$ ) was observed in the octogenarian sample (Fig. 1b).

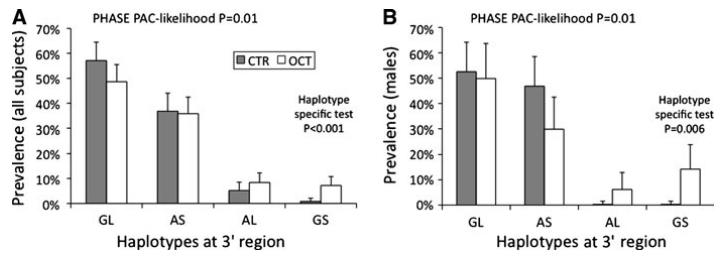
According to the observed LD pattern, haplotypes were independently inferred from 5' to 3'UTR

markers (block 1 and 2, respectively). No statistical differences were observed for 5'UTR haplotype distribution (rs11568820 and rs4516035, block 1) between controls and octogenarians. However, statistically significant differences were observed for global 3'UTR haplotype distribution (rs1544410 and rs17878969, block 2) between controls and octogenarians (PHASE PAC-likelihood test  $P = 0.01$ ) (Fig. 2a), mainly due to differences in male subjects

**Table 1** Genotype and allele distribution

Markers rs code (alias)	Genotypes alleles	Controls			Octogenarians		
		All subjects n (%)	Males n (%)	Females n (%)	All subjects n (%)	Males n (%)	Females n (%)
rs11568820 ( <i>Cdx</i> )	GG	61 (59.2)	21 (60)	40 (58.8)	63 (69.2)	18 (69.2)	45 (69.2)
	GA	38 (36.9)	12 (34.3)	26 (38.2)	25 (27.5)	6 (23.1)	19 (29.3)
	AA	4 (3.9)	2 (5.7)	2 (3)	3 (3.3)	2 (7.7)	1 (1.5)
	G	160 (77.7)	54 (77.1)	54 (77.1)	151 (83)	42 (80.8)	109 (83.8)
	A	46 (22.3)	16 (22.9)	16 (22.9)	31 (17.0)	10 (19.2)	21 (16.2)
	Genotype failure <sup>a</sup>	7 (6.4)	0 (0)	7 (9.3)	13 (12.5)	6 (18.8)	7 (9.7)
rs4516035 ( <i>A1012G</i> )	GG	41 (37.6)	14 (40)	27 (36.5)	29 (29.3)	9 (30)	20 (29)
	GA	56 (51.4)	18 (51.4)	38 (51.4)	55 (55.5)	15 (50)	40 (58)
	AA	12 (11)	3 (8.6)	9 (12.1)	15 (15.2)	6 (20)	9 (13)
	A	138 (63.3)	46 (65.7)	46 (65.7)	113 (57.1)	33 (55)	80 (58)
	G	80 (36.7)	24 (34.3)	24 (34.3)	85 (42.9)	27 (45)	58 (42)
	Genotype failure	1 (0.9)	0 (0)	1 (1.3)	5 (4.8)	3 (9.4)	2 (2.8)
rs2228570 ( <i>FokI</i> )	CC	43 (39.1)	13 (37.1)	30 (40)	46 (46.5)	15 (46.9)	31 (46.3)
	CT	58 (52.7)	18 (51.4)	40 (53.3)	39 (39.4)	10 (31.2)	29 (43.3)
	TT	9 (8.2)	4 (11.5)	5 (6.7)	14 (14.1)	7 (21.9)	7 (10.4)
	C	144 (65.5)	44 (62.9)	44 (62.9)	131 (66.2)	40 (62.5)	91 (67.9)
	T	76 (34.5)	26 (37.1)	26 (37.1)	67 (33.8)	24 (37.5)	43 (32.1)
	Genotype failure	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (4.8)	0 (0)	5 (6.9)
rs1544410 ( <i>BsmI</i> )	GG	37 (33.6)	10 (28.6)	27 (36)	30 (29.2)	10 (31.2)	20 (28.2)
	GA	50 (45.5)	17 (48.5)	33 (44)	56 (54.3)	20 (62.5)	36 (50.7)
	AA	23 (20.9)	8 (22.9)	15 (20)	17 (16.5)	2 (6.3)	15 (21.1)
	G	124 (56.4)	37 (52.9)	37 (52.9)	116 (56.3)	40 (62.5)	76 (53.5)
	A	96 (43.6)	33 (47.1)	33 (47.1)	90 (43.7)	24 (37.5)	66 (46.5)
	Genotype failure	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.0)	0 (0)	1 (1.4)
rs17878969 ( <i>PolyA</i> )	LL	43 (39.8)	10 (28.6)	33 (45.2)	36 (35.3)	11 (34.4)	25 (35.7)
	LS	48 (44.5)	17 (48.6)	31 (42.5)	44 (43.1)	12 (37.5)	32 (45.7)
	SS	17 (15.7)	8 (22.8)	9 (12.3)	22 (21.6)	9 (28.1)	13 (18.6)
	L	134 (62)	37 (52.9)	37 (52.9)	116 (56.9)	34 (53.1)	82 (58.6)
	S	82 (38)	33 (47.1)	33 (47.1)	88 (43.1)	30 (46.9)	58 (41.4)
	Genotype failure	2 (1.8)	0 (0)	2 (2.7)	2 (1.9)	0 (0)	2 (2.8)
Global genotype failure	10 (1.8)	0 (0)	10 (2.6)	26 (5.0)	9 (5.6)	17 (4.7)	

<sup>a</sup> Number of subjects with missing genotypes



**Fig. 2** 3'UTR haplotype prevalence in controls (CTR) and octogenarians (OCT). Histograms plot of the 3'UTR haplotype prevalence in all subjects (**a**) and in males (**b**). Bars indicate 95% confidence interval of the proportion. Global distribution of haplotypes was compared by the PAC-likelihood test

(PHASE PAC-likelihood test  $P = 0.01$ ) (Fig. 2b). Haplotype-specific test revealed that rs1544410-G:rs17878969-S (GS) haplotype was overrepresented in octogenarians (7.3 versus 0.8%; odds ratio (OR): 15.3, 95% confidence interval (CI): 2.3–637;  $P < 0.001$ ) (Fig. 2a). This difference was greater in males (14.2% in octogenarians versus 0.3% in controls, OR out of range,  $P = 0.006$ ) (Fig. 2b). We also estimated the haplotype carrier status of each individual. The distribution of carriers of at least one copy of 3'UTR GS haplotype is presented in Table 2. Carriers of at least one copy of GS haplotype were common in octogenarians (13.3%) but rare in controls (1.6%) ( $P = 0.008$ ). Among males, nearly a quarter of the octogenarians carried at least one copy of GS haplotype, whereas GS carriers represent less than 1% of controls (2.4 versus 0.7%, respectively;  $P = 0.013$ ).

Extended five-marker haplotypes were also estimated. Prevalence in controls and octogenarians is presented in Fig. 3. Extended five-marker haplotype counts and frequencies were compared between groups. Global five-marker haplotype distribution showed statistically significant differences (PHASE PAC-likelihood test  $P = 0.020$ ) (Fig. 3a), again mainly contributed by differences in males (PHASE PAC-likelihood test  $P = 0.020$ ) (Fig. 3b).

Five-marker haplotype-specific test revealed that rs11568820-G:rs4516035-G:rs10735810-C:rs1544410-G:rs17878969-S (GGCGS) haplotype was differentially distributed between groups (0.25% in controls versus 4.1% in octogenarians, OR: 11.5; 95% CI: 1.2–621,  $P = 0.024$ ; Fig. 3a). Again, these differences

were mainly due to males (0.07% in controls versus 9.5% in octogenarians, OR out of range;  $P = 0.014$ ; Fig. 3b). The distribution of carriers of at least one copy of GGCGS haplotype (0.5% in controls and 8.3% in octogenarians,  $P = 0.023$ ) is presented in Table 2. Males carrying at least one copy of GGCGS haplotype represent just 0.1% in controls but 18.9% in octogenarians ( $P = 0.012$ ).

implemented in PHASE 2.1.1 (Li and Stephens 2003). Haplotype-specific test was performed by  $2 \times 2$  contingency table analysis. Experiment-wide significance threshold required to keep Type I error rate at 5% was  $P = 0.036$

## Discussion

Long-lived people escaped or delayed major age-related illnesses such as cardiovascular diseases and cancer, as well as life-threatening infections and immune-related diseases. It is noteworthy that vitamin-D plays a key role in these impairing diseases (Holick 2005). A general concern exists about the vitamin-D insufficiency that has been found in older persons (Holick 2006). Recent data indicates that low serum levels of 25-hydroxyvitamin-D are associated with all-cause mortality in the general population (Dobnig et al. 2008) as well as in older men and women (Pilz et al. 2009). However, the question of whether vitamin-D deficiency is a cause or a consequence of poor health status remains to be answered.

Additional evidence supports a role for vitamin-D in the aging process (Lanske and Razaque 2007; Tuohimaa 2009). Studies in animal models have revealed a paradoxical effect of vitamin-D on aging. Genetically modified mice lacking *FGF23* and *Klotho* genes exhibit features of premature aging that have been related with an altered mineral homeostasis and

**Table 2** Distribution of carriers of at least one copy of selected haplotypes in controls and octogenarians

Carriers <sup>a</sup> for:	Controls counts <sup>b</sup> (%)			Octogenarians counts <sup>b</sup> (%)		
	All subjects (n = 101)	Males (n = 35)	Females (n = 66)	All subjects (n = 86)	Males (n = 25)	Females (n = 61)
3'UTR markers haplotype GS <sup>c</sup>	1.6 (1.6)	0.2 (0.7)	1.4 (2.1)	11.4 (13.3)	6.1 (24.4)	5.3 (8.7)
Five-marker haplotype GGCGS <sup>d</sup>	0.5 (0.5)	0.05 (0.1)	0.45 (0.7)	7.1 (8.3)	4.7 (18.9)	2.4 (3.9)

Note: As the number of each haplotype carrier was statistically inferred values obtained for counts were in fractional numbers

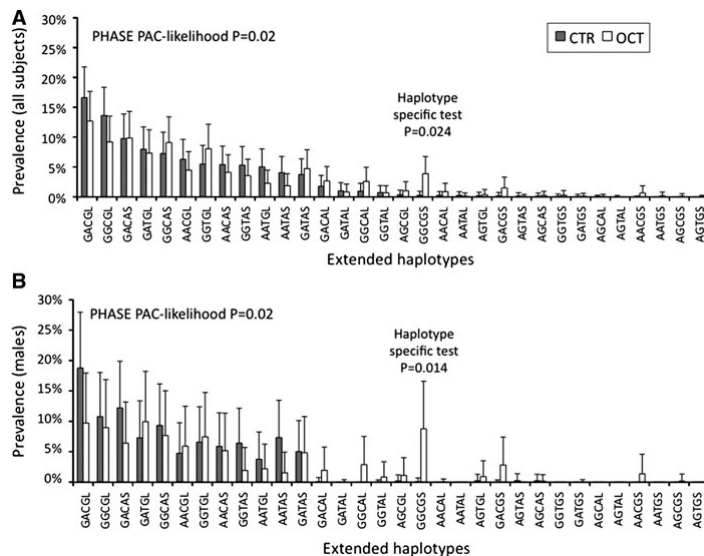
<sup>a</sup> Carriers were those bearing one or two copies of the corresponding haplotype

<sup>b</sup> Counts refer to the number of haplotype carriers that were statistically inferred from PHASE 2.1.1 “out\_pairs” output file

<sup>c</sup> Haplotype rs1544410-G:rs17878969-S. Fisher exact test, octogenarians versus controls: all subjects, odds ratio (OR): 7.1; 95% confidence interval (CI): 1.5–66.3,  $P = 0.008$ ; males, OR out of range,  $P = 0.013$ . Experiment-wide significance threshold required to keep Type I error rate at 5% was  $P = 0.036$

<sup>d</sup> Haplotype rs11568820-G:rs4516035-G:rs10735810-C:rs1544410-G:rs17878969-S. Fisher exact test, octogenarians versus controls: all subjects, OR: 11.9; 95% CI: 1.3–650,  $P = 0.023$ ; males, OR out of range,  $P = 0.012$ . Experiment-wide significance threshold required to keep Type I error rate at 5% was  $P = 0.011$

**Fig. 3** Five-marker haplotype prevalence in controls (CTR) and octogenarians (OCT). Histogram plot of five-marker haplotype prevalence in all subjects (a) and in males (b). Bars indicate 95% confidence interval of the proportion. Global distribution of haplotypes was compared by the PAC-likelihood test implemented in PHASE 2.1.1 (Li and Stephens 2003). Haplotype-specific test was performed by  $2 \times 2$  contingency table analysis. Experiment-wide significance threshold required to keep Type I error rate at 5% was  $P = 0.011$



hypervitaminosis-D due to increased 1- $\alpha$ -hydroxylase activity (Razzaque and Lanske 2006). At the same time, null mice for the vitamin-D receptor gene, in which vitamin-D action cannot occur, also show features related with premature aging (Keisala et al. 2009). According to this, it has been proposed that aging shows a hormetic U-shaped dependency on

hormonal forms of vitamin-D where both hyper- and hypovitaminosis are risk factors for abnormal aging (Tuohimaa 2009). This bimodal effect of vitamin-D levels also has been described for vascular disease risk in children on dialysis (Shroff et al. 2008) and prostate cancer risk in Nordic countries (Tuohimaa et al. 2004). Therefore, it can be assumed that for good

health status there is a narrow range for optimal serum concentration of vitamin-D forms.

VDR acts as a nuclear receptor for vitamin-D and is responsible for its genomic action. Several *VDR* gene polymorphic variants have been described as affecting *VDR* gene expression (rs11568820 and rs4516035), protein structure (rs10735810) and mRNA stability (rs1544410 and rs17878969) (Fang et al. 2005; Uitterlinden et al. 2004a). Variability at the *VDR* locus has been associated with cancer, osteoporosis, cardiovascular diseases and diabetes (Uitterlinden et al. 2004b) as well as mycobacterium (Bellamy and Hill 1998) and viral infections (Fibla and Caruz 2010).

While the vitamin-D effect on impairing diseases and aging has been well studied, the effect of *VDR* variability has been evaluated only in relation to diseases; no data exist about its role in aging and longevity. In the present case-control study, we compared allele, genotype and haplotype distribution of five *VDR* gene variants between healthy-living octogenarians and younger controls to assess *VDR* as a candidate gene affecting aging and longevity. Our study is the first to provide evidence of an association between *VDR* gene polymorphisms and longevity, as reflected by the differential distribution of *VDR* haplotypes that we observed. The positive significant association between longevity and the 3'UTR GS and five-marker GGCGS haplotypes was observed in octogenarian males but not in women. Epidemiological data on long-lived subjects document a clear-cut prevalence of females compared to males, suggesting that sex-specific mortality rates follow different trajectories. Demographic and behavioural risk factors have been considered in the literature, but do not account for the overall sex-related difference in mortality rates (Wingard 1984). In addition, the role of biological factors has been explored with contentious results (Austad 2006). Our finding of a sex-specific association was in accordance with previous reports that certain polymorphisms of the *interleukin* (*IL*)-6, *IL*-10 and *interferon-gamma* genes are male-specific markers for longevity (Bonafe et al. 2001; Di Bona et al. 2009; Giacconi et al. 2004; Lio et al. 2002a, b), supporting a finding that female longevity is less dependent on genetic background than male longevity (Franceschi et al. 2000).

With respect to the biogerontological significance of the observed association, we can only suggest a

reasonable potential explanation. From functional studies, the common 3'UTR haplotypes GL and AS have been linked to low and high mRNA stability, respectively (Fang et al. 2005). However, no causative effect has been assigned to rs1544410 or rs17878969 polymorphisms. The main resulting hypothesis is to consider those polymorphisms as markers for an unknown causative element located in the 3'UTR region. In octogenarians, we found an increase of the GS haplotype prevalence. GS haplotype combines elements of the two common GL and AS haplotypes, from which we can expect an intermediate phenotype. Assuming the vitamin-D effect on the aging process follows a hormetic U-shaped model (Tuohimaa 2009), haplotypes conferring low (GL) and high (AS) *VDR* mRNA stability contributes to an adverse vitamin-D response caused by deficiency and toxicity, respectively. However, haplotypes conferring a middle *VDR* mRNA stability (i.e. GS) can be considered as protective, as vitamin-D response can remain in the homeostatic region, producing neither deficiency nor toxicity.

No previous study has been specifically designed to evaluate differences in *VDR* variants between young and elderly subjects. The literature contains indirect data on genotype frequencies of *VDR* markers, but comparison with our data is inappropriate due to differences in the origin of each population and in selection criteria. We acknowledge that our study has a number of potential limitations. Although octogenarian Caucasian cohorts may have common characteristics, such as the limited medical care available until the 1950s, we cannot exclude potential confounding factors. In particular, two historical events must be taken into account: the Spanish flu epidemic at the beginning of the twentieth century, which depleted the childhood population, and the Civil War (1936–1939) that had an especially important impact on male mortality (González et al. 1996). The first event could have produced biological consequences, while the second had a stochastic effect. Another concern refers to the comparison of different birth cohorts, within which we assumed that initial frequencies are similar (Capri et al. 2008). We cannot exclude this confounding factor in our study. However, our cohorts fit Hardy-Weinberg equilibrium in all loci analyzed, and neither disturbances on random mating nor selective factors attributable to the *VDR* locus can be expected to act before

reproductive age. Therefore, we could hypothesize that genotype and allelic frequencies are maintained over generations.

In conclusion, the well-documented impact of vitamin-D levels on the aging process and on age-related diseases is bolstered by our results. In addition, the study results propose a new scenario in which the variability of the *VDR* gene is also relevant and emphasize the role of *VDR* genetic background in determining optimal vitamin-D levels for healthy aging.

**Acknowledgements** ML was recipient of a fellowship from the University of Lleida. This work was supported by grants to the University of Lleida (JF, principal investigator) from *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS, PI051778) and *Ministerio de Ciencia e Innovación* (CGL 2007-62875). We thank Elaine Lilly, Ph.D. (Writer's First Aid), for English language revision of the manuscript. We would like to thank the elderly participants and their families, who made this study possible.

## References

- Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M et al (2001) The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res* 16:1256–1264
- Austad SN (2006) Why women live longer than men: sex differences in longevity. *Gend Med* 3:79–92
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265
- Bellamy RJ, Hill AV (1998) Host genetic susceptibility to human tuberculosis. *Novartis Found Symp* 217:3–13
- Bonafe M, Olivieri F, Cavallone L et al (2001) A gender-dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 31:2357–2361
- Capri M, Salvioli S, Monti D et al (2008) Human longevity within an evolutionary perspective: the peculiar paradigm of a post-reproductive genetics. *Exp Gerontol* 43:53–60
- Chen TC, Chimeh F, Zhiren L et al (2007) Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 460:213–217
- Danescu LG, Levy S, Levy J (2009) Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine* 35:11–17
- de la Torre MS, Torres C, Nieto G et al (2008) Vitamin D receptor gene haplotypes and susceptibility to HIV-1 infection in injection drug users. *J Infect Dis* 197:405–410
- Deluca HF, Cantorna MT (2001) Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 15:2579–2585
- Di Bona D, Vasto S, Capurso C et al (2009) Effect of interleukin-6 polymorphisms on human longevity: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* 8:36–42
- Dobnig H, Pilz S, Schumacher H et al (2008) Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 168:1340–1349
- Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A et al (2005) Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin D receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the Rotterdam study. *Am J Hum Genet* 77:807–823
- Fibla J, Caruz A (2010) Vitamin D and HIV Infection. In: Alfano M (ed) Soluble factors mediating innate immune responses to HIV infection. Bentham eBooks, pp 180–229
- Franceschi C, Motta L, Valensin S et al (2000) Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? Italian Multicenter Study on Centenarians (IMUSCE). *Aging (Milan)* 12:77–84
- Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC (2009) Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* 19:468–483
- Giacconi R, Cipriano C, Albanese F et al (2004) The -174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Exp Gerontol* 39:621–628
- González ER, Benavides FG, Mestre J (1996) La Transición Sanitaria en España desde 1900 a 1990. *Rev Esp Salud Pública* 70:221–233
- Gouni-Berthold I, Krone W, Berthold HK (2009) Vitamin D and cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 7:414–422
- Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ et al (1996) The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 11:1850–1855
- Halsall JA, Osborne JE, Potter L, Pringle JH, Hutchinson PE (2004) A novel polymorphism in the 1A promoter region of the vitamin D receptor is associated with altered susceptibility and prognosis in malignant melanoma. *Br J Cancer* 91:765–770
- Hayes DP (2010) Vitamin D and ageing. *Biogerontology* 11:1–16
- Heaney RP (2008) Vitamin D in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:1535–1541
- Holick MF (2005) Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. *South Med J* 98:1024–1027
- Holick MF (2006) High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 81:353–373
- Holick MF, Chen TC (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87:1080S–1086S
- Ingles SA, Ross RK, Yu MC et al (1997) Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst* 89:166–170
- Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK et al (2000) The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol* 14:401–420

- Keisala T, Minasyan A, Lou Y-R et al (2009) Premature aging in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 115:91–97
- Lamberg-Allardt C (2006) Vitamin D in foods and as supplements. *Prog Biophys Mol Biol* 92:33–38
- Lanske B, Razzaque MS (2007) Vitamin D and aging: old concepts and new insights. *J Nutr Biochem* 18:771–777
- Lash RW, Nicholson JM, Velez L, Van Harrison R, McCort J (2009) Diagnosis and management of osteoporosis. *Prim Care* 36:181–198
- Lewontin R (1988) On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120:849–852
- Li N, Stephens M (2003) Modeling linkage disequilibrium and identifying recombination hotspots using single-nucleotide polymorphism data. *Genetics* 165:2213–2233
- Lio D, Scola L, Crivello A et al (2002a) Allele frequencies of +874T→A single nucleotide polymorphism at the first intron of interferon-gamma gene in a group of Italian centenarians. *Exp Gerontol* 37:315–319
- Lio D, Scola L, Crivello A et al (2002b) Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun* 3:30–33
- Lips P (2006) Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92:4–8
- Morrison NA, Qi JC, Tokita A et al (1994) Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367:284–287
- Nyholt DR (2004) A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 74:765–769
- Pike JW (1991) Vitamin D3 receptors: structure and function in transcription. *Annu Rev Nutr* 11:189–216
- Pilz S, Dobnig H, Nijpels G et al (2009) Vitamin D and mortality in older men and women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71:666–672
- Razzaque MS, Lanske B (2006) Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice. *Trends Mol Med* 12:298–305
- Roth SM, Zmuda JM, Cauley JA, Shea PR, Ferrell RE (2004) Vitamin D receptor genotype is associated with fat-free mass and sarcopenia in elderly men. *J Gerontol A* 59:10–15
- Shroff R, Egerton M, Bridel M et al (2008) A bimodal association of vitamin D levels and vascular disease in children on dialysis. *J Am Soc Nephrol* 19:1239–1246
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978–989
- Sullivan KM, Dean A, Soe MM (2009) OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public Health Rep* 124:471–474
- Tuohimaa P (2009) Vitamin D and aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* 114:78–84
- Tuohimaa P, Tenkanen L, Ahonen M et al (2004) Both high and low levels of blood vitamin D are associated with a higher prostate cancer risk: a longitudinal, nested case-control study in the Nordic countries. *Int J Cancer* 108:104–108
- Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, Pols HA, van Leeuwen JP (2004a) Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338:143–156
- Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA (2004b) Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89–90:187–193
- Visser M, Deeg DJ, Lips P (2003) Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5766–5772
- Wall JD, Pritchard JK (2003) Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 4:587–597
- Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V et al (2004) Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 173:2909–2912
- Wingard DL (1984) The sex differential in morbidity, mortality, and lifestyle. *Annu Rev Public Health* 5:433–458



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/issn/10434666](http://www.elsevier.com/locate/issn/10434666)

Short Communication

## Distribution of functional polymorphic variants of inflammation-related genes *RANTES* and *CCR5* in long-lived individuals

Marina Laplana, Joan Fibla\*

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Unitat de Genètica Humana, IRBLleida, Universitat de Lleida, C/ Montserrat Roig, 2. 25008 Lleida, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 October 2011

Received in revised form 23 December 2011

Accepted 24 December 2011

Available online 20 January 2012

## Keywords:

*RANTES**CCR5*

Polymorphism

Inflammation

Longevity

## ABSTRACT

Although persistent inflammation has been related to unsuccessful aging, a pro-inflammatory status is the common phenotype in older people. To assess for a genetic component in the inflammatory status of the oldest we studied the distribution of two polymorphic chemokine pathway genes, *RANTES* and *CCR5*, in elderly. *RANTES* –403G/A and *RANTES Int1.1T/C* polymorphisms and *CCR5.Δ32* polymorphism were genotyped in 104 elderly and 110 controls. *RANTES* –403A and *RANTES Int1.1C* alleles have been associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory status, respectively. *CCR5.Δ32* abrogates functional receptor expression of the pro-inflammatory CCR5-mediated action. Prevalence of *RANTES* –403G allele, associated in other studies with high *RANTES* production, was reduced in elderly males, compared with controls. In addition, *RANTES* pro-inflammatory haplotype –403A-*Int1.1T* was overrepresented in elderly males, while *RANTES* anti-inflammatory haplotype –403G-*Int1.1C* was overrepresented in elderly females. Our results suggest a sex-specific *RANTES* inflammatory genetic determinant that could contribute to the known sex-related differences in aging.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The immune system's positive protective effect against pathogens and the spread of tumor cells can also become a detrimental chronic inflammation affecting longevity. Studies on the genetic component of longevity have tended to evaluate the role of the immune system genes, especially those involved in inflammation. Results obtained reveal that persistent activation of inflammatory status is related to unsuccessful aging and that avoiding a persistent inflammation contributes to healthy aging. However, a pro-inflammatory status is the common phenotype in older people [1].

Inflammatory response could be affected by changes in chemokine gene transcription and receptor expression levels due to polymorphisms at the corresponding genes. Previous studies of chemokine factors related to age-related disease and longevity revealed attrition or change in frequency of chemokine alleles with ageing [2,3]. Chemokines are small chemotactic cytokines (C-C) with a pivotal role in leukocyte trafficking and activation. Their biological effects are exerted via interaction with G protein-coupled receptors that mediate intracellular signals. C-C chemokine receptor type 5 (*CCR5*) is the co-receptor for macrophages and dual (T cell and macrophage) tropic immunodeficiency viruses and is involved in the migration of monocytes, NK cells and Th1 cells toward an increasing concentration of  $\beta$ -chemokines, which results

in recruitment of leukocytes to the inflammation site. Natural *CCR5* ligands are the C-C motif chemokine ligands CCL3, CCL4 and CCL5, which is also known as *RANTES* (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted). Two polymorphisms have been described in the *RANTES* gene, a promoter polymorphism (–403G/A, *rs2107538*) whose –403A allele increases the promoter transcriptional activity, which results in high serum *RANTES* levels favouring a pro-inflammatory status [4], and an intronic polymorphism (*Int1.1T/C*, *rs2280789*) whose *Int1.1C* variant has been associated with low *RANTES* expression and an anti-inflammatory status [5]. A 32 bp insertion/deletion polymorphism has been described in exon 3 of the *CCR5* gene (*CCR5.Δ32*, *rs3333*) that abrogates functional *CCR5* receptor expression, weakening the pro-inflammatory CCR5-mediated action [6]. The *CCR5.Δ32* allele reaches appreciable frequencies only in Europe, following a latitudinal cline distribution that is higher in the north and lower in the south. Studies have demonstrated that the *CCR5.Δ32* allele is related to reduction of portal inflammation during hepatitis C (HCV) infection, delayed progression in multiple sclerosis, protection against cardiovascular diseases (acute myocardial infarction and severe coronary heart disease) and attenuation of the inflammatory response that delays progression of atherosclerotic lesions [7].

To assess the possibility of a genetic component of inflammatory status in the elderly, we studied the distribution of functional polymorphic variants of two genes from the chemokine inflammatory pathway, *RANTES* and *CCR5*, in long-lived individuals.

\* Corresponding author. Tel.: +34 973702473; fax: +34 973702426.  
E-mail address: joan.fibla@cmb.udl.cat (J. Fibla).

## 2. Methods

*RANTES* –403G/A and *Int1.1T/C* and *CCR5.Δ32* polymorphisms were genotyped by standard procedures (Supplementary Table 1) in a cohort of 214 subjects. A detailed description of cohorts can be found in Ref. [8], briefly: 110 sex-matched healthy young individuals as a control group, 75 women (mean age  $28 \pm 5.8$ ; range 17–39) and 35 men (mean age  $29 \pm 8.6$ ; range 17–40), and 104 elderly subjects (>85 years), 72 women (mean age  $89.4 \pm 3.6$ ; range 85–100) and 32 men (mean age  $89.4 \pm 3.2$ ; range 85–97). Subjects were enrolled from the city of Lleida in northeast Spain, between January and June 2004. Elderly subjects were recruited from attendants to Primary Care Services (25%) and Nursing Home residents (75%). A comprehensive medical history was obtained from each elderly subject. Most frequent co-morbidities were hypertension (9.6%), stroke (7.7%), chronic obstructive pulmonary disease (4.8%) and heart disease (2.9%). A written informed consent for enrolling in the study and for personal data management was obtained from all subjects (elderly and controls) in accordance with Spanish laws. The Ethics Committee of our institution approved the study.

## 3. Results and discussion

Genotype and allele distributions of *RANTES* –403G/A and *CCR5.Δ32* polymorphisms conform to Hardy–Weinberg equilibrium in both the control and elderly cohorts. In contrast, *RANTES* *Int1.1T/C* departs from Hardy–Weinberg equilibrium in the elderly cohort. Comparisons of genotype and allele distributions between controls and elderly were done by contingency table analysis performed by the OpenEpi web resource (<http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>). Differences were evaluated considering all subjects and by sex between cohorts. For comparisons including zero values, odds ratio and 95%CI were calculated based on the Peto odds ratio method by using the on-line calculator <http://www.hutchon.net/ConfidORnulhypo.htm>. This approach has the advantage of accepting zero results without generating infinity. *P* values <0.05 were considered statistically significant. In addition, a modified Bonferroni-corrected nominal threshold of  $P = 0.05/N$  was used, where *N* is the “effective number of independent marker loci” after consideration of linkage disequilibrium between markers. *N* was calculated using the SNP (single nucleotide polymorphism) spectral decomposition approach web-based program *SNPSpD* (<http://gump.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSpD/>). This yields an experiment-wide significance threshold of 0.02 to keep Type I error rate at 5%.

Genotype distribution differences between elderly and controls showed statistical significance for *Int1.1T/C* polymorphism ( $P = 0.03$ ), but not for *CCR5.Δ32* or –403G/A polymorphisms (Table 1). Sex-based differences between cohorts for the *CCR5.Δ32* polymorphism were not significant. Nevertheless, differences between elderly and control males were observed for the –403G/A genotype ( $P = 0.029$ ) and allele distribution (OR = 3.2; 95%CI = 1.2–8.5;  $P = 0.012$ ) (Table 1). In addition, differences were observed when –403A allele was modeled as dominant (OR = 4; 95%CI = 1.4–11.8;  $P = 0.01$ ). We also found a genotype association for *Int1.1C* allele under recessive model (Peto OR = 8.8; 95%CI = 1.7–44.7;  $P = 0.008$ ) that was mainly contributed by differences between elderly and control females (Peto OR = 8.4; 95%CI = 1.4–49.9;  $P = 0.02$ ).

Haplotypes for *RANTES* gene markers were inferred by pLink software (pLink web resource available at <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>). Haplotype distribution between elderly and controls in all subjects, males and females, showed significant differences (Omnibus test  $P = 0.02$ ,  $P = 0.05$  and  $P = 0.04$ , respectively) (Table 1).

According to the inflammation-linked effect attributed to both *RANTES* –403G/A and *Int1.1T/C* polymorphisms, we can presume an anti-inflammatory effect for the –403G-*Int1.1C* (GC) haplotype and the opposite pro-inflammatory effect for the –403A-*Int1.1T* (AT) haplotype. Haplotype-specific test showed that anti-inflammatory GC haplotype was overrepresented in the elderly cohort ( $P = 0.04$ ), mainly due to the overrepresentation in females (Peto OR = 8.3; 95%CI = 2–34;  $P = 0.005$ ). In contrast, pro-inflammatory AT haplotype was overrepresented in elderly males (OR = 4.9; 95%CI = 0.97–24.7;  $P = 0.03$ ).

Carrier distribution in males and females of pro- and anti-inflammatory haplotypes is shown in Fig. 1. As revealed by haplotype-specific test, elderly males were carriers of the pro-inflammatory AT haplotype, which was more prevalent in elderly than in controls (26% and 6%, respectively; OR = 5.6; 95%CI = 1.06–29.7;  $P = 0.038$ ), while carriers of the AT haplotype were equally distributed in elderly and control females (10% and 13%, respectively). In contrast, elderly females were carriers of the anti-inflammatory GC haplotype that was absent in control females (11.4% vs. 0%, respectively; Peto OR = 8.8; 95%CI = 2.1–36.5;  $P = 0.0024$ ).

Our genetic study of Spanish elderly does not reveal any significant association between the *CCR5.Δ32* polymorphism and longevity. The role of *CCR5* in age-related diseases has been largely reviewed [9]. Assuming the hypothesis that alleles favouring inflammation-related diseases are detrimental for longevity and considering the inflammatory *CCR5*-mediated action, we could expect an increased prevalence of defective *CCR5.Δ32* alleles, as well as *CCR5.Δ32* carriers, in long-lived individuals. The *CCR5.Δ32* polymorphism has been studied in relation to diseases reducing life expectancy, such as acute myocardial infarction and prostate cancer using centenarians as the reference population [10,11]. An overrepresentation of the *CCR5.Δ32* allele was reported in centenarians compared to cases, assigning to this polymorphism a role in promoting longevity. In these studies the comparison of extreme phenotype populations (centenarians vs. affected cases) probably confers an increased power to detect association. However, the *CCR5.Δ32* prevalence in centenarians does not differ from that observed in the healthy control population which agrees with results obtained in our study. This could reflect a weak association of *CCR5* with longevity that needs a more highly powered test to be established.

The association of *RANTES* polymorphisms with longevity has not yet been described. Our results denote a sex-specific association with functional *RANTES* polymorphisms. Pro-inflammatory *RANTES* alleles/haplotypes were positively associated with elderly males. In contrast, anti-inflammatory *RANTES* alleles/haplotypes showed positive association with elderly females.

Elevation of circulating levels of *RANTES* has been described in unstable angina pectoris patients as predictive of future cardiovascular adverse events [9]. Furthermore, a significant elevation of major C-C chemokines, including *RANTES*, has been described during the course of acute myocardial infarction that actively contributes to the pathophysiology of the disease. Finally, association studies of functional *RANTES* polymorphisms have been performed highlighting the role of *RANTES* in age-related diseases [4].

Our findings on *RANTES* allele/haplotype distribution among elderly suggest a *RANTES* genetic determinant that is prone to a pro-inflammatory phenotype in males and an anti-inflammatory phenotype in females, which could contribute to the known sex-specific differences in aging. Sexual dimorphism in immune responsiveness has been reported with respect to genetic background. Some evidence of an increase in frequency of the IL-10 anti-inflammatory cytokine gene in long-lived males has been reported [12] and early work suggested that sexual dimorphism existed in immune responsiveness in the HLA supratype A1B8Cw7DR3 [13].



**Table 1**  
Allele, genotype and haplotype distribution of *CCR5.Δ32*, *RANTES -403G/A* and *RANTES Int1.1T/C* polymorphisms in Spanish controls and elderly subjects.

rs code, (alias)	Genotype allele haplotype	Controls			Elderly		
		All subjects n (%)	Males n (%)	Females n (%)	All subjects n (%)	Males n (%)	Females n (%)
<i>rs3333, (CCR5.Δ32)</i>							
Genotypes	wtwt	88 (80)	29 (82.9)	59 (78.7)	79 (76)	22 (68.8)	57 (79.2)
	wtΔ32	22 (20)	6 (17.1)	16 (21.3)	21 (20.2)	9 (28.1)	12 (16.7)
	Δ32Δ32	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2.9)	1 (3.1)	2 (2.8)
Alleles	wt	198 (90)	64 (91.4)	134 (89.3)	179 (86.1)	53 (82.8)	126 (87.5)
	Δ32	22 (10)	6 (8.6)	16 (10.7)	27 (13)	11 (17.2)	16 (11.1)
<i>rs2107538 (RANTES -403G/A)</i>							
Genotypes	CG	75 (68.2)	28 (80)	47 (62.7)	66 (63.5)	16 (50) <sup>a</sup>	50 (69.4)
	CA	34 (30.9)	7 (20)	27 (36)	35 (33.7)	15 (46.8)	20 (27.8)
	AA	1 (0.9)	0 (0)	1 (1.3)	3 (2.9)	1 (3.1)	2 (2.8)
	A carriers	35 (31.8)	7 (20)	28 (37.3)	38 (36.6)	16 (49.9) <sup>a</sup>	22 (30.6)
Alleles	G	184 (83.6)	63 (90)	121 (80.7)	167 (80.3)	47 (73.4) <sup>a</sup>	120 (83.3)
	A	36 (16.4)	7 (10)	29 (19.3)	41 (19.7)	17 (26.6)	24 (16.7)
<i>rs2280789 (RANTES Int1.1T/C)</i>							
Genotypes	TT	86 (78.9)	29 (85.3)	57 (76)	71 (73.2) <sup>b</sup>	21 (77.8)	50 (71.4)
	TC	23 (21.1)	5 (14.7)	18 (24)	20 (20.6)	5 (18.5)	15 (21.4)
	CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (6.2) <sup>b</sup>	1 (3.7)	5 (7.2) <sup>b</sup>
Alleles	T	195 (89.5)	63 (92.7)	132 (88)	162 (83.5)	47 (87)	115 (82.1)
	C	23 (10.5)	5 (7.3)	18 (12)	32 (16.5)	7 (13)	25 (17.9)
<i>rs2107538 and rs2280789 (RANTES haplotype)<sup>f</sup></i>							
Haplotype counts							
GT		182 (83.3)	61 (89.6)	121 (80.5)	148 (76.2)	40 (74) <sup>d</sup>	108 (77)
AC		23 (10.4)	5 (7.3)	18 (11.9)	24 (12.3)	7 (12.9)	17 (12.1)
AT		13 (6.1)	2 (3.1)	11 (7.6)	14 (7.3)	7 (13.1) <sup>e</sup>	7 (5.1)
GC		0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (4.2) <sup>f</sup>	0 (0)	8 (5.8) <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Statistical differences between elderly and control males for global genotype distribution ( $P = 0.029$ ); *RANTES -403A* modeled as dominant (Odds Ratio (OR) = 4.0; 95% confidence interval (CI) = 1.4–11.8;  $P = 0.01$ ) and allele distribution (OR = 3.2; 95%CI = 1.2–8.5;  $P = 0.014$ ).

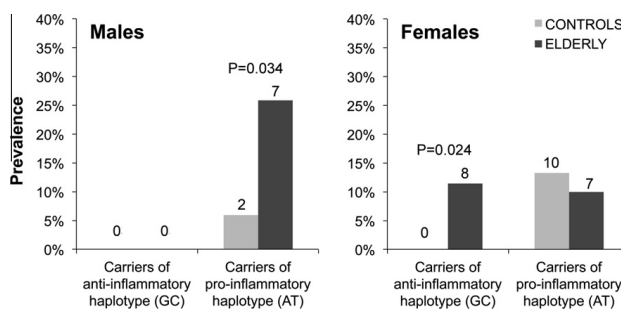
<sup>b</sup> Statistical differences between elderly and controls for global genotype distribution ( $P = 0.03$ ) and *RANTES Int1.1C* under recessive model (Peto OR = 8.8; 95%CI = 1.7–44.7;  $P = 0.008$ ), mainly attributable to an overrepresentation in females (Peto OR = 8.4; 95%CI = 1.4–49.9;  $P = 0.02$ ).

<sup>c</sup> Statistical differences between elderly and controls for global haplotype distribution for all subjects ( $P = 0.02$ ), males ( $P = 0.05$ ) and females ( $P = 0.04$ ).

<sup>d</sup> GT haplotype was underrepresented in elderly males (OR = 0.3; 95%CI = 0.12–0.88;  $P = 0.02$ ).

<sup>e</sup> AT haplotype was overrepresented in elderly males (OR = 4.9; 95%CI = 0.97–24.7;  $P = 0.03$ ).

<sup>f</sup> GC haplotype was overrepresented in elderly subjects ( $P = 0.04$ ) due to the overrepresentation in females (Peto OR = 8.3; 95%CI = 2–34;  $P = 0.005$ ).



**Fig. 1.** Prevalence of carriers of *RANTES* anti-inflammatory *-403G-Int1.1C* (GC) and pro-inflammatory *-403A-Int1.1T* (AT) haplotypes between elderly and controls in males (left) and females (right). The numbers within each haplotype combination for *RANTES* genotypes are shown at the top of each bar.

It has been previously described that the inflammation index, calculated as the sum of positive indicators such as C-reactive protein, plasma fibrinogen and urinary albumin, shows sex differences and varies with age [14]. Women have a higher inflammation index during all life stages compared with men but slower rates of increase in inflammation with age. This can contribute to the decrease in the inflammation differences between the sexes in the elderly population (>80 year-old) [14].

Moreover, it has been suggested that the female sex hormone estrogen may increase the expression of antioxidant enzymes, playing a protective role that improves host resistance to degenerative diseases, and may reduce the risk of cardiovascular diseases (CVD) by modulation of fibrinolytic factors [15]. Therefore, women have a greater capacity to recover from an inflammatory status, probably due to better regulation of the inflammatory response, which, as our data points out, can be enabled by the genetic

component. The better control of inflammation in elderly women might be linked to the higher life expectancy.

We acknowledge that our study have a number of potential limitations. The relatively small number of subjects in the elderly cohort, due to the difficulty to find older subjects fitting our inclusion criteria, could be considered as an important limitation of the study. Some statistical outcomes are based in comparisons performed with small numbers or zero subjects that do not pass statistical threshold when corrected for multiple testing. Despite having used appropriated statistical methods (i.e. Peto odds ratio and Bonferroni-corrected SNP spectral decomposition approach) revealing significant results, the mentioned limitations require us to consider conclusions as suggestive rather than a clear finding.

The role of sex differences in age trajectories is still unresolved. Our data shows that the *RANTES* genetic component differs between males and females and could contribute to their differences in aging trajectories. The appropriate regulation of the inflammatory response by a proper balance of pro- and anti-inflammatory cytokines could be an important factor in reaching extreme longevity. Assuming all the limitations previously mentioned our results encourage further studies to replicate our findings and to search for additional inflammation-related genes that could define an inflammation-related genetic component contributing to sex differences in longevity.

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no proprietary, financial, professional or other personal interest of any nature or kind that might raise the question of bias in the work reported or in the conclusions, implications, or opinions stated in this manuscript.

#### Acknowledgements

M.L. was recipient of a fellowship from the University of Lleida. This work was supported by grants to the University of Lleida (J.F., principal investigator) from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, PI051778) and Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL 2007-62875). The authors thank Elaine Lilly, Ph.D. (Writer's First Aid), for English language revision of the manuscript. The authors also thank the elderly participants and their families, who made this study possible.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cyto.2011.12.021.

#### References

- [1] Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci* 2000;908:244–54.
- [2] Candore G et al. Cytokine gene polymorphisms and atherosclerosis. In: Vandembroeck K, editor. *Cytokine gene polymorphisms in multifactorial conditions*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2006.
- [3] Rea IM et al. Cytokine gene polymorphisms and longevity. In: Vandembroeck K, editor. *Cytokine gene polymorphisms in multifactorial conditions*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2006.
- [4] Zhenakova A, Alizadeh BZ, Eerligh P, Hanifi-Moghaddam P, Schloot NC, Diosdado B, et al. Genetic variants of *RANTES* are associated with serum *RANTES* level and protection for type 1 diabetes. *Genes Immun* 2006;7:544–9.
- [5] An P, Nelson GW, Wang L, Donfield S, Goedert JJ, Phair J, et al. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting *RANTES* gene variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(15):10002–7.
- [6] Samson M, Libert F, Doranz B, Rucker J, Liesnard C, Farber C, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382(6593):722–5.
- [7] Potteaux S. Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(8):1858–63.
- [8] Laplana M, Sánchez-de-la-Torre M, Aguiló A, Casado I, Flores M, Sánchez-Pellicer R, et al. Tagging long-lived individuals through vitamin-D receptor (VDR) haplotypes. *Biogerontology* 2010;11(4):437–46.
- [9] Jones KL, Maguire JJ, Davenport AP. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2011;162(7):1453–69.
- [10] Balistreri CR, Candore G, Caruso M, Incalcaterra E, Franceschi C, Caruso C. Role of polymorphisms of CC-chemokine receptor-5 gene in acute myocardial infarction and biological implications for longevity. *Haematologica* 2008;93(4):637–8.
- [11] Balistreri CR, Carruba G, Calabrò M, Campisi I, Di Carlo D, Lio D, et al. CCR5 proinflammatory allele in prostate cancer risk: a pilot study in patients and centenarians from Sicily. *Ann NY Acad Sci* 2009;1155:289–92.
- [12] Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafè M, et al. Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 – 1082 promoter SNP and its interaction with TNF-alpha – 308 promoter SNP. *J Med Genet* 2003;40(4):296–9.
- [13] Rea IM, Middleton D. Is the phenotypic combination A1B8Cw7DR3 a marker for male longevity? *J Am Geriatr Soc* 1994;42(9):978–83.
- [14] Yang Y, Kozloski M. Sex differences in age trajectories of physiological dysregulation: inflammation, metabolic syndrome, and allostatic load. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011;66(5):493–500.
- [15] Eskes T, Haanen C. Why do women live longer than men? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;133(2):126–33.

Sometido a la revista *The Journal of Infectious Diseases*.

Major Article

**Association of BST-2 gene variants with HIV disease progression underscores the BST-2 role in HIV-1 infection**Marina Laplana<sup>1</sup>, Antonio Caruz<sup>2</sup>, Juan Antonio Pineda<sup>3</sup>, Teresa Puig<sup>4</sup> and Joan Fibla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Genètica Humana, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida and Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLLEIDA), Lleida, Spain. <sup>2</sup>Immunogenetics Unit, Faculty of Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain. <sup>3</sup>Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain. <sup>4</sup>Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

**Abstract**

We tested bone marrow stromal cell antigen-2 (*BST-2*) gene variants rs3217318, a promoter 19 bp insertion/deletion polymorphism, and rs10415893, a 3'UTR tagSNP, for association with human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection and disease progression. The study included 353 subjects exposed to HIV-1, 185 infected and 171 noninfected, and 188 healthy controls. A first drop in CD4 cell count below 200 cells/ $\mu$ L was the outcome indicator for progression in HIV-1 infected subjects. Association with progression was found for both rs3217318 and rs10415893 following an overdominant model. Diplotype analysis reveals the faster progression to outcome for those carrying the rs3217318-i19\_rs10415893-A (i19\_A) haplotype. Luciferase reporter assay showed that a promoter sequence containing i19 allele had the lowest expression levels, suggesting that i19 allele carriers could have less *BST-2* expression, reducing their capability to retain viral particles. These results point to the relevance of *BST-2* as a host genetic factor modifying HIV-1 disease progression.

Key words: *BST-2*; Tetherin; CD317, rs10415893; rs3217318; HIV-1 infection; HIV-1 disease progressio

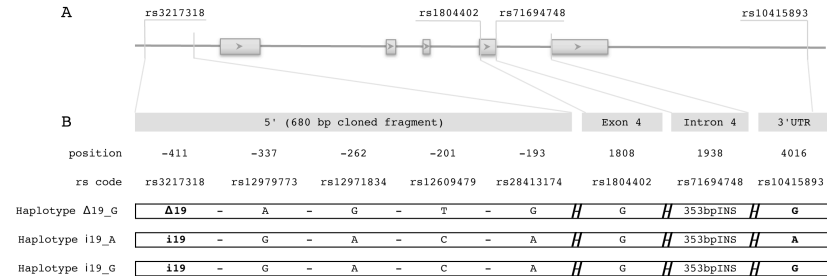
**Introduction**

Bone marrow stromal cell antigen 2 (*BST-2*), also known as Tetherin, HM1.24, and CD317, is a 30-36-kDa, 180-amino acid, heterogeneously glycosylated dimeric type II transmembrane protein [1]. As a newly identified component of the innate immune response to enveloped viruses, *BST-2* has been described as a host restriction factor for human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) [2,3]. *BST-2* inhibits the release of viral particles from infected cells by tethering them to the cell surface and to other retained viral particles. In addition, it has been suggested that *BST-2* may abrogate the infectivity of released HIV-1 particles [4]. The HIV-1 accessory protein Vpu counteracts *BST-2* antiviral activity by sequestering it from the cell surface as well as promoting its subsequent degradation, leading to increased viral release [3,5-7].

The *BST-2* gene, located in chromosome 19 and covering a region of 2.71Kb, encodes *BST-2*/Tetherin [8]. The *BST-2* gene is constitutively expressed in B cells, pancreas, liver, lung, and heart [8,9] but there is controversy about its expression in T cells, monocytes, macrophages,

and plasmacytoid dendritic cells; it can be induced by interferon in other cell types [9,10].

The molecular mechanisms involved in *BST-2* restriction of viral egress and the countermeasures employed by various viruses have been comprehensively characterized [11-13]. Additional host restriction factors have been described, such as the cytidine deaminase apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G (APOBEC3G); tripartite motif-containing protein 5 alpha isoform (TRIM5a); and the newly described SAMHD1 [14,15]. Data supporting their role in HIV infection comes from both experimental trials [16] and association studies of known gene variants [17,18]. The action of *BST-2* restricting viral egress from the cell surface mainly suggests the association of *BST-2* gene variants with progression rates, but also a potential role in susceptibility to infection. Following this hypothesis, the present study tested *BST-2* gene variants for association with HIV-1 infection and disease progression. The analysis included HIV-1 infected, exposed noninfected, and healthy subjects. Our results support the involvement of *BST-2* in HIV-1 disease progression.



**Figure 1.** Exon-intron structure and haplotypes of *BST-2* gene. A) Exon-intron structure of *BST-2* gene with location of rs3217318, rs180402, rs71694748, and rs10415893 genotyped polymorphisms. B) Differences observed between haplotypes of homozygous selected  $\Delta 19\_G$ , i19\_A, and i19\_G individuals at both 680 bp cloned fragment and genotyped markers.

## Methods

### Study populations

The study included 353 subjects exposed to HIV-1, 185 infected (HIV+) and 171 noninfected, and 188 healthy subjects (controls). The main characteristics of the HIV+ cohort have been previously described [19,20]. Briefly, the Lleida AIDS Cohort is a prospective seroprevalent cohort of HIV-1 infected patients belonging to the intravenous drug users risk group drawn from all HIV-1 seropositive adults enrolled in the AIDS Service of the Hospital Arnau de Vilanova. Only white Caucasian patients recruited between 1982 and 1991 were included in the cohort. All patients selected were in follow-up for more than 7 years (median, 127.7 months; range 84-198 months). A first drop in CD4 cell count below 200 cells/ $\mu$ L level was used as the outcome indicator for progression. The observation period for progression status ended in December 1999. Epidemiological and clinical characteristics of the HIV+ cohort are presented in Supplementary Table 1. The main characteristics of the exposed noninfected subjects, who were enrolled in prospective cohort studies, have been previously described [21]. In the present study, 46 exposed noninfected subjects were added to our previous cohort, all of them conforming to recruitment requirements, as described in de la Torre et al 2008 [21]. In addition, a group of 188 nonexposed male Caucasians recruited from anonymous blood donors and who tested negative for HIV-1 and hepatitis C virus was used as a control sample. All participants gave written informed consent. Ethics committees of the participating hospitals approved the study.

### Selection of *BST-2* polymorphic variants and genotyping

Selection of *BST-2* candidate polymorphisms followed several different strategies. We calculated the pairwise linkage disequilibrium (LD)  $D'$  for the *BST-2* gene region using Haploview 4.2 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) for HapMap CEU population [22]. Block structure was considered for marker pairs showing  $D' > 0.8$ , following the Haploview "solid-spine" block definition. An LD block covering the entire gene was observed, from which we selected rs10415893 as tagSNP. In addition, we included markers annotated at dbSNP because of their putative functional effect. The selected polymorphisms were rs71694748, a 353bp insertion/deletion polymorphism that covers the 4<sup>th</sup> intron; rs1804402, a G to T change that causes a nonsynonymous mutation located in the 4<sup>th</sup> exon; and rs3217318, a 19bp insertion/deletion polymorphism located at -411. Marker positions are indicated in Figure 1A.

Sample DNA was extracted from fresh peripheral mononuclear blood cells and frozen whole blood. Genotyping was carried out following protocols described in Supplementary Table 2. For each polymorphism, assay validation was performed using a minimum of 5 representative individuals whose genotypes had been previously determined by sequencing.

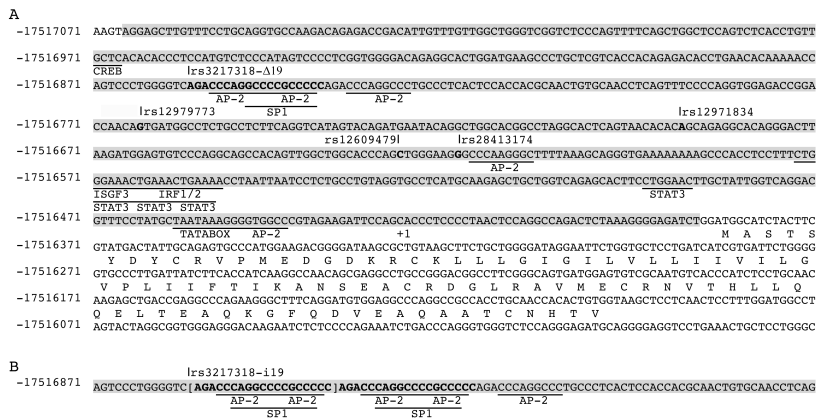
### *BST-2* promoter cloning, transient transfection, and functional assay.

The promoter region of *BST-2* contains some *cis* regulatory elements including a tandem repeat of 3 IL-6 response type II element/APRF sites,

IFN response elements IRF-1/2, ISGF3, and GAS; several IL-6 response type I elements/NF-IL-6 sites; and AP-2 and Sp1 binding sites [1] (Figure 2A). The rs3217318 insertion allele (rs3217318-i19) modifies the promoter sequence, increasing the number of AP-2 and Sp1 binding sites (Figure 2B). A 680bp fragment of *BST-2* promoter from -640 to +40 position containing rs3217318 polymorphism was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using Qiagen Multiplex PCR kit (QIAGEN), following the manufacturers instructions, from genomic DNA of 2 homozygous individuals harboring Δ19\_G and i19\_A haplotypes. The primers used were *NotI\_Forward*: 5'-ACTGACTAGTAGGAGCTTGTTCCTGCAGGTGCCAAGACAG-3' and *SpeI\_Reverse*: 5'-ACTGGCCGCCGCCAGATCTCCCCTTTAGAGTCTGGCCTGGAG-3' (restriction enzyme recognition sites are underlined). PCR products were separated by agarose gel electrophoresis, methylene blue stained, gel excised, and cloned in pGEM easy vector system I (Promega) generating PGEM-Δ19 and PGEM-i19 plasmids. The fidelity of PCR amplifications and subcloning was confirmed by DNA sequencing by capillary electrophoresis of plasmid inserts for both strands, using BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit in 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Luciferase (LUC) reporter plasmids were constructed by digestion of PGEM-Δ19 and PGEM-i19 constructions with restriction enzymes *NotI* and *SpeI*. The products were directionally ligated to the promoterless PACNV-LUC plasmid [23], obtaining P-Δ19-LUC

and P-i19-LUC reporter plasmids. Transfected U373 cells were used to evaluate luciferase expression from P-Δ19-LUC and P-i19-LUC constructions. U373 cells were washed with cold PBS and suspended in serum-free RPMI 1640 media supplemented with 10mM dextrose and 0.1mM dithiothreitol (Gibco). Transient transfection of U373 cells (3x10<sup>6</sup>) was performed by electroporation (Gene pulser II Electroporation system, Biorad) at 260V, 1200μF, and ∞Ω with 2μg of the reporter plasmid per 10<sup>6</sup> U373 cells and cotransfected with 625ng of PSV-β-Galactosidase reporter plasmid (Promega).

Transfected cells were cultured in 10ml of RPMI 1640 for 24 hours and then cultured in the presence (stimulated) or absence (unstimulated) of 10ng/mL γ-interferon for 24 and 48 hours. Luciferase activity was measured in a Berthold Sirius V2 luminometer as previously described [15]. In parallel, cells were washed with PBS and processed for β-Galactosidase Chemiluminescent Assay (Roche) and Bradford Protein Assay (Bio-Rad). The transfection efficiency was calculated after normalization by β-Galactosidase and protein content. All the experiments were repeated a minimum of 3 times. Results were expressed as the mean value of normalized luciferase activity (± standard deviation). Differences were tested by t-test (P<0.05).



**Figure 2.-** A) Promoter region of *BST-2* gene including transcription factor binding sites (as described by Ohtomo et al. 1999) and the studied polymorphisms. The 680 bp cloned region is indicated in grey. Polymorphisms are indicated in bold under their rs code. Sequence at the rs3217318 is represented by the deletion allele. B) Sequence surrounding rs3217318 corresponding to insertion allele indicating the duplicated transcription factor binding sites, with inserted sequence in brackets.

### Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium was tested comparing expected and observed genotype frequencies using a Chi-square test. Allele, genotype, and haplotype frequencies were estimated and compared using pLink software [24]. Complementary analysis was performed by SPSS-18.0 software. Single-marker association P-values were corrected for multiple testing following the SNP spectral decomposition approach, a modified Bonferroni-corrected nominal threshold of  $P = 0.05/N$ , where N is the "effective number of independent marker loci" after consideration of linkage disequilibrium between markers. N was calculated using the SNP spectral decomposition approach web-based program SNPSpD (<http://http://gump.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSpD>). According to this, the experiment-wide significance threshold required to keep Type I error rate at 5% was  $P < 0.043$ . In addition, we performed Bonferroni adjustments dividing the significance level (0.05) by the number of pairwise comparisons for the genotype association test ( $P=0.0071$ ) and dividing by the number of major haplotypes (i.e., >5%) for the haplotype association test ( $P=0.016$ ).

We explored the relationship between *BST-2* polymorphisms and HIV-1 disease progression by conducting a nested case-control study on HIV+ patients. Progressors were defined as HIV+ patients who exhibited a drop in CD4 cell count below 200 cells/ $\mu$ L ( $n=110$ ). Nonprogressors were patients who maintained CD4 cell counts >200 cells/ $\mu$ L during follow-up ( $n=75$ ). We also determined HIV-1 disease progression profiles for HIV+ patients grouped according to genotypes by Kaplan-Meier survival analysis. Differences between genotype groups were compared by Log-Rank test. Hazard ratios were estimated using a Cox proportional hazard model adjusted for sex, age at first HIV-1 positive test, and CCR5 $\Delta$ 32 genotype (as previously reported for this cohort [20]). Patients were censored at either their last clinic examination date or date of death if not caused by AIDS (1 patient died of heroine overdose before reaching the study outcome). A  $P$ -value <0.05 was considered statistically significant.

### Results

After genotyping all individuals, rs71694748 and rs1804402 were found to be monomorphic.

In contrast, rs10415893 (tagSNP) and rs3217318 (promoter insertion/deletion) were polymorphic and conformed to Hardy-Weinberg equilibrium in all groups.

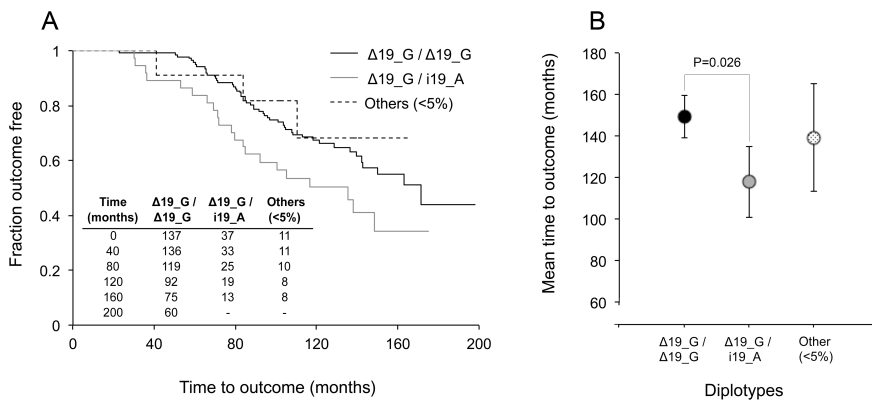
We evaluated differences in genotype and allele distribution of rs10415893 and rs3217318 polymorphisms between the study groups. No statistical differences were observed for global distribution of genotypes and alleles between HIV+, exposed noninfected, and control groups (Table 1). Assessment of genotype association with progression took into account CDC87, CDC93 and a drop in CD4 cell count below 200/ $\mu$ L (CD4<200/ $\mu$ L) as progression criteria (data not shown). Statistically significant association with progression was found only when a CD4 cell count below 200/ $\mu$ L was considered as a criterion for progression (Table 1). This led us to define progressors as HIV+ patients who exhibited a drop in CD4 cell count below 200 cells/ $\mu$ L ( $n=110$ ) and nonprogressors as those who maintained CD4 cell counts >200 cells/ $\mu$ L during follow-up ( $n=75$ ). We found an underrepresentation of rs3217318-i19 and rs10415893-A alleles in nonprogressors; the difference between nonprogressors and healthy controls reached statistical significance for the rs10415893-A allele (Odds Ratio (OR)=1.8; 95% Confidence Interval (CI): 1.1-3;  $P=0.02$ ) (Table 1). In addition, we observed an underrepresentation of rs3217318- $\Delta$ 19/i19 and rs10415893-G/A heterozygotes in nonprogressors that follows an overdominant model (Table 1). Kaplan-Meier analysis showed faster progression to a first drop in CD4 cell count below 200/ $\mu$ L for rs10415893-G/A heterozygotes (119 months of median survival time; 95%CI: 102-136) than for rs10415893-(G/G+A/A) homozygotes (150 months of median survival time; 95%CI: 140-160) (Log-Rank test  $P=0.028$ ), as well as a faster progression to outcome for rs3217318- $\Delta$ 19/i19 heterozygotes (121 months of median survival time; 95%CI: 104-137) than for rs3217318-( $\Delta$ 19/ $\Delta$ 19+i19/i19) homozygotes (150 months of median survival time; 95%CI: 140-160) (Log-Rank test  $P=0.046$ ). Cox proportional Hazard Ratio (HR) for progression of both heterozygotes, rs10415893-G/A and rs3217318- $\Delta$ 19/i19, was significant for the unadjusted model (HR<sub>0</sub>=1.75; 95%CI: 1-2.9,  $P=0.03$  and HR<sub>0</sub>=1.6; 95%CI: 1-2.7,  $P=0.049$ , respectively). Significance remained after adjusting for sex, age at HIV+ test, and CCR5 $\Delta$ 32 genotype association with progression of

rs10415893-G/A (HR<sub>a</sub>=1.73; 95%CI: 1-2.9; P=0.034).

Strong linkage disequilibrium was observed between rs10415893 and rs3217318 polymorphisms that permitted haplotype-based analysis. Global haplotype distribution showed a trend for differences between nonprogressors vs. controls (P=0.056) and nonprogressors vs. exposed noninfected (P=0.044) (Table 1). The haplotype-specific test revealed an underrepresentation of the rs3217318-i19\_rs10415893-A (i19\_A) haplotype in nonprogressors (10.6%) compared with controls (16.3%) (OR=1.6; 95%CI: 1-2.7; P=0.057). Diplotype imputation was performed by pLink with probability of imputation >0.99. Diplotype counts for the common Δ19\_G/Δ19\_G and Δ19\_G/i19\_A and rare (<5%) diplotypes are shown in Table 1. The Δ19\_G/Δ19\_G diplotype was overrepresented in nonprogressors, reaching nominal differences in the comparison with controls (OR=0.57; 95%CI:0.33-0.99; P=0.047) while Δ19\_G/i19\_A diplotype was underrepresented in nonprogressors, showing nominal differences in the comparisons with controls (OR=2.14; 95%CI:1.1-4; P=0.01), progressors (OR=2.2; 95%CI:1.2-4.2; P=0.01), and exposed noninfected (OR=2.3; 95%CI:1.1-4.7; P=0.025). Kaplan-Meier survival analysis for disease progression according to diplotype status reveals a significantly faster progression rate for those carrying the Δ19\_G/i19\_A diplotype (mean time to progression of 118 months; 95%CI: 101-135) compared to those carrying Δ19\_G/Δ19\_G diplotype (mean time of

150 months; 95%CI: 139-160) (Log-Rank test P=0.026) (Figure 3 A,B). Cox proportional HR for progression of Δ19\_G/i19\_A diplotype compared to Δ19\_G/Δ19\_G diplotype was significant under unadjusted (HR<sub>u</sub>=1.8; 95%CI: 1-2.9, P=0.028) and adjusted (HR<sub>a</sub>=1.7; 95%CI: 1-2.9; P=0.034) models.

In accordance with our clinical protocol, patients only entered treatment as a result of their negative clinical evolution. As a consequence, “entering treatment” is the main factor for progression in our cohort, masking any other factor that we might consider (data not shown). This precludes the inclusion of the confounding factor “entering treatment” in our analysis. In order to overcome this limitation, we evaluated the association of *BST-2* diplotypes with progression after stratifying by treatment. As for the nonstratified analysis, an overrepresentation of Δ19\_G/i19\_A heterozygotes was observed in progressors. Thus, in nontreated patients 1 of 3 (33.3%) Δ19\_G/i19\_A heterozygotes progress to outcome, while only 2 of 28 (7.1%) Δ19\_G/Δ19\_G homozygotes were progressors. Also, in treated patients 20 of 34 (59%) of Δ19\_G/i19\_A heterozygotes progress to outcome while only 49 of 109 (45%) of Δ19\_G/Δ19\_G homozygotes were progressors. Although these differences do not reach statistical significance, probably due to the stratification reducing the number of subjects, our results seem to indicate that the effect of *BST-2* diplotypes act in the same way in both treated and nontreated patients.



**Figure 3.-** Kaplan-Meier survival analysis for rs10415893\_rs3217318 diplotypes. A) Outcome-free fraction of HIV-1 infected patients during follow-up. A first drop in CD4 cell count below 200 cells/μL was used as the outcome indicator for progression. The table inside the figure indicates the number of patients in each group at selected time-points. B) Mean time to outcome (months, ±95% confidence interval). Other diplotypes were Δ19\_G/i19\_G (n=5, 2.7%), i19\_A/i19\_A (n=5, 2.7%), and i19\_G/i19\_A (n=1, 0.5%).

Table 1.- Genotype, allele, haplotype and diplotype distribution of *BST-2* polymorphic variants rs3217318 and

Variants (rs code)		Prevalence in cohorts; n (%)					
		Controls	HIV-1 positive patients			Exposed noninfected	
			All	Progressors <sup>a</sup>	Nonprogressors		
rs3217318	Genotype	$\Delta 19/\Delta 19$	129 (69)	137 (74)	51 (68)	86 (78.2)	117 (68.4)
		$\Delta 19/i19$	52 (27.8)	42 (22.7)	22 (29.3)	20 (18.2) <sup>b</sup>	49 (28.7) <sup>b</sup>
		$i19/i19$	6 (3.2)	6 (3.3)	2 (2.7)	4 (3.6)	5 (2.9)
	Allele	$\Delta 19$	310 (82.8)	316 (85.4)	124 (82.6)	186 (86.9)	283 (82.7)
		$i19$	64 (17.2)	54 (14.6)	26 (17.4)	28 (13.1)	59 (17.3)
rs10415893	Genotype	GG	128 (68) <sup>c</sup>	142 (76.8)	52 (69.3)	90 (81.8) <sup>c</sup>	119 (70)
		GA	55 (29.3) <sup>d</sup>	38 (20.5)	21 (28) <sup>d</sup>	17 (15.5) <sup>d</sup>	47 (27.7) <sup>d</sup>
		AA	5 (2.7)	5 (2.7)	2 (2.7)	3 (2.7)	4 (2.3)
	Allele	G	311 (82.7)	322 (87)	125 (83.3)	197 (89.5)	285 (83.8)
		A	65 (17.3) <sup>e</sup>	48 (13)	25 (16.7)	23 (10.5) <sup>e</sup>	55 (16.2) <sup>e</sup>
rs3217318 & rs10415893	Haplotype counts	$\Delta 19\_G$	307 (82.1)	310 (85.2)	122 (82.4)	188 (87)	283 (83.2)
		$i19\_A$	61 (16.3) <sup>f</sup>	48 (13.2)	25 (16.9)	23 (10.6) <sup>f</sup>	55 (16.2)
		$i19\_G$	3 (0.8)	6 (1.6)	1 (0.7)	5 (2.3)	2 (0.6)
		$\Delta 19\_A$	3 (0.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Diplotype counts	$\Delta 19\_G / \Delta 19\_G$	126 (67.4) <sup>g</sup>	137 (74)	51 (68)	86 (78.2) <sup>g</sup>	117 (68.8)
		$\Delta 19\_G / i19\_A$	50 (26.7) <sup>h</sup>	37 (20)	21 (28) <sup>h</sup>	16 (14.5) <sup>h</sup>	47 (27.7) <sup>i</sup>
		Other (<5%) <sup>i</sup>	11 (5.9)	11 (6)	3 (4)	8 (7.3)	6 (3.5)

HIV+ : Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected subjects. NP: nonprogressors.

Missing genotypes were: 1 healthy control at rs3217318 and 1 exposed noninfected subject at rs10415893.

<sup>a</sup> Progressors were those with falling CD4 cell count <200/ $\mu$ L.

<sup>b</sup>  $\Delta 19/i19$  genotype (homozygotes vs. heterozygotes) is under-represented in NP when compared with exposed noninfected (Odds Ratio (OR)= 1.82; 95% Confidence Interval (CI):1-3.2;  $P=0.046$ ).

<sup>c</sup> G/G genotype is over-represented in NP when compared with healthy controls (OR= 2.1; 95%CI:1.2-3.7;  $P=0.01$ )

<sup>d</sup> G/A genotype is under-represented in NP when compared with healthy controls (OR=2.3; 95%CI:1.2-4.1;  $P=0.007$ ), progressors (OR=2.1; 95%CI:1-4.4;  $P=0.04$ ) and exposed noninfected (OR=2.1; 95%CI:1.1-3.9;  $P=0.017$ ).

<sup>e</sup> A allele is under-represented in NP when compared with healthy controls (OR=1.8; 95%CI:1.1-3;  $P=0.02$ ) and exposed noninfected (OR=1.6; 95%CI:0.98-2.8;  $P=0.056$ )

<sup>f</sup>  $i19\_A$  haplotype is under-represented in NP when compared with healthy controls (OR=1.6; 95%CI:1-2.7;  $P=0.057$ )

<sup>g</sup>  $\Delta 19\_G/\Delta 19\_G$  diplotype is over-represented in NP when compared to healthy controls (OR=0.57; 95%CI:0.33-0.99;  $P=0.047$ )

<sup>h</sup>  $\Delta 19\_G/i19\_A$  diplotype is under-represented in NP when compared to healthy controls (OR=2.14; 95%CI:1.1-4;  $P=0.01$ ), progressors (OR=2.2; 95%CI:1.2-4.2;  $P=0.01$ ) and exposed non-infected (OR=2.3; 95%CI:1.1-4.7;  $P=0.025$ )

<sup>i</sup> Other diplotypes were:  $\Delta 19\_G/i19\_G$  (n=5, 2.7%),  $i19\_A/i19\_A$  (n=5, 2.7%) and  $i19\_G/i19\_A$  (n=1, 0.5%)

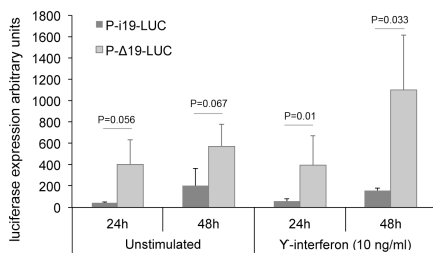
Epidemiological and clinical characteristics of the HIV+ patients, grouped according to *BST-2* diplotypes, are shown in Supplementary Table 1. Stage 3 (CD4+ cell count <200 cell/ $\mu$ L) patients were overrepresented in  $\Delta 19\_G/i19\_A$  heterozygotes (OR=2.3; 95%CI: 1.1-4.8;  $P=0.041$ ). The lowest median CD4 cell count and the highest viral load were observed in  $\Delta 19\_G/i19\_A$  heterozygotes, but only the first reached statistical significance ( $P=0.018$ ). The reduced number of patients with reliable viral load data (n=135) could have weakened the power to reach significance.

We cloned and sequenced 680 bp of the promoter from 8 individuals' homozygotes for

$\Delta 19\_G$ , 2 individuals' homozygotes for  $i19\_G$ , and 6 individuals' homozygotes for  $i19\_A$  haplotypes. Differences found between the promoter regions of the individuals bearing these haplotypes are shown in Figure 1B. Cloned 680 bp fragment coming from  $i19\_G$  and  $i19\_A$  haplotypes did not show differences at the sequence level. In contrast, the sequence of  $\Delta 19\_G$  haplotype differed from that obtained of  $i19\_A$  haplotype at described SNPs (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) rs12979773, rs12971834, rs12609479, and rs28413174 that showed full linkage with rs3217318 insertion/deletion polymorphism (Figure 1B). According to this, the 680 bp promoter fragments obtained from  $\Delta 19\_G$  and  $i19\_A$



homozygotes were cloned in the reporter plasmid P $\Delta$ CNV-LUC. Luciferase activity measured in U373 transfected cells after 24 and 48 hours of culture showed basal overexpression of the P- $\Delta$ 19-LUC construct, although this did not reach significance at 5% threshold (P-i19-LUC vs. P- $\Delta$ 19-LUC at 24h: 38.8 vs 400.5,  $P=0.056$  and at 48h: 201.9 vs 574.6,  $P=0.067$ ; respectively)(Figure 4). Trying to mimic physiological conditions, we performed our experiments using  $\gamma$ -interferon stimulus because it induces a more strongly IRF1-mediated response [25]. Under these new conditions the differences between P-i19-LUC and P- $\Delta$ 19-LUC constructs were even higher, reaching statistical significance at both 24 hours (56.9 vs 394.5,  $P=0.010$ ) and 48 hours (159.1 vs 1100.6,  $P=0.033$ ) of stimulation. In addition, we found that 48-hour  $\gamma$ -interferon stimulus bolstered luciferase activity in the P- $\Delta$ 19-LUC construction (basal vs stimulated at 48h: 574.6 vs 1100.6,  $P=0.174$ ), but seemed to have no effect on P-i19-LUC construction.



**Figure 4.-** Mean luciferase activity ( $\pm$ sd), normalized by  $\beta$ -Galactosidase and protein content, in unstimulated and  $\gamma$ -interferon stimulated conditions at 24 and 48 hours of U373 cells transiently transfected with P-i19-LUC (black columns) and P- $\Delta$ 19-LUC (grey columns) reporter plasmids.

## Discussion

Host genetic factors have been identified that affect susceptibility to infection as well as modulating disease progression rates [26]. In addition, cellular restriction factors that interfere with the virus life cycle have been described. Among them, APOBEC3G, TRIM5a, and the recently described BST-2 cellular restriction factors have been comprehensively studied [16]. Supporting evidence for the role of APOBEC3G and TRIM5a in HIV-1 infection comes from both experimental and genetic association studies testing genetic variability at each gene *locus* in relation to susceptibility to infection and disease progression. In contrast, the experimental evidence that supports BST-2

as an HIV-1 restriction factor has not been complemented with genetic association studies.

In the present study we evaluated *BST-2* gene variability in relation to both susceptibility to HIV-1 infection and disease progression rates. The prevalence of two polymorphic *BST-2* gene variants, rs10415893 and rs3217318, was determined in 3 previously described cohorts of seroprevalent HIV positive patients, HIV-1 exposed noninfected, and healthy control subjects [19,20].

Single *locus* association with progression was found for rs10415893, a tagSNP located downstream of the *BST-2* gene that captures the variability at the *BST-2 locus*. Rs10415893-A allele and rs10415893-G/A heterozygotes were associated with progression as reflected by their lower prevalence in nonprogressors than in progressors and healthy controls. In addition, survival analysis indicates a faster progression to outcome for HIV+ rs10415893-G/A heterozygote patients fitting an overdominant model. In an attempt to identify a causative polymorphism we tested the tagged promoter rs3217318 polymorphism, whose rs3217318-i19 allele increases the number of AP-2 and Sp1 promoter binding sites. In spite of the strong linkage disequilibrium observed between rs10415893-A and rs3217318-i19 alleles, rs3217318 polymorphism showed only a marginal association with progression for rs3217318- $\Delta$ 19/i19 heterozygotes under an overdominant model. Nevertheless, diplotype analysis including rs10415893 and rs3217318 allowed us to detect a marginal association with infection and a significant association with faster progression for those carrying the  $\Delta$ 19\_G/i19\_A diplotype.

As reflected by the luciferase assay, the promoter haplotype containing the rs3217318-i19 allele had lower expression levels and it seems to not respond to  $\gamma$ -interferon stimulus. This result suggests that individuals carrying the rs3217318-i19 haplotype could have lower BST-2 protein levels as well as compromised response to stimulus. As BST-2 inhibits the release of viral particles from infected cells by tethering them to the cell surface, lower levels of BST-2 could implicate lower retention of viral particles. In accordance with the obtained results, HIV+ patients carrying the heterozygote  $\Delta$ 19\_G/i19\_A diplotype showed a faster progression to outcome, indicating that

heterozygosis for i19\_A haplotype could be a risk factor to a faster progression. The standard overdominant model deals with variants affecting the protein structure that confers advantage (overdominance) or disadvantage (underdominance) to heterozygotes with respect to homozygotes. Nevertheless, regulatory variants affecting protein quantity can also produce an overdominant effect in heterozygotes [27]. Allele tissue-specific expression has been described in heterozygous individuals for promoter polymorphisms at the HLA-DQB1 locus. HLA-DQB1\*0301 allele shows higher expression than HLA-DQB1\*0302 allele in primary skin cells, while the expression is reversed in other tissues such as mononuclear cells and B-lymph cells in peripheral blood [28]. This can result in an overdominant behavior in which \*0301/\*0302 heterozygotes have a broad HLA-DQB1 expression while in homozygotes the expression is tissue-restricted. On the other hand, we cannot exclude that the overdominant effect we attributed to the  $\Delta 19\_G/i19\_A$  haplotype combination could be due to a masked coding variant dragged by the high linkage disequilibrium region surrounding *BST-2* gene.

Studies of *BST-2* antagonism by primate lentiviruses have led to the hypothesis that *BST-2* provided a barrier to cross-species transmission of HIV-1 (and HIV-2) to humans. This, together with the apparent lack of a *BST-2* counteracting activity in group O viruses, has led researchers to consider that *BST-2* might tend to inhibit transmission between individuals more than limit pathogenesis in the individual [29]. Our current study points to the opposite conclusion where *BST-2* variants conferring reduced *BST-2* levels are associated with HIV-1 pathogenesis without modifying susceptibility to infection.

We acknowledge a number of limitations in our study. First, comparisons between blood donors designated as the healthy reference cohort and intravenous drug users as the disease cohort could have induced some bias. In order to minimize bias related to intravenous drug use, comparisons were also performed between infected and noninfected exposed intravenous drug users. On the other hand, the main results regarding disease progression were obtained from survival analysis of infected intravenous drug users, in which bias for intravenous drug use is not expected. Second, in the statistical

analysis we used the SNP spectral decomposition approach to correct for multiple testing in the single marker association test. In order to be more restrictive we also considered Bonferroni correction including the number of comparisons performed between groups. Under these conditions, single marker associations reach nominal significance, which requires caution when interpreting results.

We report the association of *BST-2* rs10415893 tagSNP and the tagged rs3217318 insertion/deletion polymorphism with HIV disease progression, in line with our initial hypothesis that *BST-2* gene variants are chiefly associated with progression rates while marginally related with susceptibility to infection. Based on our initial screening we discarded the nonsynonymous rs1804402 and the intronic insertion/deletion rs71694748 polymorphism as potential causative variants. Functional assay suggest that the tagged promoter rs3217318 insertion/deletion polymorphism could modify the *BST-2* expression levels.

The present study must be considered as an initial approach in the characterization of the genetic component of *BST-2* in HIV-1 infection and disease progression that complements the robust experimental evidence with genetic association data. Replication in larger cohorts will be needed in order to confirm our findings. In addition, further analysis will be required to identify and characterize other causative variants tagged by rs10415893 marker that, in addition to rs3217318, could contribute to the association detected.

#### **Funding statement:**

This work was supported by “Fondo de Investigaciones Sanitarias” (FIS), to J.F. (ref.: PI021476 and PI051778) and A.C. (ref.: PI021205) and by “Fundació Marató TV3” to J.F. (ref.: 020730) and A.C. (ref.: 020732). JAP is the recipient of an intensification grant from the “Fundación Progreso y Salud de the Consejería de Salud” (Junta de Andalucía; Ref.: AI-0021).

#### **Acknowledgments**

ML received a fellowship from the University of Lleida. We would especially like to thank the patients and voluntary donors for their willingness to participate in this study. We also thank Elaine Lilly, Ph.D. (Writer’s First Aid), for English language revision of the manuscript.

## References

1. Ohtomo T, Sugamata Y, Ozaki Y, Ono K, Yoshimura Y, Kawai S, et al. Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258(3):583-91.
2. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008; 451(7177):425-30.
3. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, et al. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 2008; 3(4):245-52.
4. Zhang J, Liang C. BST-2 diminishes HIV-1 infectivity. *J Virol* 2010; 84(23):12336-43.
5. Douglas JL, Viswanathan K, McCarroll MN, Gustin JK, Früh K, Moses AV. Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a  $\beta$ TrCP-dependent mechanism. *J Virol* 2009; 83(16): 7931-47.
6. Hauser H, Lopez LA, Yang SJ, Oldenburg JE, Exline CM, Guatelli J, et al. HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment. *Retrovirology* 2010; 7:51.
7. Neil S, Eastman S, Jouvenet N, Bieniasz P. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2006; 2(5):e39.
8. Ishikawa J, Kaisho T, Tomizawa H, Lee BO, Kobune Y, Inazawa J, et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics* 1995; 26(3):527-34.
9. Erikson E, Adam T, Schmidt S, Lehmann-Koch J, Over B, Goffinet C, et al. In vivo expression profile of the antiviral restriction factor and tumor-targeting antigen CD317/BST-2/HM1.24/tetherin in humans. *PNAS* 2011; 108(33):13688-93.
10. Homann S, Smith D, Little S, Richman D, Guatelli J. Upregulation of BST-2/Tetherin by HIV infection in vivo. *J Virol* 2011; 85(20):10659-68.
11. Yondola MA, Fernandes F, Belicha-Villanueva A, Uccellini M, Gao Q, Carter C et al. Budding capability of the influenza virus neuraminidase can be modulated by tetherin. *J Virol* 2011; 85(6):2480-91.
12. Evans DT, Serra-Moreno R, Singh RK, Guatelli JC. BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends Microbiol* 2010; 18(9):388-96.
13. Douglas JL, Gustin JK, Viswanathan K, Mansouri M, Moses AV, Früh K. The Great Escape: Viral Strategies to Counter BST-2/Tetherin. *PLoS Pathog* 2010; 6(5):e1000913.
14. Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 2011; 474(7353): 658-61.
15. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 2011; 474: 654-57.
16. Wolf D, Goff SP. Host restriction factors blocking retroviral replication. *Annu Rev Genet* 2008; 42:143-63.
17. Javanbakht H, An P, Gold B, Petersen DC, O'Huigin C, Nelson GW, et al. Effects of human TRIM5 $\alpha$  polymorphisms on antiretroviral function and susceptibility to human immunodeficiency virus infection. *Virology* 2006; 354(1):15-27.
18. Valcke HS, Bernard NF, Bruneau J, Alary M, Tsoukas CM, Roger M. APOBEC3G genetic variants and their association with risk of HIV infection in highly exposed Caucasians. *AIDS* 2006; 20(15):1984-6.
19. Nieto G, Barber Y, Rubio MC, Rubio M, Fibla J. Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients. *J Steroid Biochem* 2004; 89-90:199-207.
20. Barber Y, Rubio MC, Fernández E, Rubio M, Fibla J. Host genetic background at CCR5 chemokine receptor and vitamin D receptor loci and human immunodeficiency virus (HIV) type 1 disease progression among HIV-seropositive injection drug users. *J Infect Dis* 2001; 184(10):1279-88.
21. de la Torre MS, Torres C, Nieto G, Vergara S, Carrero AJ, Macias J, et al. Vitamin D receptor gene haplotypes and susceptibility to HIV-1 infection in injection drug users. *J Infect Dis* 2008; 197(3):405-10.
22. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21(2):263-5.
23. García-Moruja C, Alonso-Lobo J, Rueda P, Torres C, González N, Bermejo M, et al. Functional characterization of SDF-1 proximal promoter. *J Mol Biol* 2005; 348(1):43-62.
24. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81:559-75.

25. Lehtonen A, Matikainen S, Julkunen I. Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *J Immunol* 1997; 159(2):794–803.
26. Kaslow RA, Dorak T, Tang JJ. Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. *J Infect Dis* 2005; 191 Suppl 1:S68–77.
27. Rockman MV, Wray GA. Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol Biol Evol* 2002; 19(11):1991–2004.
28. Beaty JS, Sukiennicki TL, Nepom GT. Allelic variation in transcription modulates MHC class II expression and function. *Microbes Infect* 1999; 1(11):919–27.
29. Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Münch J, Kim K-A, et al. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe* 2009; 6(5):409-21.