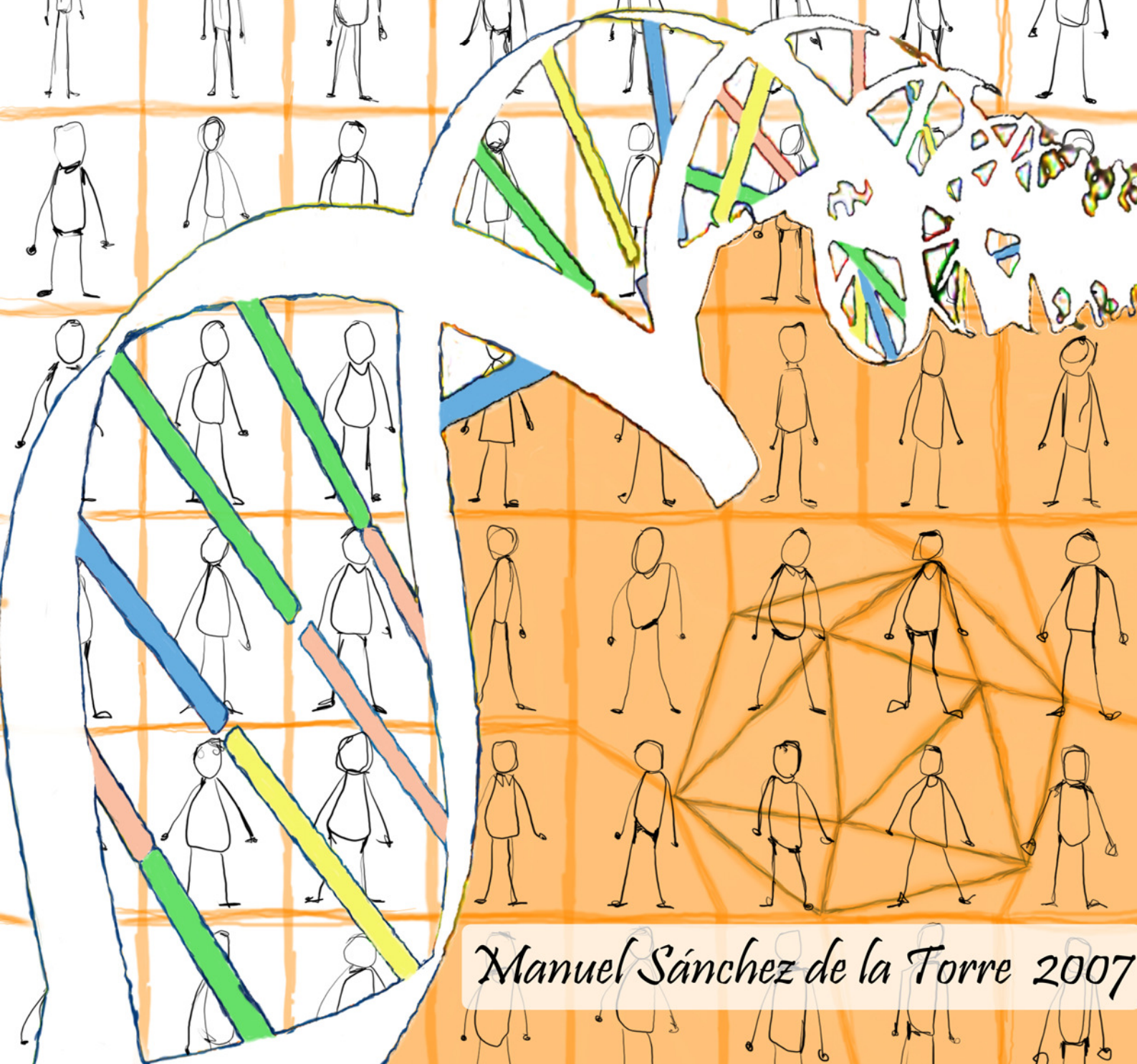


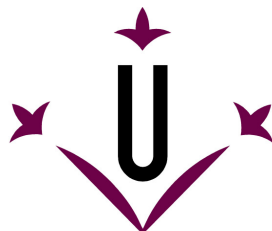
The background of the entire page is a grid of simple black stick figures. The grid is composed of approximately 8 columns and 10 rows of these figures. The figures are drawn in a minimalist style with simple lines for limbs and a rounded head. The grid is overlaid with a light orange grid pattern.

*Estudio de la variabilidad genética del huésped
en relación a la infección por VIH y ritmo
de progresión a sida.*

Genes VDR y CCR5.



Manuel Sánchez de la Torre 2007



**Estudio de la variabilidad genética del huésped
en relación a la infección por VIH y ritmo de
progresión a sida. Genes *VDR* y *CCR5***

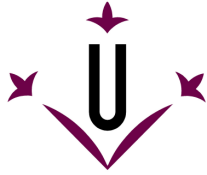
Memoria presentada por
Manuel Sánchez de la Torre

Para optar al grado de
Doctor por la Universitat de Lleida

Director:

Joan Fibla Palazón

Lleida, septiembre de 2007



Universitat de Lleida,

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Estudio de la variabilidad genética del huésped
en relación a la infección por VIH y ritmo de
progresión a sida. Genes *VDR* y *CCR5*

Manuel Sánchez de la Torre
Lleida, 4 de septiembre de 2007

Joan Fibla Palazón
Director



UNIVERSITAT DE LLEIDA
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
c/ Montserrat Roig, 2
Lleida-Catalonia-Spain
Tlf. +34 973702403
Fax. +34 973702426
e-mail : secretaria@cmb.udl.es

Joan Fibla Palazón, professor Titular d'Universitat de la Universitat de Lleida i com a Director del treball de Tesi Doctoral, "Estudio de la variabilidad genética del huésped en relación a la infección por VIH y ritmo de progresión a sida. Genes *VDR* y *CCR5*" realitzat per el Sr. Manuel Sánchez de la Torre,

CERTIFICO

que en el treball presentat per optar al Grau de Doctor en Ciències Biològiques, s'han assolit els objectius fixats a l'inici de la Tesi els quals han estat realitzats en el Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida. La memoria que es presenta constitueix un treball compacte que dona resposta a tota una sèrie de interrogants plantejats a l'entorn de la importància del estudi de les variants genètiques dels gens *VDR* i *CCR5* i la seva relació amb la susceptibilitat a la infecció per VIH i ritme de progressió a sida.

Per tant, considero apte aquest treball per procedir a la seva lectura i defensa davant la comissió corresponent.

Perquè així consti signo la present certificació a Lleida a 4 de setembre de 2007.

Dr. Joan Fibla Palazón

A Silvia
A mis padres
A mis hermanos

JOSEPHINE :-Osgud, he de ser sincera contigo, tú y yo no podemos casarnos.
OSGUD :-¿Por qué no?.
JOSEPHINE: -Primero, porque no soy rubia natural.
OSGUD: -No me importa.
JOSEPHINE: Y fumo, ifumo muchísimo!
OSGUD: -Me es igual.
JOSEPHINE: -Tengo un horrible pasado. Desde hace tres años estoy viviendo con un saxofonista.
OSGUD: -Te lo perdono.
JOSEPHINE: -Nunca podré tener hijos.
OSGUD: -Los adoptaremos.
JOSEPHINE: -¡No me comprendes, Osgud!. ¡Soy un hombre!
OSGUD: -Nadie es perfecto.

Con faldas y a lo loco (Some like it hot)
Billy Wilder, 1959

Diseño original de la portada: Daniel Sánchez de la Torre

Agradecimientos

Hay momentos en la vida en el que uno se detiene y mira hacia atrás en el tiempo tratando de encontrarse consigo mismo, tratando de saber dónde está y con qué propósito.

Muchas veces no es tarea fácil encontrar un sentido a la vida, y mucho menos encontrarlo en un momento concreto perdido en el tiempo y en apariencia carente de sincronía. En estas ocasiones tratamos de reconfortarnos pensando en lo que tenemos, en lo que hemos conseguido.

En estas ocasiones uno mismo no es capaz de dar respuesta a semejantes cuestiones y son estos los momentos en los que tratamos de aferrarnos a una mano amiga que consiga guiarnos entre el bullicio de nuestra propia vida.

Siempre me enseñaron, ya desde pequeño, que en esta vida lo más importante es dar gracias. Según esto entre estas líneas se escondería lo mejor de esta tesis. La práctica de este bonito gesto produce placer tanto en el que las da como en aquel que las recibe y no descarto que dicha práctica genere la liberación de una pequeña cantidad de endorfinas que reconforte nuestra existencia. No obstante y a pesar de lo que pudiera parecer es una práctica menos extendida de lo que debiera serlo y que el tiempo se empeña en erosionar. Resulta curioso incluso encontrar que la misma Real Academia Española nos dice que “La palabra gracias no está en el Diccionario”. Tendremos que conformarnos con encontrarla como acepción de la palabra gracia. Pero no nos perdamos en particularidades y sigamos caminando. Como iba diciendo, dar gracias es lo más importante de esta vida porque al hacerlo aceptamos nuestras limitaciones, aceptamos lo que somos y dónde estamos, aceptamos con quién estamos y lo que de ellos necesitamos. Y es en este punto cuando os empiezo a hablar de mí.

Gracias a las entidades que han dado soporte económico para la realización de esta tesis doctoral, en especial a la fundación de la Marató de TV3 por su gran implicación en el proyecto he hemos desarrollado y al AGAUR por concederme la beca para la realización de la presente tesis. Asimismo, quiero agradecer a todos los pacientes y personal voluntario que se ofreció para la participación en los estudios que se llevaron a cabo.

Agradecer al Club Hospitality del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida y al grupo de extracción de sangre del Hospital Santa María de Lleida por su colaboración en la recogida de muestras.

Gracias al honorable tribunal por su ofrecimiento desinteresado para la evaluación de la presente tesis doctoral.

Gracias Joan por tu ayuda a lo largo de este extraordinario periplo. Gracias por acompañarme durante estos cuatro años, por enseñarme todo aquello que conoces, todo aquello que has tenido a bien compartir

conmigo, que ha sido mucho. Sin tu ayuda estas líneas no estarían completas. Espero que el tiempo sepa proteger la buena relación tanto humana como profesional que hemos mantenido durante estos años y que podamos seguir contando el uno con el otro como siempre hemos hecho.

Gracias Silvia, por acompañarme desde hace tanto que se me nubla la memoria. Lleida es en nosotros porque tú lo quisiste. Gracias por tu "sí" sin condiciones, por tu apoyo, por tu sonrisa rescatadora, por ser tú desde que te levantas hasta que te acuestas y por tener todo lo bueno que a mí me falta y por faltarte todo lo malo que a mí me sobra. Gracias cariño.

Gracias Homer. Aún me pregunto como una cosita tan pequeña puede generar tanta felicidad.

Gracias Papa, gracias Mama, gracias María, gracias Daniel, gracias Lidia, gracias Alicia. No os puedo dar todo lo que os merecéis porque se me escapa de las manos. Sólo os puedo decir que en los momentos de soledad que la distancia alimentaba siempre estuvisteis junto a mí esperando con orgullo mi llegada. Siempre traté de estar ahí, no sé si lo pude conseguir. Estoy seguro de que vosotros sí lo hicisteis. Nunca lo olvidaré.

Gracias cuñados. Os hago extensibles las anteriores palabras, en especial a Enrique, a quien considero mi quinto hermano.

Gracias Cipri, gracias Aurora, gracias Jesús, gracias Rocío, gracias Mamen, gracias Juani. Sois mi segunda familia y siempre agradecí el calor con el que siempre me recibisteis y que tan importante ha sido durante este último tiempo.

Gracias tito Miguel, gracias tita M^o Angeles, gracias Francisco, gracias Luis. Estos años en Lleida nos han regalado momentos maravillosos que de ninguna otra forma podríamos haber vivido. Siempre los recordaré con mucho cariño.

Gracias Jesús, mi marianica. Gracias por compartir tantos momentos conmigo a lo largo de este tiempo. Siempre recordaré con cariño tus visitas explosivas que tanto me reconfortaban y los recuerdos de una infancia inolvidable que aún en estos días me acompañan en mi memoria.

Gracias Raúl, el chiqui. Has estado conmigo todo este tiempo, entendiendo lo que ha muchos se les escapaba y enseñándome grandes cosas de las que sólo tú fuiste responsable y que nadie más me ha sabido enseñar.

Gracias Antonio, gracias Patri, gracias Carmen, gracias Care, gracias Manu. Gracias por vuestra amistad y por vuestra ayuda profesional que tan importante ha sido para mi formación.

Y por fin, llegamos a la tierra que me acogió durante estos últimos años y a su gente; "els meus estimats lleidatans".

Gracias Sera por tu amistad. Nunca la olvidaré, para mí ha sido muy especial. Me voy de Lleida con la certeza de que no conoceré a nadie más como tú, creo que este mundo se te queda pequeño y doy gracias a Dios por haberte conocido, por haberte disfrutado al menos estos años. Sé que con el tiempo y con lágrimas en los ojos recordaré todas las noches abstractas que pudimos disfrutar y añoraré tus clases de claqué y ese movimiento de hombro patentando que nos regalas al bailar.

Gracias Sonia por tu amistad. Gracias por compartir conmigo tus verdades más remotas, por ser mi amiga y por acompañarme en los momentos duros que también he tenido que sufrir en estos años. Siempre estuviste conmigo y nunca lo olvidaré.

Gracias Rosa, gracias Toni, gracias Judith, gracias Felip, gracias Cardus, gracias Madris, gracias Moi. Completáis mi familia de Lleida y habéis sido terriblemente importantes para mí. Gracias por vuestra acogida, por los maravillosos momentos que pudimos compartir y por esas terrazas de juegos absurdos que siempre recordaré.

Gracias Xavi. Al final me va a costar desprenderme de ti y mucho más de lo que me hubiera imaginado. Gracias por estos años compartidos y por tantos momentos disfrutados. Gracias por haber estado conmigo y por tu reconfortante sinceridad.

Gracias Ana, gracias Olga, gracias Dolo, gracias Lidia, gracias Inma, gracias Xenia, gracias Sara, gracias Isis, gracias Neus, gracias Rïta, gracias María, gracias Marta, gracias Nuria L., gracias David De L., por vuestra amistad y por los momentos compartidos que tanto disfruté junto a vosotros. Gracias Lidia, gracias David A. por la gran ayuda técnica que me ofrecisteis durante estos años de tesis doctoral. Siempre estuvisteis dispuestos a ofrecerme lo mejor que me podíais dar.

Gracias David G., gracias Iolanda, gracias Josep, por vuestra ayuda y soporte técnico a lo largo de la tesis. Y gracias David G. por nuestras charlas matutinas que tanto añoraré.

Moltes gràcies a tots els meus estimats Lleidatans. Sempre us tindrè en el meu cor. Heu aconseguit que estimi la terra que trepitgeu. Heu aconseguit que l'estimi com si fos la meva i com a tal arrencaré un trosset d'aquesta i la emportaré amb mi allà on vagi.

Concluyo estos agradecimientos recordando un texto precioso que mi padre me mostró y que comienza diciendo: "Camina placidamente..."

Gracias a los que estáis y a los que no, a los que recuerdo y a los que olvido.

Gracias a todos.

Manuel.



Además de su papel en la regulación del metabolismo mineral, la vitamina D a través de su receptor intracelular (VDR), juega un papel significativo en la modulación de la respuesta inmune. Variantes del gen *VDR* han sido asociadas con la vulnerabilidad a enfermedades infecciosas como tuberculosis o lepra y recientemente con la progresión clínica de enfermos infectados por VIH-1, lo que pone de manifiesto el papel que la variabilidad del gen *VDR* puede jugar en la respuesta a agentes patógenos.

El gen *CCR5* codifica para un receptor de citoquinas actuando, junto a CD4, como principal correceptor del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-1-1). El estudio de variantes en el gen *CCR5* que alteren el patrón de expresión del receptor han sido asociadas con variaciones en la respuesta frente a la infección por VIH-1 y progresión a sida.

En la presente tesis doctoral se ha caracterizado la estructura de haplotipos del gen *VDR*. A partir del patrón de bloques observado se han seleccionado cinco variantes polimórficas localizadas en distintas regiones del gen *VDR* con el fin de evaluar su asociación con la vulnerabilidad a la infección por el VIH-1 y el ritmo de progresión a sida. Encontramos que el haplotipo GATGL del gen *VDR*, relacionado con una menor funcionalidad de la ruta metabólica de la vitamina D, confiere protección frente a la infección por VIH-1 siguiendo un modelo dominante. Encontramos también que el diplotipo G++GL/- del gen *VDR*, relacionado con una menor funcionalidad de la ruta metabólica de la vitamina D, confiere protección frente a la progresión a sida siguiendo un modelo dominante. Por último, encontramos que el diplotipo G++AS/G++AS confiere riesgo de progresión a sida siguiendo un modelo recesivo.

Además, hemos caracterizado variantes polimórficas y estructura de haplotipos del gen *CCR5*. A partir de la caracterización de dichas variantes se evaluó su asociación con el ritmo de progresión a sida en pacientes VIH+. Encontramos que el diplotipo AB del gen *CCR5*, relacionado con una menor síntesis del receptor CCR5 confiere protección frente a la progresión a sida.

El análisis de las variantes de los genes *VDR* y *CCR5* nos permitió determinar que los pacientes que presentan el genotipo combinado G++AS/G++AS (gen *VDR*) y noAB (gen *CCR5*) presentan el ritmo más rápido de progresión a sida. Los pacientes portadores de dicho genotipo progresan a sida 7 años antes que los portadores del genotipo de protección G++GL/- (gen *VDR*) y AB (gen *CCR5*).

Una vez descritos los haplotipos del gen *VDR* que presentaban asociación se determinó su efecto fenotípico en la expresión del receptor CCR5 y su ligado natural RANTES y en el balance Th1/Th2 en pacientes VIH+ adictos a droga por vía intravenosa (ADVP) y controles sanos. No se detectaron variaciones en la síntesis del receptor CCR5 ni en su ligando natural RANTES en función del genotipo para *VDR* en los pacientes VIH+. Tampoco se detectaron variaciones en el balance Th1/Th2 en función del genotipo para *VDR* en pacientes VIH+ ADVP. Sin embargo, encontramos que la síntesis del receptor CCR5 varía en función del genotipo para *VDR* en los controles sanos, siendo menor en los portadores del diplotipo de protección GL/- del gen *VDR*.

Podemos concluir por tanto que en el contexto de la infección por VIH-1 y progresión a sida la acción de la vitamina D ejercería un papel negativo en el control de la infección viral.

La caracterización del haplotipo del *VDR* y *CCR5* de las variantes polimórficas analizadas podría servir como factor de predicción de la progresión del enfermo VIH+. La disponibilidad de vitamina D depende de factores ambientales como la dieta y la radiación solar disponible para la síntesis de la vitamina D. Para entender el impacto de la vitamina D en la infección por VIH-1 y progresión a sida hay que considerar una compleja ecuación que incluya factores ambientales, genéticos y sociales



A més del seu paper en la regulació del metabolisme mineral, la vitamina D a través del seu receptor intracel·lular (VDR), juga un paper significatiu en la modulació de la resposta immune. Variants del gen *VDR* han estat associades amb la vulnerabilitat a malalties infeccioses com la tuberculosi i la lepra i recentment amb la progressió clínica de malalts infectats per VIH-1, la qual cosa posa de manifest el paper que la variabilitat del gen *VDR* pot jugar en la resposta a agents patògens.

El gen *CCR5* codifica per a un receptor de citoquines actuant, juntament amb el CD4, com principal correceptor del virus de la immunodeficiència humana tipus 1 (VIH-1). Variants del gen *CCR5* que alteren el patró d'expressió del receptor han estat associades amb la susceptibilitat a la infecció per VIH-1 i progressió a sida.

En la present tesi doctoral s'ha caracteritzat l'estructura d'haplotips del gen *VDR*. A partir del patró de blocs observat s'han seleccionat cinc variants polimòrfiques localitzades en diferents regions del gen amb la finalitat d'avaluar la seva associació amb la vulnerabilitat a la infecció pel VIH-1 i el ritme de progressió a sida. Els resultats obtinguts indiquen que l'haplotip GATGL, associat amb una menor funcionalitat de la ruta metabòlica de la vitamina D, confereix protecció a la infecció per VIH-1 seguint un model genètic dominant. Trobem també que el l'haplotip G++GL, relacionat també amb una menor funcionalitat de la ruta metabòlica de la vitamina D, confereix progressió lenta a sida seguint un model dominant. Finalment, trobem que l'haplotip G++AS confereix un major risc de progressió a sida, seguint un model recessiu.

A més, hem caracteritzat variants polimòrfiques i l'estructura d'haplotips del gen *CCR5*. A partir de la caracterització d'aquestes variants es va avaluar la seva associació amb el ritme de progressió a sida en pacients VIH+. Hem trobat que el diplotip AB, relacionat amb una menor síntesi del receptor *CCR5*, confereix protecció enfront de la progressió a sida.

L'anàlisi conjunta dels gens *VDR* i *CCR5* ens ha permès determinar que els pacients que presenten el genotip combinat G++AS/G++AS (gen *VDR*) i noAB (gen *CCR5*) presenten el ritme més ràpid de progressió a sida. Els pacients portadors d'aquest genotip progressen a sida 7 anys abans que els portadors del genotip de protecció G++GL/- (gen *VDR*) i AB (gen *CCR5*).

Una vegada descrits els haplotips del gen *VDR* que presentaven associació. Es va avaluar l'efecte fenotípic dels haplotips del gen *VDR* associats amb infecció i progressió a sida amb els nivells d'expressió del receptor *CCR5* i el seu lligat natural RANTES, així com en el balanç Th1/Th2 de pacients VIH+ addictes a droga per via intravenosa (ADVP) i controls sans. No es van detectar diferències en la síntesi del receptor *CCR5* ni en el seu lligat natural RANTES en funció del genotip per a *VDR* en els pacients VIH+. Tampoc es van detectar diferències en el balanç Th1/Th2 en funció del genotip per a *VDR* en pacients VIH+ ADVP. No obstant això, varem trobar que els nivells de *CCR5* en membrana varien en funció del genotip per a *VDR* en els controls sans. Els portadors del diplotip de protecció GL/- presentaven uns nivells inferiors de *CCR5* en membrana que aquells que eren portadors del diplotip de risc AS/AS. Podem concloure doncs que en el context de la infecció per VIH-1 i progressió a sida l'acció de la vitamina D exerciria un paper negatiu en quant al control de la infecció viral.

La caracterització dels haplotips de *VDR* i *CCR5* podria ser d'utilitat com factor de predicció de la progressió del malalt VIH+. La disponibilitat de vitamina D depèn de factors ambientals com la dieta i de la radiació solar disponible per a la síntesi de vitamina D. Per a entendre l'impacte de la vitamina D en la infecció per VIH-1 i progressió a sida caldria considerar una complexa equació que inclogui factors ambientals, genètics i socials.



In addition to an important function in the regulation of the mineral metabolism, vitamin D plays a significant role in the modulation of the immune response through its intracellular receptor, VDR. Variants of the *VDR* gene have been associated with vulnerability to infectious diseases like tuberculosis or leprosy and recently with the clinical progression of patients infected by HIV-1. These facts clearly indicate the importance of *VDR* variability in the response against pathogenic agents.

CCR5 gene codifies for a cytokine receptor protein and is, together with the CD4, the main coreceptor of the virus of the human immunodeficiency type 1 (HIV-1-1). The study of variants in the *CCR5* gene that alter the expression pattern of the receptor has shown that this variation is associated with differences in the response against HIV-1 infection and progression to AIDS.

In the present thesis, the structure of haplotypes of the *VDR* gene has been characterized. From the block pattern observed, five polymorphic variants located in different regions from the *VDR* gene have been characterized with the purpose of evaluating its association with the vulnerability to infection by the HIV-1 and the rate of progression to AIDS. We have found that haplotype GATGL of the *VDR* gene, associated with a lower functionality of the metabolic pathway of vitamin D, confers protection from HIV-1 infection following a dominant model. We also found that diplotype G++GL/- of the *VDR* gene, which also implicates a lower functionality of the metabolic pathway of vitamin D, confers protection from progression to AIDS following a dominant model. Finally, we found that diplotype G++AS/G++AS increase the risk of progression to AIDS, following a recessive model.

In addition, we have characterized several polymorphic variants and the structure of haplotypes for the *CCR5* gene. Based in the characterization of these variants, we evaluated its association with the rate of progression to AIDS in patients HIV-1. We found that diplotype AB of *CCR5* gene, linked to a lower synthesis of receptor CCR5, confers protection from progression to AIDS.

The analysis of the variants of *VDR* and *CCR5* genes together allowed us to determine that the patients who present combined genotype G++AS/G++AS (*VDR* gene) and noAB (*CCR5* gene) presents the fastest rate from progression to AIDS. Patients carrying this genotype progress to AIDS 7 years earlier than carriers of protection genotype G++GL/- (*VDR* gene) and AB (*CCR5* gene).

Once defined the haplotypes of *VDR* gene that present association, we determined his phenotypic effect in the expression of receptor CCR5 and his natural ligand RANTES, as well as in the Th1/Th2 balance in intravenous-drugs-users (IVDU) HIV-1 patients and healthy controls. Variations in the synthesis of receptor CCR5 or in his natural ligand RANTES based on the genotype for *VDR* in patients HIV+ were not detected. Neither were detected variations in the Th1/Th2 based on the genotype for *VDR* in patients HIV-1 IVDU. Nevertheless, we found that the synthesis of receptor CCR5 varies depending on the genotype for *VDR* in the healthy controls, being lower in the carriers of the diplotype of protection GL/- of the *VDR* gene.

Therefore, we can conclude that in the context of the infection by HIV-1 and progression to AIDS, vitamin D would play a negative paper in the control of the viral infection.

The characterization of the *VDR* and *CCR5* haplotypes for the analyzed polymorphic variants could be a useful factor for predicting progression in HIV+ patient. In addition to the genetic background, different environmental factors as well as behavioral factors could also be considered since the vitamin D availability is dependent of diet and solar radiation D. A complex equation including environmental, genetic and behavioral factors should be proposed to comprehend the impact of vitamin-D3 on HIV-1-1 infection. Our results offer a new scenario to understand the relationship between HIV-1-1 infection and vitamin-D3 metabolism, including dietary supply and synthesis through sunlight exposure.



INDICE



INTRODUCCIÓN.....10

A.-ESTUDIO DE LOS CARACTERES COMPLEJOS..... 10

1.- ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA..... 11

2.- HAPLOTIPOS Y DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO..... 12

3.- INFERENCIA DE HAPLOTIPOS..... 15

4.- GENES CANDIDATOS Y SELECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL ESTUDIO DE LOS CARACTERES COMPLEJOS. 17

5.- APROXIMACIÓN ESTADÍSTICA AL ESTUDIO DE LOS CARACTERES COMPLEJOS..... 18

 5.1.-*Estudios de asociación basados en el modelo caso-control*..... 19

B.-VIRUS DE LA IMMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)..... 21

1.- ESTRUCTURA DEL VIH-1..... 21

2.- CICLO VITAL DE VIH-1..... 23

 2.1.-*Mecanismo de entrada: Adsorción, fusión e internalización del VIH-1*..... 23

 2.2.-*Sucesos post-entrada*..... 26

 2.2.1.- Síntesis del ADN viral..... 26

 2.2.2.- Integración del ADN viral..... 27

 2.2.3.- Síntesis de proteínas, ensamblaje y diseminación del virus..... 27

3.- HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y PROGRESIÓN A SIDA..... 28

 3.1.-*Mecanismos de transmisión del VIH-1*..... 28

 3.2.-*Fases de la infección por VIH-1 y progresión a sida*..... 29

 3.3.-*Clasificación clínica de la infección por VIH-1*..... 32

4.- CLASIFICACIÓN DE LOS INDIVIDUOS SEGÚN SU RESPUESTA FRENTE AL VIH..... 33

5.- RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VIH-1..... 35

6.- CAPACIDAD DEL HUÉSPED PARA INTERFERIR LA ENTRADA Y REPLICACIÓN DEL VIRUS VIH-1..... 40

7.- MECANISMOS DE ESCAPE DEL VIRUS VIH-1..... 42

8.- VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR VIH-1. VULNERABILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y PROGRESIÓN A SIDA..... 43

9.- RECEPTOR DE CITOQUINAS CCR5..... 46

 9.1.-*Función de CCR5*..... 47

 9.2.-*Estructura del gen CCR5*..... 47

 9.3.-*Variantes del gen CCR5*..... 48



C.- LA VITAMINA D Y EL GEN *VDR*..... 51

- 1.- BIOSÍNTESIS DE LA VITAMINA D. 51
- 2.- ACCIÓN GENÓMICA DE LA VITAMINA D. 53
 - 2.1.-*Estructura de la proteína VDR*. 54
 - 2.2.-*Genes diana y elementos de respuesta a vitamina D*. 55
 - 2.3.-*Estructura del gen VDR*. 58
- 3.- VARIANTES DEL GEN *VDR*. 59
 - 3.1.-*Polimorfismos de la región 5´UTR*. 59
 - 3.2.-*Polimorfismos de la región codificante*. 60
 - 3.3.-*Polimorfismos de la región 3´UTR*. 61
- 4.- PATRÓN DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO Y ESTRUCTURA DE BOQUES DE LA REGIÓN GENÓMICA DEL GEN *VDR*. 63
- 5.- ASOCIACIONES DESCRITAS ENTRE VARIANTES DEL GEN *VDR* Y PATOLOGÍAS HUMANAS. 64
- 6.- PAPEL DE LA VITAMINA D EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.- 67

OBJETIVOS..... 72

MATERIALES Y MÉTODOS..... 76

- 1.- TEST DE SEROPOSITIVIDAD EN SANGRE. 78
- 2.- EXTRACCIÓN DE ADN. 78
 - 2.1.-*Extracción de ADN a partir de sangre periférica*. 78
 - 2.2.-*Extracción de ADN a partir de saliva*. 78
- 3.- AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN Y DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS. 78
- 4.- IMNUNOFENOTIPADO. 88
- 5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS. 90
 - 5.1.-*Estadística descriptiva*. 90
 - 5.2.-*Tests no paramétricos*. 90
 - 5.2.1.- Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg. 90
 - 5.2.2.- Estudio caso control. Análisis de haplotipos y estudio de asociación. 91
 - 5.2.3.- Análisis de supervivencia. 92



RESULTADOS 94

ESTUDIO DEL PATRÓN DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO Y ESTRUCTURA DE BLOQUES DE LA REGIÓN GENÓMICA DEL GEN *VDR*. 96

- 1.- PATRÓN DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO DE LA REGIÓN GENÓMICA EL GEN *VDR* OBTENIDA A PARTIR DE LOS DATOS DEL PROYECTO HAPMAP. 97
- 2.- PATRÓN DE LD Y ESTRUCTURA DE BLOQUES DEL GEN *VDR* EN LA COHORTE DE CONTROLES SANOS DE ORIGEN CAUCÁSICO. 99
- 3.- PATRÓN DE LD Y ESTRUCTURA DE BLOQUES DEL GEN *VDR* EN LAS COHORTES ANALIZADAS, OBTENIDA A PARTIR DE LOS CINCO POLIMORFISMOS SELECCIONADOS. 102
- 4.- CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LOS POLIMORFISMOS SELECCIONADOS.- 104

VARIABILIDAD DEL GEN *VDR* Y VULNERABILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIH-1 105

- 1.- DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN LAS POBLACIONES ANALIZADAS. 108
- 2.- ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE CADA MARCADOR. 108
- 3.- ESTIMA DE LA FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS Y DISTRIBUCIÓN ENTRE COHORTES 110
- 4.- ESTIMACIÓN PONDERADA DEL EFECTO DE CADA ALELO EN LOS HAPLOTIPOS DE GEN *VDR* 113

ESTUDIO DEL RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA EN FUNCIÓN DE LA VARIABILIDAD DE LOS GENES *VDR* Y *CCR5* 115

- 1.- ESTUDIO DE LAS VARIANTES DEL GEN *VDR* Y SU ASOCIACIÓN CON EL RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA 117
 - 1.1- *Análisis de asociación de cada marcador.* 117
 - 1.2- *Análisis de la distribución de haplotipos del gen *VDR* en los pacientes agrupados según su estatus de progresión a sida CDC 93.* 119
 - 1.3- *Estudio supervivencia para los haplotipos del gen *VDR*.* 122
 - 1.4- *Análisis de supervivencia según los haplotipos de la región 3' UTR.* 122
 - 1.5- *Análisis de supervivencia según los haplotipos definidos por los marcadores *Cdx* (5' UTR) y *Bsm-I*, *polyA* (3' UTR).* 124
- 2.- ESTUDIO DE LAS VARIANTES DEL GEN *CCR5* Y SU ASOCIACIÓN CON EL RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA 126
 - 2.1- *Análisis de la distribución de alelos y genotipos del gen *CCR5* en los pacientes agrupados según su estatus de progresión a sida CDC 93.* 126
 - 2.2- *Estudio de supervivencia de los pacientes SERLAC según el diplo tipo del gen *CCR5*.* 129
- 3.- ESTUDIO DEL EFECTO COMBINADO DE LOS GENES *VDR* Y *CCR5* EN EL RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA 129
 - 3.1- *Estudio de supervivencia según el genotipo combinado para los genes *VDR* y *CCR5*.* 129



DETERMINACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL DE LA ASOCIACIÓN DESCRITA ENTRE VARIANTES DEL LOCUS *VDR* E INFECCIÓN POR VIH-1 Y PROGRESIÓN A SIDA. 132

1.- ANÁLISIS DEL BALANCE TH1-TH2 SEGÚN EL GENOTIPO PARA *VDR*..... 133

2.- CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DEL RECEPTOR CCR5 Y SU LIGANDO NATURAL RANTES SEGÚN EL GENOTIPO PARA *VDR*. 133

DISCUSIÓN..... 136

1. DESCRIPCIÓN DE LAS COHORTES INCLUIDAS EN LOS ESTUDIOS..... 138

 1.1- *Cohorte de pacientes VIH+*. 138

 1.2- *Cohorte de Expuestos no Infectados (ENI)*.-..... 142

 1.3- *Cohorte de controles sanos*.-..... 143

2.- VALORACIÓN GENERAL DE LOS ESTUDIOS CASO-CONTROL.-..... 144

3.- VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE BLOQUES DE LA REGIÓN GENÓMICA DEL *VDR*.- 146

4.- SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR EL VIH EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO DE *VDR*. 149

5.- VARIABILIDAD EN EL RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO DE *VDR*. 152

6.- VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS SOBRE SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN Y RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA 154

7.- VARIABILIDAD EN EL RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO DE *CCR5*. 159

8.- VARIABILIDAD EN EL RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO COMBINADO PARA LOS GENES *VDR* Y *CCR5*.- 164

9.- VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS EN LOS ESTUDIOS FUNCIONALES..... 166

CONCLUSIONES..... 168

BIBLIOGRAFÍA..... 172

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Algoritmo EM: Algoritmo de máxima expectación.

APC: Célula presentadora de antígenos.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

CCL: Ligando-c de citoquinas.

CCR: Receptor-c de citoquinas

CD: Clúster de diferenciación.

CXCL: Ligando-c de citoquinas.

CXCR: Receptor-c de citoquinas.

GPRC: Receptor de citoquinas acoplados a la proteína G.

IFN: Interferón.

IL: Interleuquina.

KD: Kilodalton.

LBD: Dominio de unión a ligando.

LD: Desequilibrio de ligamiento.

LTNP: Progresores lentos.

LTR: Repeticiones terminales largas.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MIP: Proteína inhibidora de macrófagos.

NSI: No inductora de sincitios.

PABP: Proteína de unión al polyA.

Pb: Par de base

RANTES: Regulación y activación de células T normales expresadas y secretadas.

RXR: Receptor de ácido retinoico.

SDF-1: Factor derivado del estroma 1.

SI: Inductora de sincitios.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.

TCR: Receptor de células T.

TNF: Factor de necrosis tumoral

UTR: Región no traducida.

VDR: Receptor de la vitamina D.

VDRE: Elemento de respuesta a vitamina D.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VNTR: Repeticiones en tandem de número variable.



INTRODUCCIÓN



A.- ESTUDIO DE LOS CARACTERES COMPLEJOS

La existencia de variabilidad genética es el principal hecho que sustenta la evolución. Dicha variabilidad es la que posibilita que dadas unas determinadas circunstancias ambientales, los individuos que mejor se adapten sean los que con más probabilidad dejen descendencia.

Existen multitud de caracteres que están determinados tanto por factores genéticos como por factores ambientales. Este tipo de caracteres, con un doble componente genético y ambiental reciben el nombre de caracteres complejos, en contraposición de aquellos caracteres determinados por un efecto directo del genotipo, los caracteres monogénicos o mendelianos. Un objetivo importante del estudio de los caracteres complejos consiste en determinar que parte de la variabilidad en el carácter es debida al componente genético, y que parte es debida al componente ambiental.

Las enfermedades complejas son aquellas que para su desarrollo es necesaria la interacción de múltiples genes y factores ambientales. En las enfermedades monogénicas como la fibrosis quística, la mutación de un gen causa la manifestación de la enfermedad. Sin embargo, en las enfermedades complejas no existe una relación directa entre genotipo y fenotipo, por ello, el estudio de la base genética de las enfermedades complejas presenta dificultades importantes. El primer grado de dificultad está en el elevado número de genes que, en principio, están implicados en la manifestación de dicha enfermedad, y en segundo lugar la compleja interrelación que se establece entre estos genes y el ambiente.

Existen dos estrategias en el estudio de la base genética de las enfermedades complejas que permiten establecer la relación genotipo-fenotipo: el rastreo genómico y la propuesta de genes candidatos. La primera consiste en evaluar en un solo ensayo la relación existente entre la variabilidad del genoma (centenares o miles de polimorfismos) y el fenotipo estudiado. Esta estrategia no asume ninguna hipótesis previa salvo el hecho de considerar que aquellas variaciones que presenten una distribución "anómala" pueden estar relacionadas con el fenotipo



estudiado. La segunda estrategia se fundamenta en la asunción de un modelo previo basado en los conocimientos existentes sobre la fisiopatología de la enfermedad. A partir de dicho modelo se proponen genes “candidatos” entre aquellos que están directa o indirectamente relacionados con la patología. El siguiente paso consistirá en el estudio y caracterización de dichos genes, variantes a nivel de secuencia y arquitectura genómica que nos permitirán determinar su posible implicación en la enfermedad estudiada.

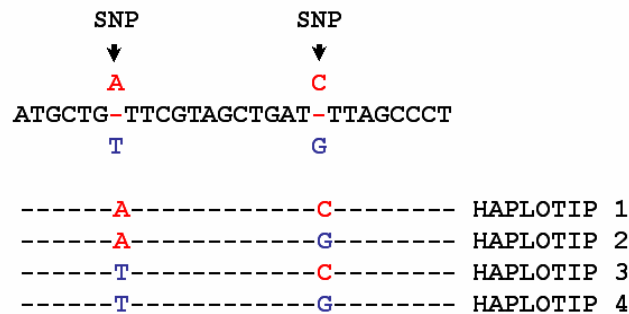
1.- Estudio de la variabilidad genética.

Una de las contribuciones más importantes de la secuenciación del genoma humano ha sido la caracterización e identificación de cientos de miles de *loci* polimórficos distribuidos a lo largo de los 3250 millones de nucleótidos que constituyen nuestro genoma.

Un polimorfismo es una variante genética que aparece al menos en el 1% de los cromosomas de una población. Estas variantes pueden estar localizadas en regiones codificantes o reguladoras de un gen o bien localizarse en regiones intergénicas. Las variantes localizadas en un gen pueden inducir cambios en la proteína o en el patrón de expresión del gen. Así, variaciones en la región 5´ no traducida (UTR, del inglés *untranslated region*) pueden alterar los niveles de expresión, mientras que cambios en la región 3´UTR pueden afectar al transporte, estabilidad y vida media del ARNm. Cuando las variaciones se localizan en un exón pueden generar una alteración en la secuencia del codón de forma que este siga codificando el mismo aminoácido, cambio sinónimo, o bien que el codón pase a codificar un aminoácido diferente, cambio no sinónimo, que puede alterar la secuencia de la proteína y como consecuencia, en mayor o menor grado, su función biológica. Además, los polimorfismos pueden generar la aparición de un codón de parada de traducción y por tanto dar lugar a la síntesis de proteínas truncadas.



A-G, T-C o T-G (Figura 2). Cada una de estas posibles combinaciones es lo que conocemos como haplotipo.



$$\begin{aligned}
 f(\text{hap1}) &= f(A) * f(C); & D_1 &= f(\text{hap1}) - [f(A) * f(C)] \\
 f(\text{hap2}) &= f(A) * f(G); & D_2 &= f(\text{hap2}) - [f(A) * f(G)] \\
 f(\text{hap3}) &= f(T) * f(C); & D_3 &= f(\text{hap3}) - [f(T) * f(C)] \\
 f(\text{hap4}) &= f(T) * f(G); & D_4 &= f(\text{hap4}) - [f(T) * f(G)]
 \end{aligned}$$

Figura 2. Desequilibrio de ligamiento entre dos SNPs contiguos. Si la diferencia (D) entre la frecuencia de un haplotipo y el producto de la frecuencia de los alelos que lo componen es diferente de cero (D_1 a D_4), diremos que dichos alelos están en *desequilibrio de ligamiento*.

Si un SNP se transmite de forma independiente de otro, la frecuencia de cada uno de los haplotipos (1) será igual al producto de las frecuencias de los alelos que forman dicho haplotipo (2). En el caso de que esta igualdad no se cumpla, la diferencia será un valor distinto a cero. Dicho valor se conoce como el desequilibrio de ligamiento (D) (3) que existe entre los diferentes alelos de estos dos SNPs. El valor de D oscila entre $\pm 0,25$ dependiendo de la frecuencia de los alelos de los *loci* considerados. El valor de D será 0 cuando los alelos se transmiten independientemente y $0 < |D| \leq 0,25$ cuando están ligados y tienden a transmitirse juntos. Lewontin (Lewontin 1964) sugirió la normalización del valor D (D') dividiendo dicho valor por el máximo valor posible según sean las frecuencias alélicas de los *loci* considerados (4).

El valor normalizado de D (D') es utilizado comúnmente como una medida del grado de desequilibrio de ligamiento entre dos *loci*.



- (1) $f(hap_{ab})$; para dos loci dialélicos A (A, a) y B (B, b)
- (2) $f(hap_{ab}) = f(a) \times f(b)$
- (3) $f(hap_{ab}) = f(a) \times f(b) \pm D$
 $D = f(hap_{ab}) - f(a) \times f(b)$
- (4) $D' = \frac{D}{D_{\max}}$ $\left\| \begin{array}{l} \text{para } D > 0; D_{\max} = \min(f(A)f(b), f(a)f(B)) \\ \text{para } D < 0; D_{\max} = \min(-f(A)f(B), -f(a)f(b)) \end{array} \right.$

Uno de los factores determinantes en el establecimiento del desequilibrio de ligamiento entre dos marcadores está determinado por la frecuencia con la que estos recombinan.

Dicha frecuencia de recombinación dependerá de la distancia que separa a estos dos marcadores y del tiempo que dichos marcadores han tenido para poder recombinar.

Así cuanto más separados se encuentren dos polimorfismos más alta será la frecuencia de recombinación entre ellos, y por tanto, menor será el valor del desequilibrio de ligamiento que podremos observar entre los mismos. Igualmente cuanto mayor sea el tiempo de aparición de dos polimorfismos más alta será la frecuencia de recombinación entre ambos y menor el valor del desequilibrio de ligamiento. Si embargo, hay algunos casos en los que estas premisas no se cumplen. Los análisis realizados con los datos de HapMap (<http://www.hapmap.org/>) indican que la frecuencia de recombinación no se distribuye de forma aleatoria a lo largo del genoma. Existen regiones en las que se observa un gran número de eventos de recombinación y regiones en las cuales la frecuencia de recombinación es muy baja. Las primeras se corresponden con segmentos de ADN de 1 a 2 kb conocidas como *hotspots* de recombinación en las cuales se han descrito secuencias específicas a nivel de ADN, que favorecen la recombinación. Dichos *hotspots* están separados por regiones comparativamente más extensas que presentan una baja actividad recombinatoria. Los marcadores situados en dichas regiones presentan un alto desequilibrio de ligamiento y definen bloques de secuencia cromosómica con un tamaño medio de 50 kilobases que se heredan de forma conjunta (Jeffreys, Kauppi et al. 2001). Puesto que la recombinación se produce en los límites de cada bloque, la frecuencia de



recombinación y por tanto la diversidad de haplotipos dentro de un bloque es muy baja.

Para estudiar la transmisión de un bloque de una generación a la siguiente no es necesario caracterizar todas las variantes polimórficas presentes en dicho bloque, sino que sólo con la caracterización de unas pocas de ellas será posible capturar toda la variabilidad de dicho bloque. Las variantes que son utilizadas como marcadoras de un bloque reciben el nombre de *tagSNPs*.

3.- Inferencia de haplotipos.

Existen métodos directos para la estima de haplotipos basados en estrategias analíticas que son de difícil aplicación cuando se analiza un número elevado de muestras. Solo el análisis del material genético de espermatozoides o de marcadores localizados en el cromosoma X, en hombres, permiten la detección directa de haplotipos. Sin embargo, mediante este tipo de técnicas solo es posible estudiar los haplotipos generados a partir de la meiosis masculina y, puesto que la frecuencia de recombinación varía entre hombres y mujeres, el resultado no es representativo de toda la población.

Actualmente se han desarrollado diversos métodos de análisis estadístico-probabilístico que permiten inferir y estimar la frecuencia de haplotipos a partir de los genotipos. Solo este tipo de métodos indirectos permiten abordar el estudio de haplotipos a partir de un gran número de muestras.

Consideremos dos polimorfismos (SNP 1 y SNP 2) analizados en dos individuos. El individuo 1 presenta el genotipo G/G para el SNP 1 y el genotipo A/G para el SNP 2. En este caso podemos inferir de forma directa los haplotipos G-A y G-G para dicho individuo. El individuo 2 presenta el genotipo G/A para el SNP 1 y el genotipo A/G para el SNP 2. En este caso la inferencia de haplotipos no es inmediata dado que dicho individuo puede ser portador de cualquiera de las dos combinaciones de haplotipos posibles; G-G/A-A o G-A/A-G. En este caso la determinación de haplotipos debe realizarse mediante distintos métodos de



inferencia estadística. La mayoría de ellos asumen la premisa de equilibrio Hardy-Weinberg por la que cada uno de los haplotipos que porta una persona constituye una muestra independiente de la población total de haplotipos.

Los métodos de inferencia estadística tratan de sacar conclusiones acerca de la población de interés basadas esencialmente en la información que proporciona una muestra de la misma, determinando la frecuencia de los haplotipos posibles en base a los que pueden calcularse de forma directa en la muestra analizada. Uno de estos métodos, desarrollado por Clark (Clark 1990), propone un algoritmo mediante el cual se determinan en primer lugar los haplotipos en los que no existía ambigüedad y a continuación se utilizan las frecuencias de dichos haplotipos para inferir de forma secuencial la constitución haplotípica de los individuos en los que sí que existe ambigüedad. Otro de los métodos utilizados se fundamenta en la aplicación del algoritmo de *Expectación-Maximización* (EM) para la obtención de las estimas de la frecuencia de haplotipos de máxima probabilidad en una determinada muestra de individuos. Dicho algoritmo realiza un primer paso de estimación, en el cual utiliza una serie de estimas de la frecuencia de haplotipos para el cálculo de la distribución condicional para los pares de haplotipos que cada individuo porta. En el siguiente paso, llamado paso de maximización, basándose en las distribuciones condicionales obtenidas, se actualizan de forma secuencial las estimas de la frecuencia de los haplotipos. El algoritmo EM realiza una iteración entre estos dos pasos repetidamente, hasta que las frecuencias de los haplotipos convergen. De esta forma se obtiene una estima de la frecuencia de los haplotipos presentes en la población analizada.

Otro método ampliamente utilizado en la inferencia de haplotipos es el implementado en el software informático PHASE. Dicho programa, desarrollado por Stephens (Stephens, Smith et al. 2001; Stephens and Scheet 2005), implementa un método Bayesiano para la reconstrucción de los haplotipos a partir de los genotipos analizados en una población. PHASE incorpora previamente la información obtenida mediante el genotipado de los marcadores analizados. Mediante esta información, que utiliza el programa como guía, se infieren los haplotipos no observados en la muestra. Mediante este método también es posible



determinar la asignación de pares de haplotipos (diplotipos) para cada individuo de la población con su probabilidad correspondiente.

4.- Genes candidatos y selección de polimorfismos en el estudio de los caracteres complejos.

En el estudio de la base genética de las enfermedades complejas el primer paso consiste en proponer los genes candidatos que serán objeto del análisis. Una vez seleccionados dichos genes candidatos debemos escoger las variantes polimórficas que serán caracterizadas, no sólo atendiendo a su posible efecto sobre el fenotipo, sino en función de que actúen o no como marcadores. Por ello, en el diseño de un estudio de asociación se seleccionarán los SNPs que sean marcadores de bloque, y entre los SNPs que no estén en un bloque, seleccionaremos aquellos que previsiblemente alteren la estructura de la proteína y aquellos que se localicen en regiones reguladoras de un gen.

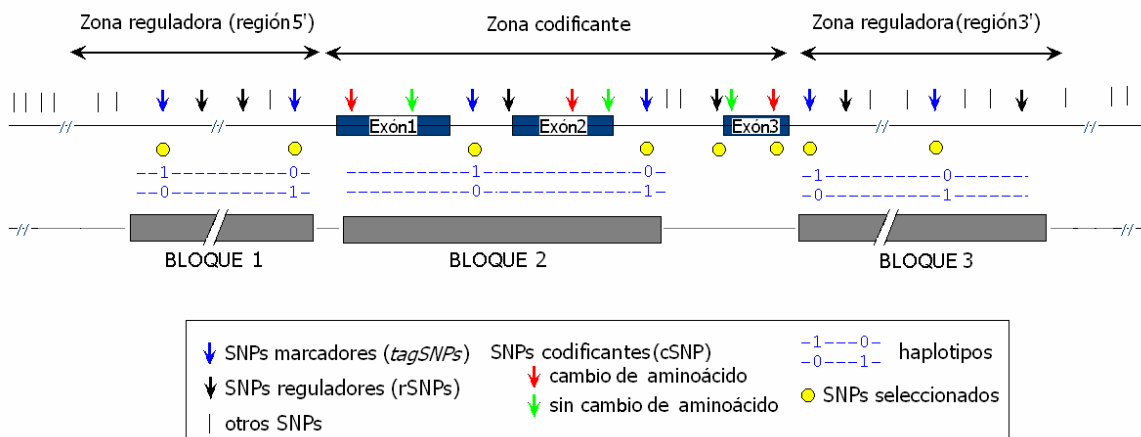


Figura 3. Esquema de propuesta de SNPs candidatos. Véase texto.

En la Figura 3 se observa la representación de una región genómica donde se localiza un determinado gen sobre la que deseamos evaluar su posible implicación en la manifestación de un determinado carácter complejo. Se ha descrito que en dicha región existen tres bloques de desequilibrio de ligamiento. En el bloque 2 se encuentran dos de los exones del gen mientras que en los bloques 1 y 3 se



encuentran las regiones reguladoras del mismo. De los 33 SNPs identificados en la región (líneas verticales y flechas en la Figura 3) seleccionaremos en primer lugar los *tagSNPs* de cada bloque (flechas en azul en la Figura 3). Además de estos, de las regiones no incluidas en bloques, seleccionaremos los SNPs con posibles efectos funcionales (flechas en rojo en la Figura 3). Mediante estos criterios de selección del total de 33 SNPs que se observan en la Figura 3, solo obteniendo el genotipo de 8 de ellos (indicados con un círculo amarillo en la Figura 3) será posible capturar la mayor parte de la variabilidad de la región analizada.

Imaginemos que después de un primer análisis con estos polimorfismos encontramos que los *tagSNPs* que se localizan en el bloque 2 dan asociación con el fenotipo. Ello nos permite descartar a todos los polimorfismos situados en las regiones definidas por los bloques 1 y 3 así como los polimorfismos localizados en el exón 3. Al mismo tiempo la asociación detectada con los *tagSNPs* del bloque 2 indica que variantes localizadas en el exón 1 o en el exón 2 pueden ser las responsables de la asociación. El siguiente paso consistirá en seleccionar los SNPs funcionales del bloque 2 y determinar si alguno de ellos es el SNP causativo. De esta forma será posible identificar al SNP responsable de la asociación observada.

5.- Aproximación estadística al estudio de los caracteres complejos.

La aplicación del análisis de los polimorfismos en el estudio y caracterización de los caracteres complejos se fundamenta en los llamados estudios de asociación. Dichos estudios se basan en la comparación de dos muestras de una población que sólo difieren en la característica estudiada. El objetivo consiste en detectar aquellas diferencias entre las muestras que se “asocian” con la manifestación o no de dicha característica.

En dicha estrategia metodológica se parte de un modelo genético que considera que los individuos que manifiestan un determinado carácter son portadores de variantes de genes que están relacionadas con la manifestación fenotípica observada. Según esta hipótesis la frecuencia de las variantes relacionadas con el carácter será mayor en un grupo de individuos que lo manifiestan. Siguiendo esta



premisa si un alelo de un polimorfismo es más frecuente en el grupo de individuos que manifiesta el carácter que en el grupo que no lo manifiesta, podemos considerar que dicho alelo está asociado al carácter y que puede ser responsable, directa o indirectamente de su manifestación. Los resultados obtenidos deben ser analizados de forma crítica y ser cautos en su interpretación, ya que hay que tener la certeza de que no son fruto del azar o consecuencia de una mala selección de los individuos incorporados en el estudio.

Cuando en el desarrollo de un estudio de asociación se identifica un polimorfismo asociado a un determinado fenotipo se pueden considerar dos hipótesis: 1) el cambio en la secuencia genética que implica dicho polimorfismo afecta de algún modo la función de un gen relacionado con el carácter, o bien, 2) el polimorfismo asociado se transmite juntamente con otro, desconocido en nuestro estudio, que es realmente el responsable de la asociación observada. Tenemos, por tanto, dos posibilidades; o bien nuestro polimorfismo es causativo, o bien actúa como marcador de otro polimorfismo responsable de la manifestación que estamos observando.

Si el estudio se ha planteado correctamente y se han obtenido los resultados de asociación el siguiente paso consistirá en extrapolar el estudio realizado a otras poblaciones. Asimismo, los resultados de asociación se deben fundamentar con estudios funcionales que relacionen el polimorfismo con alguna función biológica que esté implicada en el carácter estudiado.

5.1.- Estudios de asociación basados en el modelo caso-control.

Los estudios caso-control son uno de los diseños de estudio epidemiológico más utilizado en los estudios de asociación. Se aplican con el fin de determinar los factores que pueden estar contribuyendo en la aparición de una determinada manifestación fenotípica mediante la comparación de un grupo de individuos que manifiestan dicho fenotipo (grupo de casos) y un grupo de individuos que no lo manifiesta (grupo de controles).

En un contexto medico-clínico un estudio de caso-control utiliza un grupo de pacientes que presentan una enfermedad u otra alteración y determina si existen



características en estos pacientes que difieran de un grupo control de personas sanas que no presentan la enfermedad o alteración. Mediante este tipo de estudio es posible determinar de forma rápida los factores de riesgo que influyen sobre la patología que se está estudiando.

Una consideración de gran importancia en el planteamiento de un estudio de caso-control consiste en llevar a cabo una correcta selección de los individuos que van a ser comparados, teniendo como máxima conseguir que el grupo de casos esté constituido por individuos que sólo se diferencien de los incluidos en el grupo de controles por el hecho de manifestar el carácter que está siendo objeto de análisis.

En el estudio caso-control no es posible calcular riesgos absolutos, ni tasas de incidencia, pues desconocemos cuántos individuos forman la población de expuestos y no expuestos de las que proceden los casos incluidos en el estudio. Por tanto, la razón de riesgos o la razón de tasas ("riesgo relativo") no puede ser medida directamente.

Si que es posible calcular el *odds* (veces) de exposición en los casos, esto es, la proporción de casos expuestos dividido por la proporción de casos no expuestos $[(a/a+c)/(c/a+c) = a/c]$ (Tabla 1). De igual modo podemos calcular los *odds* en controles $[(b/b+d)/(d/b+d)=b/d]$. Finalmente podemos obtener la *odds ratio* (razón de veces) dividiendo $(a/c)/(b/d)=axd/bxc$.

Tabla 1. Cálculo de la *odds ratio* en los estudios caso-control

Casos-Controles		Casos (manifiestan X)	Controles (no manifiestan X)
Expuestos al Factor (e)		a	b
No expuestos al Factor (ne)		c	d
Odds Ratio_{exposición}	$\frac{\text{Odds}_{\text{exposición Casos}}}{\text{Odds}_{\text{exposición Controles}}} = \frac{\frac{a/(a+c)}{c/(a+c)}}{\frac{b/(b+d)}{d/(b+d)}} = (OR) = \frac{\frac{a}{c}}{\frac{b}{d}} = \frac{a \times d}{b \times c}$		

Si la hipótesis es correcta, y existe por tanto una relación casual, será más probable encontrar casos con el antecedente de exposición que controles expuestos: entonces la *odds-ratio*, en este caso de exposición, será mayor de 1.



B.- VIRUS DE LA IMMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1).

1.- Estructura del VIH-1.

El virus VIH-1 es una partícula esférica de 80 a 100 nm que presenta una estructura en tres capas: capa interna o nucleoide, cápsida icosaédrica y envoltura exógena derivada de la célula huésped. El material genético del virus se localiza en el interior de la cápside viral y codifica la información para la síntesis de las proteínas virales y presenta, tanto en su forma extracelular como en su forma intracelular, una longitud aproximada de 9,6 kb (Figura 4).

En su fase extracelular el VIH-1 presenta dos cadenas de ARN con polaridad positiva e igual secuencia mientras que en su fase intracelular presenta una cadena doble de ADN que se encuentra integrada en el genoma de la célula huésped. Esta doble cadena de ADN se encuentra flanqueada por repeticiones terminales largas (LTR; *Long Terminal Repeats*), necesarias para la integración y que contienen secuencias específicas implicadas en iniciación y terminación de la transcripción, la retrotranscripción, y la unión a factores de transcripción.

Los genes del VIH-1 se clasifican en genes estructurales y enzimáticos, genes reguladores y genes auxiliares. Los genes estructurales y enzimáticos son los genes *pol*, *gag* y *env*. El gen *pol* codifica para los precursores de las enzimas virales *proteasa (Prot)*, *retrotranscriptasa (RT)*, RNAsa H (*RH*) e *integrasa (INT)*. El gen *gag* codifica los precursores de las proteínas de la cápside del virus (p17, p24, p7-11) y el gen *env* codifica para la proteína gp160 que por proteólisis, genera las glicoproteínas de la envuelta viral gp120 y gp41.

Los principales genes reguladores son el gen *transactivador transcripcional (tat)* y el gen *regulador de la expresión viral (rev)*. Ambos genes contienen la información para la síntesis de los polipéptidos necesarios para la replicación del virus.



Por último, los genes auxiliares *vpr*, *vif*, *vpu* y *nef*, condicionan *in vivo* el grado de patogenicidad del VIH-1.

Los productos que se procesan a partir de la expresión de los genes *gag*, *env* y *pol* se encuentran presentes en la estructura de la partícula infectiva, mientras que los productos derivados de la expresión de los genes auxiliares *vpr*, *vif*, *vpu* y *nef* son sintetizados durante la infección aprovechando la maquinaria de la célula huésped.

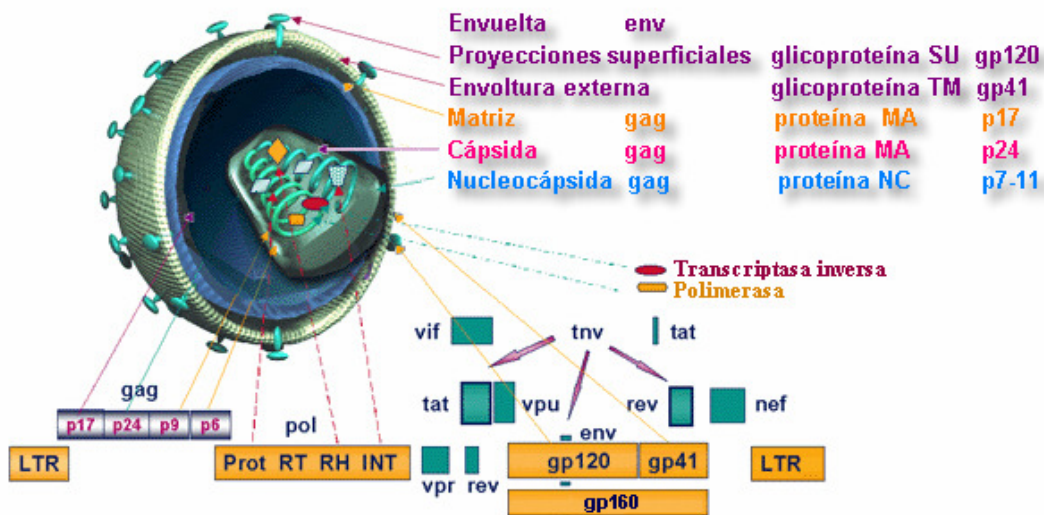


Figura.4. - Configuración estructural del VIH-1.

La replicación del VIH-1 comienza mediante la transcripción del genoma viral. De esta forma se inicia la transcripción de los genes reguladores, los estructurales, los enzimáticos y los accesorios.

A partir del ARN viral se sintetizan las cadenas polipeptídicas que serán fragmentadas por la proteasa para dar lugar a las proteínas funcionales del virus.

La nucleocápsida viral contiene dos hebras de ARN del virus, además de las proteínas estructurales que tienen la función de empaquetar el ARN viral (proteínas de la matriz, p17 y p24). Asimismo, la nucleocápsida contiene las enzimas virales *transcriptasa inversa* (RT), *ARNsasa H*, *proteasa* (PR) e *integrasa* (INT), derivadas del precursor polipeptídico del gen *pol*.



Sobre la cubierta vírica que proviene de la célula huésped, se localizan aproximadamente 72 complejos nucleoprotéicos. Los complejos nucleoprotéicos son trímeros compuestos de una subunidad de superficie conectada a una subunidad transmembrana. Estas subunidades son gp120 y gp41 respectivamente. Su presencia es fundamental para el proceso de reconocimiento y anclaje del VIH-1 en los receptores específicos de la célula del huésped que va a infectar.

2.- Ciclo vital de VIH-1.

La Figura 5 muestra un esquema general del ciclo vital del VIH-1, del que a continuación se detallan las etapas más significativas.

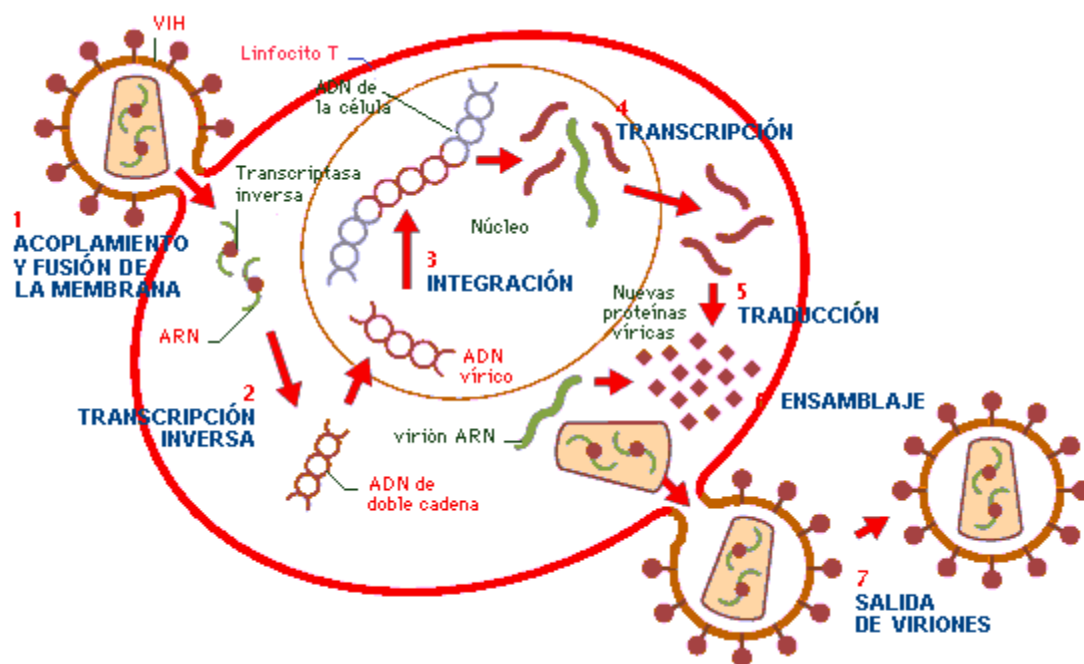


Figura 5. Ciclo vital de VIH-1.

2.1.- Mecanismo de entrada: Adsorción, fusión e internalización del VIH-1.

El virus del VIH-1 presenta en su superficie una serie de glicoproteínas que facilitan la fusión de las membranas viral y celular permitiendo la introducción del genoma del virus en la célula huésped.



La glicoproteína glicosilada gp160, codificada por el gen *env* del VIH-1, genera por proteólisis dos glicoproteínas; gp120 y gp41. Ambas forman oligómeros que se presentan en la superficie de la partícula viral en los que la glicoproteína transmembrana gp41 se encuentra asociada de forma no covalente con la glicoproteína gp120.

La célula huésped debe presentar en su membrana dos proteínas cuya presencia es indispensable para que la unión del virus VIH-1 a la célula huésped se complete con éxito, el receptor CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4 (Figura 6).

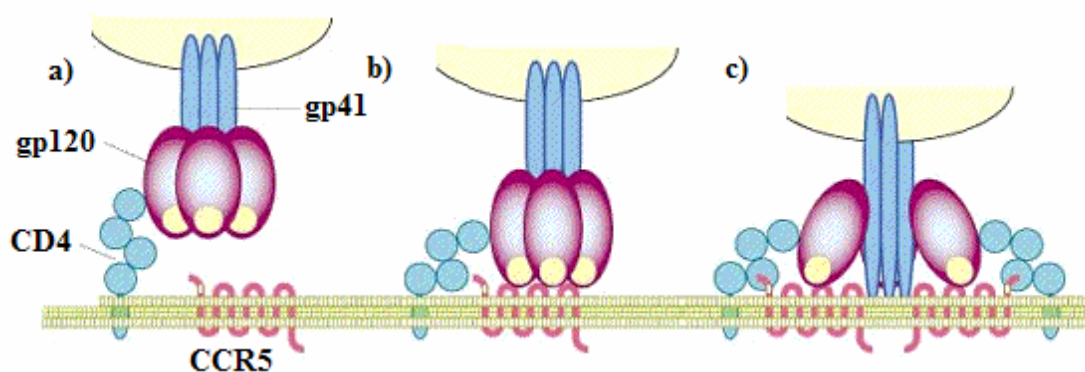


Figura 6. Unión del virus a la célula huésped. El cambio conformacional de gp120 inducido por la unión de éste a CD4 (a) posibilita la unión de gp120 al correceptor CCR5 (b). Esta unión, induce la activación de la proteína transmembrana viral gp41 y su unión a la célula huésped (c). La proteína gp41 se repliega permitiendo la fusión de membranas y por tanto la entrada del virus en la célula que infecta

El receptor CD4 es una inmunoglobulina de 55 kDa presente en linfocitos T4, macrófagos, monocitos, células de la microglía y células dendríticas, cuya principal función es participar en el proceso de activación de las células T CD4⁺.

La unión de la glicoproteína viral gp120 al receptor CD4 de la célula huésped induce un cambio conformacional de gp120 que posibilita la unión del complejo CD4-gp120 a una segunda proteína transmembrana que actúa como correceptor del virus y que permite la entrada de la cápside viral en el interior de la célula huésped (Figura 6).

En 1996 fue descrita la molécula CXCR4 (receptor-C de citoquinas 4, conocida en un primer momento como "*fusind*") como correceptor del VIH-1 (Rowe 1996). Se trata de una proteína con siete dominios transmembrana que pertenece a la superfamilia de receptores de quimiocinas. CXCR4 interviene en los procesos de hematopoyesis, linfopoyesis de células B (Arai, Yasukawa et al. 2000) y



mielopoyesis. Además es el responsable de la formación del *septum* ventricular cardíaco, de la vascularización del tracto gastrointestinal (Tachibana, Hirota et al. 1998) y de la formación de células granudas del cerebelo.

El ligando natural de CXCR4 es CXCL12 (SDF-1, factor derivado del estroma 1), el cual presenta seis variantes que se generan por *splicing* alternativo del gen *SDF-1*. Las distintas isoformas de *SDF-1* (α , β , γ , δ , ϵ , Φ) comparten los tres primeros exones y difieren en el cuarto exón (Yu, Cecil et al. 2006).

Posteriormente fue descubierto otro correceptor del VIH-1 (Deng, Liu et al. 1996), el receptor de quimiocinas CCR5 (receptor-C de citoquinas 5), perteneciente a la misma superfamilia de receptores de citoquinas, cuya función natural es mediar la activación celular en procesos inflamatorios actuando como receptor de las quimiocinas MIP-1 α (*macrophage inhibitory protein*) (CCL3), MIP-1 β (CCL4) (de macrófagos) y RANTES (*regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*) (CCL5).

La unión del virus a uno u otro de los correceptores en la célula huésped define el tropismo de las cepas del VIH-1. Se denominan cepas X4 aquellas que utilizan el correceptor CXCR4 y cepas R5 aquellos que utilizan el CCR5. Finalmente se han descrito cepas X4R5 que pueden utilizar ambos correceptores (cepas con tropismo dual) (Figura 7).

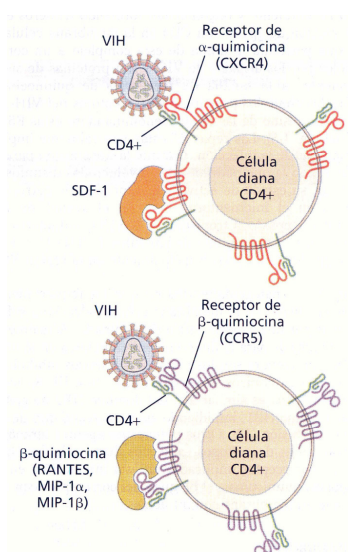


Figura 7. Tropismo de las cepas de VIH-1.

- (A) Cepa X4 de VIH-1. Son cepas con tropismo por las células de la línea T. En cultivo presentan una alta capacidad para infectar linfocitos T maduros y una baja capacidad para infectar macrófagos
- (B) Cepa R5 de VIH-1. Son cepas con tropismo por macrófagos. En cultivo presentan una alta capacidad para infectar macrófagos y una baja capacidad para infectar linfocitos T maduros.



Cualquier cepa del virus VIH-1 es capaz de infectar y replicarse en linfocitos T primarios activados. Sin embargo, determinadas cepas del virus que presentan una alta capacidad de infectar células T maduras $CD4^+$ y una baja efectividad en la infección de macrófagos primarios. Estos virus reciben el nombre de *TCL-tropic* (tropismo por las células de la línea T) y presentan una mayor afinidad por el correceptor CXCR4 de la célula que va a infectar. Otras cepas del virus muestran un tropismo opuesto a las anteriores presentando una capacidad infectiva mucho mayor sobre macrófagos primarios que sobre células T maduras $CD4^+$. Estos virus reciben la denominación *M-tropic* (tropismo por macrófagos). Finalmente existen cepas de VIH-1 que se replican eficientemente en ambos tipos celulares. Dichas cepas reciben el nombre de cepas *dual-tropic*, y pueden utilizar como correceptor tanto el CXCR4 como el CCR5 de la célula huésped (Berger, Murphy 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 por VIH-1, son principalmente del tipo *M-tropic*. Estas cepas virales son las que están generalmente implicadas en la transmisión del virus. Sin embargo, en estadíos finales de la infección, cuando el paciente ha desarrollado sida, las cepas que pueden aislarse de la mayoría de estos individuos pertenecen al tipo de cepa *TCL-tropic*. Se ha observado *in vitro* que este tipo de cepas son las que presentan mayor efecto citopático. Esto explicaría el declive, en esta etapa final de la infección, en el número de células $CD4^+$, causa principal de la aparición de sida.

2.2.- Sucesos post-entrada.

2.2.1.- Síntesis del ADN viral.

Tras la entrada del virus da comienzo la replicación viral. Esta replicación está mediada por la enzima vírica *retrotranscriptasa*. La *retrotranscriptasa* es un heterodímero compuesto de dos subunidades, p66 y p51, de 66 kDaa y 51 kDaa respectivamente. La porción C-terminal de la subunidad p66 (de unos 120



aminoácidos) comprende el dominio *RNasa H* y la porción N-terminal (de unos 440 aminoácidos) constituye el dominio *polimerasa*.

Mediante un proceso de retrotranscripción y utilizando como cebador un ARNt se genera un duplex heterodimérico ARN/ADN. La fracción de ARN es digerida por la porción C-terminal de la subunidad p66 de la *retrotranscriptasa*. A continuación se sintetiza la cadena de ADN complementaria de la anterior generándose la doble cadena que se integrará en el genoma de la célula huésped.

2.2.2.- Integración del ADN viral.

El complejo de integración formado por la doble cadena de ADN viral, proteínas de la cápsida viral y proteínas de la célula se transloca al núcleo de la célula infectada.

Una vez en el núcleo los dos extremos de la doble cadena de ADN viral se localizan en regiones preferentes del genoma de la célula, concretamente cerca de los elementos L1 y Alu (Stevens and Griffith 1994).

La *integrasa* realiza un corte en la región del ADN celular, donde se integrará el ADN viral, del que son eliminados dos nucleótidos. A continuación se produce otro corte en el ADN del virus generando extremos cohesivos que posibilitarán la integración de la doble cadena de ADN viral en el cromosoma de la célula huésped. La *ligasa* celular completará la unión rellenando los huecos generados y finalizará la etapa de integración del ADN viral.

El paso de integración del ADN viral es posible que no ocurra a continuación de la retrotranscripción quedando este almacenado en el citoplasma en una latencia de preintegración. Distintos estímulos serán los responsables del posterior transporte al núcleo del complejo de preintegración para su posterior integración en los cromosomas de la célula huésped.

2.2.3.- Síntesis de proteínas, ensamblaje y diseminación del virus.

Tras las etapas de entrada e integración del provirus se produce un proceso de latencia. El provirus latente inicia su transcripción aprovechando factores de



transcripción del huésped como NFκβ, Sp1 y TFIID, iniciándose los procesos de expresión genética temprana y tardía.

Mientras que en la expresión temprana se transcriben los genes reguladores *tat*, *rev* y *nef*, en la expresión tardía son los genes estructurales y enzimáticos codificados por *gag*, *pol* y *env*, y genes accesorios como *vif*, *vpr* y *vpu*, los que son transcritos.

Es necesaria la presencia de *rev* para que se expresen los genes tardíos. *Rev* codifica una proteína que facilita el transporte de los ARN mensajeros de los genes tardíos del núcleo al citoplasma, donde serán traducidos por los ribosomas celulares y procesados por la *proteasa* dando lugar a la formación de las proteínas virales.

El ensamblaje de la partícula viral se lleva a cabo en la célula huésped. Las proteínas Gag y Pol junto al ARN viral forman el nucleoide que se desplaza a la membrana de la célula. Allí se recubre de la membrana lipídica y de las glicoproteínas de superficie que están adheridas a esta.

Una vez que la partícula viral inmadura se ha desprendido de la célula, la *proteasa* procesa a los precursores de la nucleocápsida y las enzimas virales. La nueva partícula viral alcanza así su estado de madurez.

3.-Historia natural de la infección por VIH-1 y progresión a sida.

3.1.- Mecanismos de transmisión del VIH-1.

Los mecanismos principales de transmisión del virus VIH-1 son de tipo sexual sanguínea y vertical.

En la transmisión sexual la sangre, el semen o el fluido vaginal de una persona VIH-1 positiva entra en el torrente sanguíneo de una persona VIH-1 negativa, durante una relación sexual sin protección (vía anal, vaginal u oral). En la vía de transmisión sanguínea el virus de una persona VIH-1 positiva entra al torrente sanguíneo de una persona VIH-1 negativa a través de desgarros de la piel o mucosas, durante un accidente laboral, una transfusión o derivados, trasplantes



de órganos (riesgo muy disminuido actualmente) o al compartir objetos punzantes, tatuajes, *piercings*, o jeringas en los consumidores de droga por vía parenteral.

Por último en el mecanismo de transmisión vertical el virus de una madre VIH-1 positiva se transmite al bebé durante el embarazo, el parto o la lactancia. La tasa de transmisión materno-infantil ha llegado a suponer el 14 y 35% de las nuevas infecciones. No obstante, a partir del año 1994 el tratamiento con fármacos antiretrovirales como la Zidovudina (AZT) se han utilizado como profilaxis de transmisión vertical, siendo la tasa actual de transmisión vertical en los países desarrollados inferior al 1%.

3.2.- Fases de la infección por VIH-1 y progresión a sida.

Una vez el virus del VIH-1 ha entrado en el organismo, se inicia un proceso de infección en el que pueden observarse diferentes estadios evolutivos o fases, relativamente bien diferenciadas, aunque no siempre pueden ser identificadas a nivel clínico. La duración de estas fases es variable, y dicha variabilidad responde a factores debidos al virus y a factores propios del huésped.

Las tres fases que pueden distinguirse en la historia natural de la infección por VIH-1 son: fase aguda, fase crónica y fase final o sida (Figura 8).

La primera de estas fases, la fase aguda, se da entre las 2 y 4 semanas después de la entrada del virus en el individuo infectado. El paciente presenta un cuadro clínico común para el 50% de los infectados y es característico de la primoinfección por VIH-1. Este cuadro clínico, de intensidad variable, cursa con cefalea, fiebre, mialgias, adenopatías y *rash* (cambio en la piel que puede afectar a su color, apariencia o textura), y está relacionado con la respuesta inmune producida contra el virus. Este cuadro clínico forma parte del diagnóstico diferencial para aquellas personas que presentan fiebre de origen desconocido además de erupción macropapular y adenopatías. Sin embargo el diagnóstico diferencial difícilmente puede ser comprobado de forma positiva puesto que en esta primera etapa no es posible la detección de anticuerpos específicos contra el



VIH-1. Transcurrida la primera semana de infección la carga viral que se detecta en plasma oscila entre 10^5 y 10^7 copias/ μL (Piatak, Saag et al. 1993).

Durante la fase aguda cerca del 60% de los linfocitos T CD4^+ de sangre periférica se infectan produciéndose un descenso brusco en su número (Mattapallil, Douek et al. 2005).

Después de las primeras 19 semanas, de media, se desencadena la respuesta inmunitaria específica. Los valores de carga viral en plasma se ven reducidos drásticamente hasta alcanzar un equilibrio entre los 6 y 12 meses, situándose los valores en torno a 10^2 y 10^6 copias/ μL de plasma. Esta drástica reducción de la carga viral es el resultado de la acción linfocitaria a través de la respuesta T citotóxica (Koup, Safrit et al. 1994). Este último acontecimiento marca el inicio de la siguiente fase de la historia natural de la infección por VIH-1.

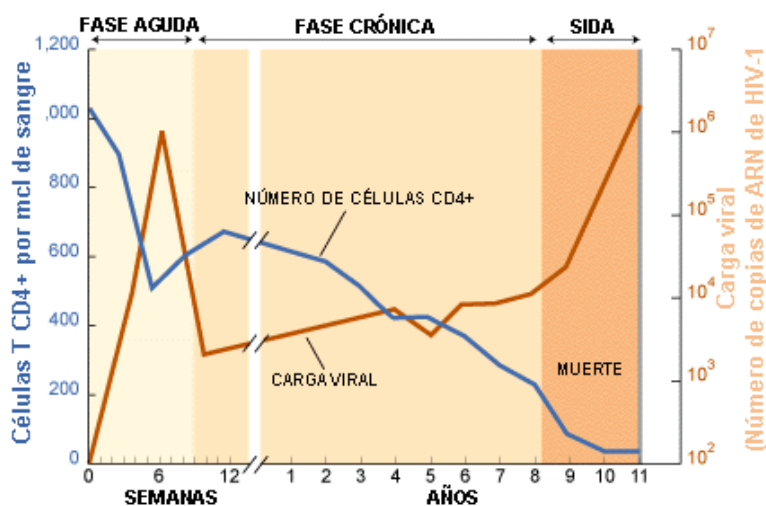


Figura 8. Historia natural de la infección por VIH-1. En las primeras semanas tras la infección tiene lugar la fase aguda en la que la carga viral aumenta a la vez que se produce un descenso en el número de células CD4^+ . Al cabo de estas primeras semanas la carga viral disminuye y se produce un incremento de las células CD4^+ . Durante la fase crónica los niveles de carga viral y células CD4^+ se mantienen estables hasta que se alcanza la última etapa de la historia natural de la infección, fase final o sida en la que dicha estabilidad se pierde cayendo los niveles de CD4^+ a la vez que la carga viral se dispara lo que finalmente conlleva la muerte del paciente.

Durante la fase crónica los pacientes suelen permanecer asintomáticos. Si bien esta fase también se conoce como fase de latencia, realmente no existe como tal un periodo de latencia del virus, ya que este continúa replicándose en los órganos linfoides (Pantaleo, Graziosi et al. 1993) donde la carga viral es 10 a 10^5 veces superior que en plasma (Tamalet, Lafeuillade et al. 1997). Entre el 0,1 y el 1% de los linfocitos expresan ARN del VIH-1 en algún momento a lo largo de la fase crónica lo que indica, efectivamente, la existencia de una replicación activa.



Distintos análisis mediante técnicas de inmunohistoquímica sugieren que la unión de VIH-1 a sus anticuerpos provoca que el virus quede retenido en el tejido linfático a través de la células dendríticas del folículo (Pantaleo, Graziosi et al. 1993).

Durante estos últimos años se han publicado numerosos trabajos que discuten la variabilidad existente en la duración de la fase crónica de la historia natural del VIH-1.

Se conocen causas de tipo externo como aquellas relacionadas con la virulencia de la cepa responsable de la infección, siendo las cepas X4 las que presenta mayores efectos citopáticos (Harouse, Gettie et al. 1999) y por tanto induciendo una aceleración en la progresión de la enfermedad (Meissner, Duus et al. 2004). Además la coinfección con el virus de la hepatitis C esta relacionada con un riesgo elevado de progresión a sida. Asimismo, la infección por *Micobacterium tuberculosis* aumenta la patogenicidad del virus y acelera el ritmo de progresión. (Ranjbar, Ly et al. 2004) Finalmente, altos niveles de VIH-1 en plasma durante la fase inicial se han relacionado con una progresión más rápida a sida (Mellors, Rinaldo et al. 1996) siendo la carga viral en plasma en el inicio de la infección un claro indicador predictivo de la evolución clínica del paciente.

Cuando el VIH-1 alcanza niveles altos en plasma y el número de células CD4⁺ disminuye considerablemente, nos encontramos en la última fase de la historia natural de la infección, fase final o sida. Dicha fase se caracteriza por un aumento en la tasa de replicación viral acompañado por un descenso en el número de células CD4⁺ con recuentos inferiores a 200 células/ μ L de sangre. Además la actividad de los linfocitos T citotóxicos disminuye drásticamente.

Cuando la respuesta inmunológica del paciente se encuentra seriamente comprometida, tiene lugar otra característica fundamental de la fase final o sida que es la aparición de enfermedades oportunistas como la candidiasis, tuberculosis, toxoplasmosis y neumonía, entre otras, que aprovechan el estado inmunodeprimido del paciente.



3.3.- Clasificación clínica de la infección por VIH-1.

La clasificación actualmente vigente de la infección por VIH-1 y que entró en vigor en enero de 1993 (Tabla 2), clasifica a los pacientes en base a dos criterios fundamentales. Por un lado, tiene en consideración el número de linfocitos CD4⁺ y por otro la presencia de distintas enfermedades y situaciones clínicas diagnósticas de sida, que aparecen en un paciente que presente un test de seropositividad para VIH-1 y que no pueden ser explicadas por otras causas de inmunodeficiencia.

Tabla 2. Clasificación de los pacientes VIH+ según criterios clínicos e inmunológicos

Categorías según la cifra de linfocitos CD4 ⁺ (T4)	Categorías clínicas		
	A	B	C (sida)
1. > 500/mm ³	A1	B1	C1
2. 200-499/mm ³	A2	B2	C2
3. <200/mm ³ (sida)	A3	B3	C3

Atendiendo a criterios clínicos se consideran tres categorías; A, B y C. La categoría A se aplica a la infección primaria y a pacientes asintomáticos aunque presenten un cuadro linfadenopático persistente. Se consideran en la categoría B aquellos pacientes que presentan, entre otras, angiomas bacilar, candidiasis vulvovaginal persistente, fiebre (>38,5°C) o diarrea de más de un mes de duración y *muguet* (candidiasis oral). Finalmente, la categoría C engloba la manifestación de enfermedades definitorias de sida de tipo oportunista como la candidiasis traqueal, bronquial o pulmonar, candidiasis esofágica, sarcoma de *Kaposi*, tuberculosis pulmonar, neumonía por *Pneumocystis carinii*, toxoplasmosis, entre otras.

Asimismo, se establece una clasificación en función de la cifra de linfocitos CD4⁺ en tres categorías; 1, 2 y 3. Los pacientes incluidos en las categorías 1 y 2 presentan niveles de células CD4⁺ por encima de 500 CD4/ μ l o entre 200 y 500 CD4/ μ l, respectivamente. Finalmente, los pacientes con niveles por debajo de 200 CD4/ μ l de sangre se incluyen en la categoría 3.



Tendiendo en cuenta ambos criterios de clasificación se considera que todos los pacientes incluidos en la categoría C (C1 a C3) y los pacientes incluidos en la categoría 3, (A3, B3 y C3) han desarrollado sida.

4.- Clasificación de los individuos según su respuesta frente al VIH.

La respuesta a la exposición a un agente infeccioso varía extraordinariamente entre los individuos. Uno de los aspectos más llamativos en el estudio de la infección por VIH-1 es la existencia de individuos que a pesar de haber sido expuestos en repetidas ocasiones al VIH-1 no presentan evidencia clínica ni serológica de la infección. Este grupo de sujetos denominados *expuestos no infectados* (EU, del inglés *exposed uninfected*) constituyen un grupo de gran interés para definir y comprender los mecanismos inmunitarios de protección frente al VIH-1 *in vivo* (Clerici, Levin et al. 1994). Estos individuos representan un grupo heterogéneo formado por parejas serodiscordantes (un miembro de la pareja es seropositivo y el otro seronegativo), personas seronegativas que han recibido transfusión de sangre contaminada y usuarios de droga por vía parenteral que son seronegativos a pesar de haber intercambiado jeringas durante largos periodos de tiempo. En la justificación de su condición de seronegativos se combinan factores genéticos, inmunológicos y virológicos.

Asimismo, la progresión clínica de un paciente infectado por VIH-1 es variable entre individuos, siendo el ritmo de progresión a sida uno de los parámetros que presenta mayor heterogeneidad interindividual. Así, es posible clasificar a los pacientes seropositivos en progresores rápidos, progresores intermedios y progresores lentos o no progresores (Figura 9).

Los denominados progresores rápidos son aquellos pacientes que progresan a sida en los primeros 5 años después de la infección por VIH-1 (Anzala, Nagelkerke et al. 1995). Dicho grupo de pacientes se caracteriza por presentar una alta 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.

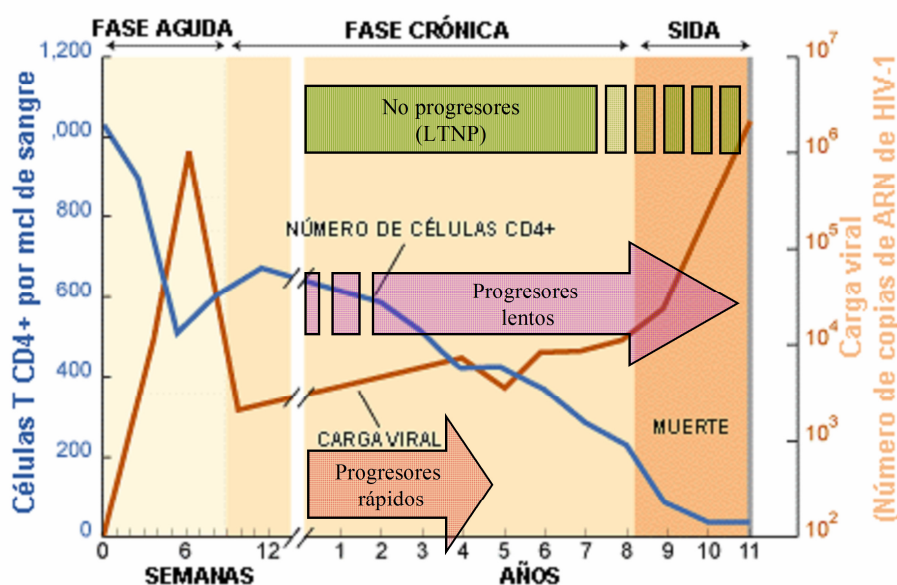


Figura 9.- Clasificación de los individuos VIH-1+ según el ritmo de progresión de la enfermedad.

Los progresores intermedios, entre los que se encuentra el 80-90% de los infectados por el virus, progresan a sida en un periodo de tiempo aproximado de 5-10 años. 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 primoinfección, que disminuye de forma progresiva en el transcurso de la infección.

Los progresores lentos son aquellas personas que desarrollan sida tras 12 ó 15 años de infección. Entre estos cabe destacar al grupo de pacientes que después de 15 años o más de seguimiento no presentan síntomas de la enfermedad. Dicho grupo se conoce con 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).



5.- Respuesta inmune frente al VIH-1.

Las primeras células que se encuentra el VIH-1 en la transmisión por vía sexual son las células dendríticas y células de Langèrhans presentes en las submucosas, y los linfocitos circundantes que forman parte del sistema linfoide asociado a mucosas. En este ambiente se producen fenómenos de presentación antigénica por parte de las células dendríticas y células de Langèrhans dando lugar a un contexto especialmente apto para la infección de los linfocitos activados. Una vez se produce esta primera infección la diseminación viral es inmediata. Probablemente la migración de células presentadoras y linfocitos, primero a ganglios regionales y posteriormente a órganos linfoides, sea el mecanismo por el cual el virus se disemina en 48-72 horas.

La infección por VIH-1 desencadena una respuesta inmune específica de tipo humoral y celular. Tanto la respuesta humoral como celular pueden ser de dos tipos; específica e inespecífica.

En la respuesta inmune humoral específica juega un papel destacado la producción de anticuerpos. El VIH-1 induce una intensa respuesta de anticuerpos frente a prácticamente todas las proteínas reguladoras y estructurales del VIH-1. Se ha descrito síntesis de anticuerpos frente a la envoltura, proteínas de la matriz, proteínas de la nucleocápsida viral y proteínas reguladoras del virus.

Algunos de los anticuerpos generados, especialmente los dirigidos frente a gp41 y frente a los dominios variable 3 (V3) y de interacción con CD4 de la proteína gp120, tienen un carácter neutralizante *in vitro*, y en experimentos de inmunoterapia *in vivo*, por lo que se postula la acción protectora de dichos anticuerpos. Sin embargo, *in vivo* la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante es muy baja. Ello podría explicarse por el hecho de que, desde el punto de vista estructural, el dominio de neutralización se encuentra oculto en la conformación nativa de la gp120 y sólo tras el desplegamiento de la misma se expone el dominio V3 y regiones adyacentes que, tras interaccionar con CD4 y los correceptores de quimiocinas, quedan de nuevo ocultos e inaccesibles al sistema inmune.



En la respuesta humoral inespecífica intervienen factores solubles que son activos frente a la infección por VIH-1. El VIH-1, al igual que otros virus, es sensible a la inhibición por complemento. También se ha demostrado que los interferones tienen actividad antiviral frente a VIH-1. Todos estos mecanismos de inmunidad humoral inespecífica representan, en cierta manera, una barrera frente a la infección por VIH-1, pero sin embargo no son suficientes para controlar la replicación del virus.

Tabla 3.- Principales tipos de citoquinas y función primordial.

Tipo de citoquina	Función primordial
Factores de crecimiento	Promueven el crecimiento y la división de distintos tipos de células
Linfocinas	Participan en la inmunomodulación de la respuesta inmune
Factores estimuladores de colonias	Regulación de la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas
Factores transformadores del crecimiento	Promueven la proliferación de ciertos tipos celulares en cultivo
Interferones (α , β , γ)	Presentan un amplio abanico de actividades tales como actuar en procesos de diferenciación celular, proliferación celular y modulación de la respuesta inmune.

La respuesta inmune de tipo celular es llevada a cabo por acción de los linfocitos T, tanto colaboradores (Th) como citotóxicos (Tc). De los acontecimientos que tienen lugar en la respuesta celular específica cabe destacar la importancia de la respuesta citotóxica para el control de la infección por VIH-1. En experimentos *in vitro* se ha observado que en pacientes seropositivos existe una expansión clonal de los linfocitos T CD8 citotóxicos (McMichael and Rowland-Jones 2001). Los linfocitos T CD8 destruyen las células infectadas por VIH-1 que presentan péptidos en su superficie. Los linfocitos T reconocen los antígenos mediante una estructura especializada conocida como receptor de linfocitos T (TCR). Dichos antígenos son degradados y procesados en el interior de las células presentadoras de antígenos



que posteriormente presentan los determinantes antigénicos procesados en el seno de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Se ha observado que la respuesta citotóxica es capaz de controlar una pequeña proporción de variantes virales en las primeras etapas de la enfermedad y que posteriormente se adapta para poder responder a los cambios generados por la variabilidad viral en sus epítomos inmunodominantes.

Por otra parte se ha demostrado una respuesta por parte de los linfocitos Th CD4+ específica que es esencial para la puesta en marcha de una respuesta inmune eficaz contra el VIH-1 (Ghanekar, Stranford et al. 2001).

Para que los linfocitos se activen se requiere además del reconocimiento del antígeno de los receptores T, la participación de otras moléculas como son las moléculas accesorias y las citoquinas. Las citoquinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa) que actúan mediando interacciones complejas entre células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Pueden ser de diversos tipos y presentan funciones muy variadas (Tabla 4).

Tabla 4. Patrón de secreción de citoquinas de las poblaciones de células Th1 y células Th2

Citoquina	Subpoblación	
	Th1	Th2
IFN-gamma	++	-
TNF-alpha	++	-
GM-CSF	++	+
IL-1	-	+
IL-2	+	-
IL-3	++	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-6	-	+
IL-10	-	++
IL-12	+	-
IL-13	-	++



Las citoquinas ejercen su acción mediante la unión a receptores específicos de la membrana de las células, iniciando una cascada de transducción de señal que altera el patrón de expresión génica. De este modo las células diana producen una determinada respuesta biológica. Los receptores de quimiocinas son muy diversos desde el punto de vista estructural, pero todos pertenecen a alguna de las cinco familias de proteínas receptoras. Estas son: receptores de superfamilia de inmunoglobulinas, receptores de citoquina clase I (hematopoyetina), receptores de citoquina clase II (interferón), receptores de TNF y receptores de quimiocina.

La respuesta por parte del sistema inmunitario frente a un patógeno particular induce un grupo adecuado de funciones efectoras con el objeto de eliminar al agente patógeno o los productos tóxicos del huésped. Los patrones de secreción de citoquinas define el tipo de respuesta organizada y varían en función del agente infeccioso, permitiendo una reacción específica frente a la gran diversidad de patógenos existentes.

Un gran número de datos ponen de manifiesto la existencia de distintos patrones de secreción de citoquinas en subgrupos de células Th CD4⁺ que determinan el tipo de reacción inmunitaria frente a un reto antigénico concreto.

Es posible distinguir dos subpoblaciones de células Th, denominadas Th1 y Th2 que se diferencian en el patrón de citoquinas que secretan (tabla 4).

Dichas subpoblaciones de células Th presentan marcadas diferencias a nivel funcional. El subgrupo Th1 está implicado en la respuesta mediada por células, como por ejemplo la activación de células T cooperadores y la producción de anticuerpos IgG que promueven la opsonización, es decir, anticuerpos que se unen a receptores Fc de alta afinidad de fagocitos. La respuesta mediada por linfocitos Th1 se relaciona con la defensa frente al ataque de patógenos intracelulares como bacterias y virus. La reacción del sistema inmune mediada por el subgrupo de células Th1 presenta una agresividad más alta que la que es llevada a cabo por el subgrupo Th2. La hiperactivación de la respuesta Th1 puede dar lugar a la manifestación de enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo I, la esclerosis múltiple o la artritis (Singh, Mehrotra et al. 1999)

El subgrupo de linfocitos Th2 median la activación y diferenciación de eosinófilos, proporcionando ayuda a los linfocitos B y favoreciendo la producción de IgM y IgE.



La hiperactivación de una respuesta Th2 es la responsable de reacciones alérgicas adversas.

El patrón de citoquinas secretadas por las células Th1 y Th2 determina las distintas funciones biológicas de estos dos subgrupos de células. La homeostasis entre la actividad Th1 y Th2 es determinante en la respuesta inmune del paciente y la regulación del balance Th1/Th2 es un factor crítico en la lucha contra el ataque de agentes patógenos.

El ambiente de citoquinas en el que se desarrollen las células Th condicionará la polarización de estas células hacia uno de los dos subgrupos. Trabajos recientes aportan información acerca de la base molecular de la regulación cruzada mediada por citoquinas mediante la cual un subgrupo promueve la expansión o desarrollo propios al tiempo que inhibe el desarrollo del subgrupo opuesto.

La respuesta inmune frente al VIH-1 es llevada a cabo principalmente mediante una respuesta de tipo Th1. Sin embargo, uno de los mayores defectos en la respuesta inmune de los individuos HIV+ reside en la pobre respuesta Th1 que presentan. Este hecho es debido al descenso a lo largo del curso natural de la infección, del número de células Th que secretan IFN- γ , principal citoquina responsable de la polarización de células Th1 (Norris and Rosenberg 2001). La IL-2 producida por los linfocitos Th1 actúa en el proceso de activación de la respuesta citotóxica. Como ya se ha comentado anteriormente, la respuesta citotóxica llevada a cabo por los linfocitos T CD8+ juega un papel crítico en el control de la infección por VIH-1. Las células Th2 secretan IL-4, citoquina que ha sido relacionada con una inhibición en la expresión del correceptor viral CCR5. Este hecho sugiere que en un entorno Th2 sería beneficioso en el control de la infección por VIH-1 (Kidd 2003). Todo ello pone de manifiesto que el mantenimiento de una respuesta intensa de tipo Th1 junto a una respuesta moderada Th2 es importante para el control a largo plazo de la infección por VIH-1. En último término, el control eficaz de la infección depende de la correcta modulación del balance Th1/Th2 (Galli, Annunziato et al. 2001) y la regulación de dicho balance depende de múltiples factores genéticos del huésped.



En cuanto a los mecanismos de inmunidad celular no específica, no restringida por el sistema HLA, se han descrito fenómenos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, así como una actividad citotóxica natural, llevada a cabo por las células NK, frente al VIH-1 en pacientes seropositivos. Tanto en la respuesta celular específica como en la no restringida por el sistema HLA, la actividad antiviral es más intensa en los estadios asintomáticos de la infección.

6.- Capacidad del huésped para interferir la entrada y replicación del virus VIH-1.

Se han descrito distintos mecanismos mediante los cuales el huésped puede interferir la entrada del virus en las células diana. Por un lado, los linfocitos CD8+ activados de pacientes seropositivos inhiben *in vitro* la replicación del VIH-1 mediante la producción de factores solubles presentes en el sobrenadante de cultivo, que han sido identificados como las quimiocinas RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β y SDF-1, ligandos naturales de los receptores CCR5 y CXCR4, que actúan como correceptores de distintas cepas del VIH-1. Dichas moléculas son capaces de inhibir la infección por VIH-1 debido a un fenómeno de competición en la unión con el receptor CCR5 o CXCR4 (De Clercq and Schols 2001). En concordancia con estos datos *in vitro*, se ha descrito que individuos expuestos de forma reiterada al VIH-1 y que se mantienen libres de infección (expuestos no infectados) presentan niveles elevados de RANTES.

En el proceso de infección por vía sexual el virus es captado por las células dendríticas presentes en las mucosas y presentado a los linfocitos T circundantes. Se ha demostrado que las células dendríticas producen la quimiocina SDF-1 ligando natural de CXCR4 que induce la endocitosis de CXCR4 en las células presentadoras y en los linfocitos asociados. Ello podría explicar la baja transmisibilidad de las cepas virales X4 y la selección de cepas con tropismo R5 en los estadios iniciales de la infección, poniendo de manifiesto el papel determinante del correceptor CCR5 en la primoinfección.



Se ha demostrado en experimentos *in vitro* que la producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos de la envoltura viral, especialmente contra la proteína gp41, puede ejercer un efecto de bloqueo de la entrada del virus. Sin embargo, *in vivo* dicho efecto no se ha observado, debido bien a la baja producción de anticuerpos neutralizantes o bien al hecho de que dichos anticuerpos no tienen la capacidad de acceder a los epítomos neutralizantes localizados en la cubierta viral.

Recientemente se ha descrito un nuevo inhibidor *in vitro* de la entrada del virus VIH-1 en la célula denominado VIRIP (*Virus-Inhibitory Peptide*). Se trata de un péptido que corresponde a los residuos comprendidos entre 353-372 de la región C-proximal del inhibidor de serin proteasa más abundante en el organismo, la 1 α -antitripsina. Este péptido bloquea la entrada del virus en la célula por unión al péptido de fusión gp41 del VIH-1 (Munch, Standker et al. 2007). Aún se desconocen los posibles efectos protectores de VIRIP *in vivo*.

Finalmente, trabajos recientes han identificado un mecanismo de respuesta inmune innata capaz de controlar la replicación viral en el que están implicadas proteínas celulares de la familia APOBEC. Los enzimas celulares APOBEC1 y APOBEC3 realizan cambios no conservativos en el ADN mediante la deaminación de deoxicitidinas (dC) dando lugar a residuos de deoxiuridina (dU) (Petersen-Mahrt and Neuberger 2003).

A diferencia de APOBEC1 que actúa sobre ADN propio, APOBEC3 actúa sobre ADN exógeno alterándolo e impidiendo su replicación conservativa. De esta forma APOBEC3 funciona como una proteína celular con actividad antiviral efectiva también contra el VIH-1.

Se ha demostrado que los niveles moderados de APOBEC3G disminuyen en tres veces la capacidad infectiva del VIH-1. Dichos resultados sugieren que alteraciones que afecten a la actividad y al nivel de expresión de *APOBEC3G* puedan influir en la replicación viral y en el ritmo de progresión de la enfermedad (Mariani, Chen et al. 2003).



7.- Mecanismos de escape del virus VIH-1.

El virus VIH-1 ha desarrollado distintas estrategias con el objetivo de escapar del control del sistema inmunológico del huésped. Probablemente el mecanismo más eficiente que tiene el virus para escapar de la respuesta inmune es el que se deriva de la alta tasa de error de la enzima *transcriptasa* inversa (10^{-3} - 10^{-4}) durante la retrotranscripción del genoma viral. La acumulación de mutaciones y cambios en la secuencia del genoma viral tiene una doble consecuencia, por una parte da lugar a una alta proporción de virus defectivos, mientras que por otra genera una alta diversidad en la secuencia de aminoácidos de las proteínas del virus. Ello permite que el virus pueda escapar de forma muy eficiente del control mediado por la respuesta inmune específica.

Otra característica que le permite al virus escapar al control inmune es el enmascaramiento de los epítomos de neutralización. Dichos epítomos solamente son expuestos cuando se produce la unión de la proteína gp120 a CD4, quedando enmascarados por propia unión al receptor CD4. Por ello, tal y como se ha comentado anteriormente, la eficacia de los anticuerpos neutralizantes contra las proteínas de unión del VIH-1 es muy reducida.

En otro sentido es importante destacar que el virus VIH-1, como todo lentivirus, cuando infecta a las células diana integra su material genético en el genoma del huésped, pudiendo establecer un estado de infección latente en determinadas poblaciones de células infectadas (Henrard, Daar et al. 1995; Daar, Little et al. 2001). Una célula infectada por un virus latente, escapa de todo control inmunológico al no expresar proteínas virales en la membrana. La reactivación del VIH-1 a partir de su estado de latencia se produce de forma rápida y masiva, por lo que la generación de viriones se produce antes de que la célula pueda ser destruida por el sistema inmune.

Los procesos de reactivación-reinfección tienen lugar en los centros germinales de los órganos linfáticos. Dichas zonas son de difícil acceso para los anticuerpos y constituyen un nicho altamente favorable para la propagación del VIH-1. En ellas se localizan las células dendríticas recubiertas por viriones que al interactuar con los linfocitos activados circundantes facilitan la infección y propagación del virus.



8.- Variabilidad en la respuesta a la infección por VIH-1. Vulnerabilidad a la infección por VIH-1 y progresión a sida.

La complejidad de los mecanismos relacionados con la respuesta del huésped frente a un agente infeccioso es el producto de la acción de un gran número de genes implicados en la misma. Por ello, el fondo genético del huésped desempeña un papel significativo a lo largo de la historia natural de una infección.

Existe una extensa literatura que pone de manifiesto que no todos los individuos expuestos a un agente infeccioso desarrollan la enfermedad, y cuando lo hacen, no todos responden de una misma forma a la infección. Entre las diversas razones que explicarían este hecho se encuentran las diferencias en la constitución genética que existe entre cada individuo.

Se ha descrito variabilidad en la respuesta frente a la infección por VIH-1 que ha sido relacionada con la capacidad del huésped para restringir la entrada del virus en la célula, generar una respuesta inmune adecuada o impedir la replicación viral.

La capacidad de restringir la entrada del virus se ha relacionado con variantes del gen *CCR5* (Samson, Libert et al. 1996) y de los genes que codifican para sus ligandos naturales que alteran tanto la concentración de *CCR5* en membrana como la disponibilidad de *CCR5* libre. Dichas variantes se han asociado con la vulnerabilidad a la infección por el VIH-1 y el ritmo de progresión a sida (Michael, Louie et al. 1997; Stewart, Ashton et al. 1997; Visco-Comandini, Hultgren et al. 1998).

Los estudios realizados revelan que linfocitos $CD4^+$ aislados de distintos individuos muestran una gran variación en su capacidad de producir RANTES. Se han descrito dos polimorfismos (*-28C/G* y *-403A/G*) localizados en la región promotora 5'UTR del gen *RANTES* que están asociados con distintos niveles de expresión del ligando. Se ha encontrado asociación entre el alelo *-28G* y una disminución menos acusada del número de linfocitos T $CD4^+$ en individuos HIV+. Estudios funcionales revelan un incremento en la actividad del promotor que contiene la variante *-28G*, lo que sugiere que este polimorfismo induce un



incremento en la síntesis de RANTES. Dicho aumento en la expresión de RANTES dificultaría el proceso de infección por VIH-1 y disminuiría el ritmo de progresión de la enfermedad (Liu, Chao et al. 1999). En referencia al polimorfismo *-403A/G* un estudio preliminar ha encontrado asociación con susceptibilidad a la infección por VIH-1 (Liu, Wang et al. 2003).

La capacidad del huésped para generar una respuesta inmune adecuada constituye otro de los factores de variabilidad en la respuesta a la infección.

En el curso de la infección de un paciente, la aparición de variantes del virus confiere a este una gran capacidad para escapar a la respuesta inmunitaria. En este contexto el sistema HLA desempeña un papel importante. Las moléculas HLA se unen a péptidos derivados de agentes patógenos para presentarlos en la superficie celular y facilitar su reconocimiento por las células T. En el caso de la presentación de un péptido viral, la célula presentadora es lisada con el fin de controlar la infección. Existe una fuerte presión selectiva a favor de las variantes virales que presentan mutaciones en sus genes estructurales ya que estas le permiten escapar a la presentación mediada por moléculas HLA. Cada molécula de HLA puede unirse a uno o más péptidos procedentes de la degradación de las proteínas de un agente infeccioso. Una de las principales características inherentes al sistema HLA reside en su gran variabilidad cuya finalidad es sortear las estrategias evasivas de los agentes patógenos. Dicha variabilidad se localiza en la región de la molécula que es sitio de anclaje de los péptidos que va a presentar.

La variabilidad del sistema HLA viene determinada por el efecto de la heterocigosidad para los distintos alelos de los genes de HLA de manera que una alta heterocigosidad confiere al individuo la posibilidad de presentación de un amplio espectro de antígenos y por ende una gran ventaja en la capacidad de reconocimiento de las nuevas formas virales que se generan en el transcurso de la historia natural de la infección.

Numerosos trabajos han demostrado que determinados alelos del sistema HLA están asociados con vulnerabilidad a la infección por VIH-1 y progresión a sida (Hill 1996). De esta forma se ha descrito la existencia de una relación directa entre el tiempo de progresión a sida asociado a determinados alelos del HLA y el



número de péptidos que pueden ser presentados por dichos alelos (Nelson, Kaslow et al. 1997).

Se ha encontrado que los alelos relacionados con un ritmo lento a sida presentan una gran tolerancia en cuanto a los cambios producidos en el péptido que ubican. Sin embargo los alelos asociados a un ritmo de progresión rápido no aceptan modificaciones en los péptidos que presentan (Hendel, Caillat-Zucman et al. 1999).

Podemos concluir por tanto que cuanto mayor sea el número de epítomos que pueden albergar las moléculas HLA de un individuo, lo cual viene dado por la heterocigosidad de los genes HLA, mayores serán las opciones que tendrá el sistema inmunológico para responder de forma eficiente a la infección.

En la generación de la respuesta inmune frente al ataque de un virus la respuesta inmune celular de tipo Th1 es predominante (Galli, Annunziato et al. 2001). El mantenimiento de una respuesta Th1 y la acción continuada de los linfocitos T citotóxicos juega un papel crítico en el control de la infección (Norris and Rosenberg 2001), de forma que se ha demostrado que cuanto mayor es la respuesta inmune celular específica frente al VIH-1 (Th1) menor es la carga viral que se detecta en plasma (Norris and Rosenberg 2001).

Las células Th1 descienden en número a lo largo del transcurso de la enfermedad en los individuos seropositivos que no reciben tratamiento. Por este motivo, la respuesta específica Th1 va siendo comprometida conforme avanza la infección. Se ha observado que los individuos *long-term nonprogressors* consiguen mantener un nivel elevado de esta población celular a lo largo de la enfermedad sin recibir ningún tipo de tratamiento antiretroviral. También se ha descrito una gran actividad Th2 (medida por la secreción de IL4) en este grupo de individuos. Este hecho pone de manifiesto la importancia de mantener un balance adecuado entre la respuesta Th1 y Th2. Por tanto, la variabilidad en genes relacionados con la modulación de dicho balance puede afectar a la capacidad de generar una respuesta inmune eficaz frente al VIH-1.

Se han descrito variaciones en genes implicados en la respuesta Th2 específica (*IL-4* e *IL10*) que se han asociado a diferencias en la progresión de la infección. IL-4 e



IL-10 son interleuquinas expresadas por células Th2 específicas que determinan una respuesta inmunitaria humoral. En el contexto de la infección por VIH-1, IL-4 es relevante puesto que presenta la capacidad de inhibir la expresión de *CCR5*. Se ha descrito una variante en el promotor de *IL-4* (-589T) que se asocia con un incremento en la transcripción del gen. Esta variante se asocia con protección frente a la infección por cepas R5 y un ritmo lento de progresión a sida. La acción protectora de dicho alelo sería consecuencia del incremento de las concentraciones de IL-4, que daría lugar a un descenso en la expresión de *CCR5*, inhibiéndose así la infección por virus de la cepa R5. También se ha descrito la existencia de una variante de *IL-10* (5'A) que ha sido asociada a un descenso en la síntesis de IL-10 y a una progresión rápida a sida (Shin, Winkler et al. 2000).

Finalmente, la capacidad de interferir la replicación viral se ha relacionado con variantes de *APOBEC3G*. Estudios recientes indican que los niveles de *APOBEC3G* pueden predecir el ritmo de progresión a sida (Jin, Wu et al. 2007). Dichos niveles pueden verse afectados por variaciones polimórficas en el gen *APOBEC3G*. Se ha descrito la variante C40693T, localizada en el intrón 4 del gen *APOBEC3G*, asociada con un incremento en el riesgo de infección por VIH-1 (Valcke, Bernard et al. 2006). Asimismo, en el exón 4 del gen *APOBEC3G* se localiza la variante H186R que induce un cambio no sinónimo en el codón 186 (A-G; histidina a arginina). Dicha variante es polimórfica en la población afroamericana (AA; f=37%) y está asociada con un ritmo de progresión rápido a sida (An, Bleiber et al. 2004).

9.- Receptor de citoquinas CCR5.

El receptor-c de citoquinas 5 (CCR5) 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 (GPCR, *G-protein coupled receptor*) (Figura 10). Dichos receptores presentan siete dominios transmembrana y están implicados en gran número de procesos fisiológicos.

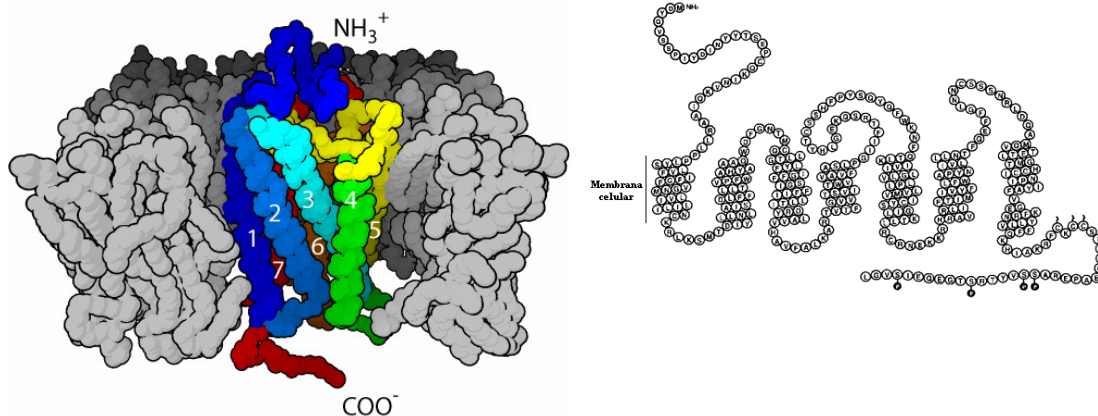


Figura 10. Estructura del receptor CCR5 con siete dominios transmembrana acoplados a la proteína G

El receptor CCR5 se expresa principalmente en células T, macrófagos, células dendríticas y células de la microglía.

9.1.- Función de CCR5.

CCR5 actúa de forma natural como receptor de las quimiocinas MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) y RANTES (CCL5) que están implicadas en la activación celular durante la respuesta inflamatoria. Diversos estudios señalan además su implicación en la activación de las células Th1 (Galli, Annunziato et al. 2001).

CCR5 también es conocido por su papel en la infección por VIH-1 al actuar como cofactor de las cepas virales R5 en la entrada del virus en la célula huésped.

9.2.- Estructura del gen *CCR5*.

El gen *CCR5* se localiza en el cromosoma 3 (3p21). En dicha región cromosómica también se localizan genes homólogos como *CCR1*, *CCR2* y *CCR3* que codifican proteínas que pertenecen a la misma familia de receptores transmembrana.

El gen *CCR5* presenta una longitud aproximada de 6 kb y está constituido por tres exones y dos intrones que dan lugar a un transcrito de 3655 pb que codifica para una proteína de 352 residuos. Toda la región codificante del gen se encuentra localizada en el exon 3 (Figura 11).

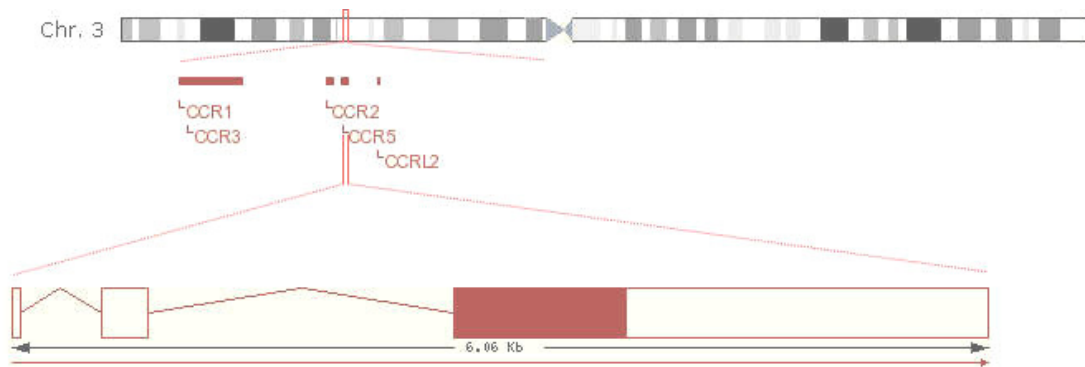


Figura 11. Esquema de la región genómica y estructura del gen *CCR5*

El promotor de *CCR5* se localiza próximo al exón 1. Esta región se caracteriza por la presencia de lugares de unión de factores de regulación transcripcional como OCT1, OCT2, factor 1a específico de células T y proteína de unión a GATA (Liu, Zhao et al. 1998). La expresión de *CCR5* está influenciada por gran número de factores como citoquinas, LPS e interleuquinas como la IL-2, IL-4 e IL-10 (Patterson, Czerniewski et al. 1999).

9.3.- Variantes del gen *CCR5*.

Se han descrito diversas variantes en la región genómica del gen *CCR5* entre las cuales cabe destacar las localizadas en la región promotora y la variante $\Delta 32$ localizada en el exón 3. Entre el exón 1 y el exón 2 se han descrito diez SNPs que definen diez haplotipos diferentes del promotor de *CCR5*. Mediante la detección de tres de estos polimorfismos (rs1799988, rs41469351 y rs1800023) es posible discriminar los cuatro haplotipos más comunes (*P1*, *P2*, *P3* y *P4*) (An, Martin et al. 2000). Dichos haplotipos se relacionan con un mayor o menor nivel de transcripción del gen *CCR5* siendo el haplotipo *P1* el que se asocia con un promotor activo y los haplotipos *P2*, *P3* y *P4* (haplotipos *noP1* o *Px*) los que se asocian con un promotor de menor actividad. (H. Liu and Shioda 2007)

En la región codificante del gen *CCR5* (exón 3), se localiza un polimorfismo de inserción/delección conocido como $\Delta 32$ (rs333). El alelo menos frecuente consiste en una delección de 32 pares de bases que genera una proteína no funcional que



no se exporta a membrana (Liu, Paxton et al. 1996). En la población caucasiana, a frecuencia del alelo silvestre (*wt*, *wild type*) es del 95,2% y del alelo $\Delta 32$ es del 4,8%. En algunas poblaciones del norte de Europa la frecuencia del alelo $\Delta 32$ alcanza frecuencias del 13%, mientras que en otras poblaciones en otras, como las poblaciones africanas de origen sub-sahariano o poblaciones de Asia, dicho polimorfismo es raro o no se detecta (Martinson, Chapman et al. 1997).

La ausencia de CCR5 funcional en los individuos homocigotos para dicha delección no parece tener ninguna repercusión a nivel fisiológico y no se han observado síntomas clínicos relacionados con dicha alteración. Esto puede ser debido a que otros genes de la familia en la cual se engloba *CCR5*, suplen las funciones naturales atribuibles a dicho receptor de citoquinas (Premack and Schall 1996). Dado que CCR5 puede actuar como correceptor del VIH-1, los individuos homocigotos para el alelo $\Delta 32$ ($\Delta 32\Delta 32$) son resistentes a la infección por cepas R5 del virus. Asimismo, el ritmo de progresión a sida de los pacientes heterocigotos (*wt* $\Delta 32$) es menor que en los homocigotos para el alelo salvaje (*wtwt*). Aunque el efecto sobre el ritmo de progresión no se ha demostrado en todas las cohortes analizadas (Schinkel, Langendam et al. 1999).

Se ha observado la existencia de desequilibrio de ligamiento total entre el haplotipo *P1* del promotor y el alelo $\Delta 32$, de tal forma que el alelo $\Delta 32$ siempre lo encontraremos en un contexto *P1*. Ello permite definir tres haplotipos de *CCR5*, *P1-wt*, *P1- $\Delta 32$* y *Px-wt* (Figura 12).

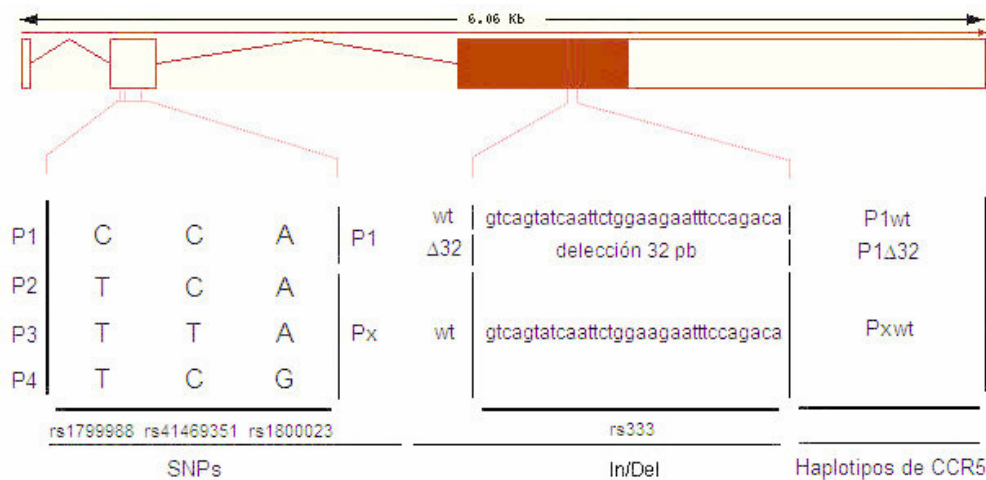


Figura 12. Haplotipos del gen *CCR5*.



El haplotipo *P1-wt* se asocia con niveles altos de proteína CCR5 en membrana, mientras que el haplotipo *Px-wt* se asocia con niveles bajos del receptor. Finalmente, el haplotipo *P1-Δ32* da lugar a la expresión de CCR5 no funcional.



C.- LA VITAMINA D Y EL GEN *VDR*.

La vitamina D, descubierta como un nutriente esencial que previene el raquitismo, presenta un papel fundamental en la homeostasis de calcio y fósforo. Hoy se conoce que el raquitismo se puede prevenir mediante la exposición a la radiación UV, la cual estimula la producción de vitamina D₃ en la piel. Esta capacidad endógena de producir una cantidad suficiente de vitamina D₃ mediante la exposición a la luz solar indica que la históricamente conocida como vitamina D, no es una vitamina sino una hormona.

La denominación vitamina D engloba una serie de hormonas secoesteroideas siendo las más conocidas el colecalciferol (vitamina D₃), que se sintetiza en la piel, y el ergocalciferol (vitamina D₂), que es sintetizado por las plantas (Figura 13).

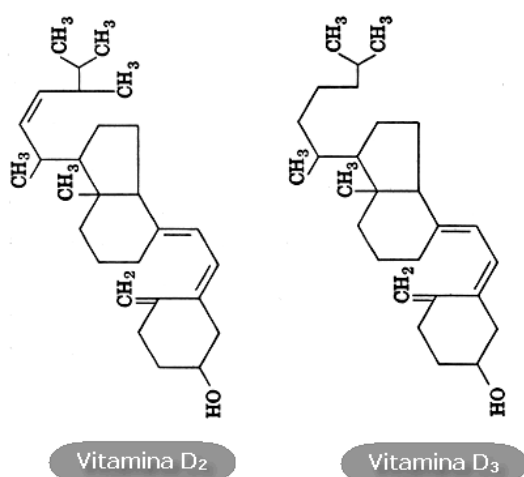


Figura 13.- Esquema de las formas más importantes desde un punto de vista nutricional de la vitamina D; vitamina D₂ (ergocalciferol) y vitamina D₃ (colecalciferol).

1.- Biosíntesis de la vitamina D.

El metabolito activo de la vitamina D, la 1,25-dihidroxitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃], puede obtenerse de la dieta o por acción de la radiación solar sobre la piel. La exposición de la piel a la radiación ultravioleta induce la conversión fotolítica del 7-dehidrocolesterol a previtamina D₃ y de esta a vitamina D₃ (Figura 14). La vitamina D₃, la cual no posee función biológica alguna, es transportada por una proteína ligadora, la DBP (del inglés, *vitamin D binding*



protein) desde la piel hasta el hígado dónde tendrá lugar su primera transformación bioquímica.

El primer paso en la activación metabólica de la vitamina D₃ tiene lugar en el hígado y consiste en la hidroxilación del carbono 25. Esta reacción es llevada a cabo por una enzima mitocondrial 25-hidroxilasa que cataliza la formación de la 25-hidroxivitamina D₃ [25(OH)D₃] a partir de la vitamina D₃. Está, es la forma circulante más abundante y por ello, los niveles de este metabolito en plasma se utilizan como indicadores del estatus nutricional en vitamina D (Holick 1981).

El siguiente paso en el proceso de bioactivación tiene lugar en el riñón y es llevado a cabo por la enzima 1 α -hidroxilasa, que mediante la hidroxilación del carbono 1 de la 25-hidroxivitamina D₃ [25(OH)D₃] genera la forma activa de la vitamina D₃, la 1,25-dihidroxivitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃]. La acción de la 1 α -hidroxilasa es el paso limitante de la ruta biosintética de la vitamina D y es finamente regulada por los propios niveles de 1,25(OH)₂D₃ mediante retroalimentación negativa, además de por otros factores como la acción de la hormona paratiroidea (PTH) y los niveles de calcio y fosfato (Omdahl, Gray et al. 1972).

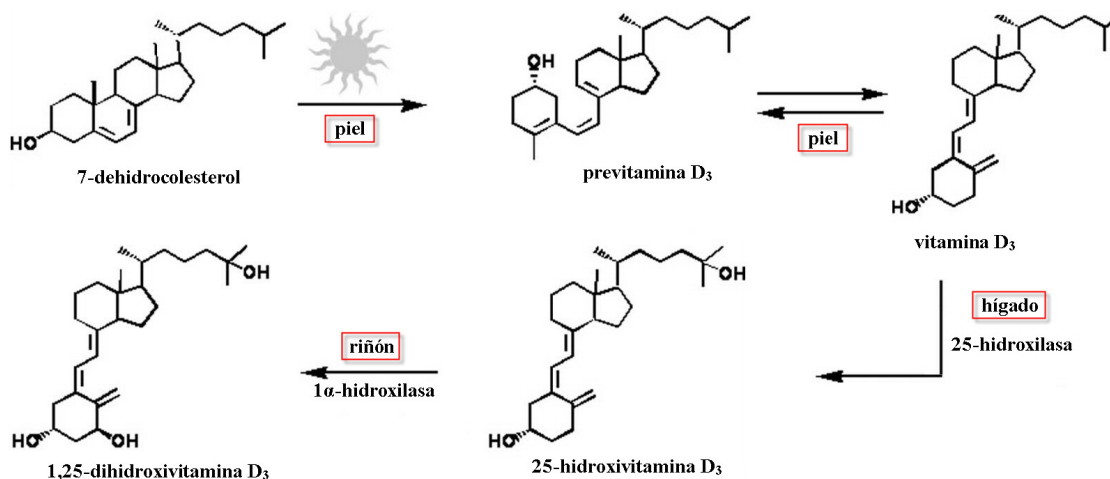


Figura 14. Metabolismo de la vitamina D. El precursor de la vitamina D sufre diversas transformaciones hasta su forma activa.

La vitamina D₃ producida en el riñón actúa de forma sistémica realizando funciones endocrinas regulando la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo.



También se ha descrito síntesis de vitamina D₃ a nivel local catalizada por la 1 α -hidroxilasa presente en células dendríticas, macrófagos (Adams and Gacad 1985), queratinocitos (Huang, Papavasiliou et al. 2002), células de la mucosa del colon (Cross, Bareis et al. 2001) y células endoteliales (Zehnder, Bland et al. 2002). La vitamina D₃ sintetizada a nivel local participa en diferentes acciones de tipo autocrino y paracrino como son promover la diferenciación celular, inhibir la proliferación celular y regular la respuesta inmune (Figura 15).

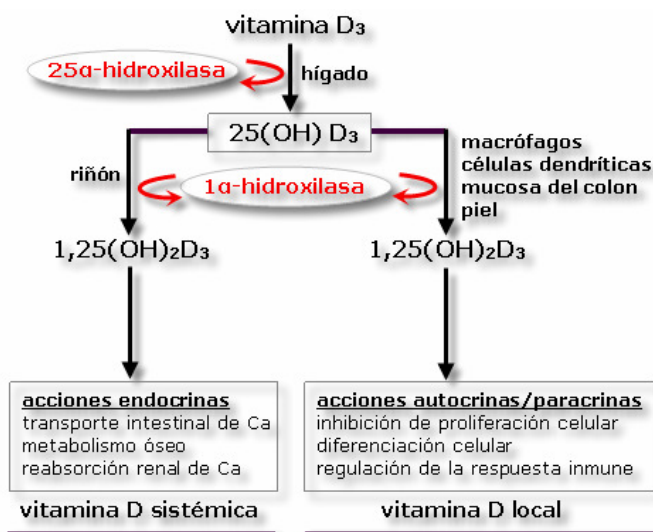


Figura 15.- Síntesis sistémica y local de la vitamina D. Acción endocrina, autocrina y paracrina de la vitamina D.

La inactivación catabólica de la vitamina D se lleva a cabo por la enzima 24-hidroxilasa, enzima responsable de la hidroxilación de la 25(OH)D₃ y de la 1,25(OH)₂D₃ para formar la 24,25(OH)₂D₃ y la 1,24,25(OH)₃D₃, respectivamente. Dicha enzima, localizada principalmente en el túbulo contorneado distal del riñón y en las células diana de la vitamina D₃, es la responsable de evitar la toxicidad de la 1,25(OH)₂D₃.

2.- Acción genómica de la vitamina D.

La acción genómica de la vitamina D se lleva a cabo a través de la unión a su receptor nuclear VDR (VDR, del inglés *vitamin D receptor*). La mayoría de las funciones biológicas de la vitamina D requieren la participación del receptor de alta afinidad VDR, que pertenece a la familia de receptores nucleares de hormonas



esteroideas. El VDR, como otros miembros de la familia de receptores de hormonas esteroideas, actúa como factor de transcripción dependiente de ligando (Brown, Dusso et al. 1999).

2.1.- Estructura de la proteína VDR.

La proteína VDR de humanos es una molécula de 427 aminoácidos y un peso molecular de 50 kDa. En la Figura 16 se presenta un esquema de la proteína VDR y sus dominios funcionales. Estos son:

- i) dominio de unión a ligandos (LBD, del inglés *ligand binding domain*),
- ii) regiones de heterodimerización con el receptor del ácido retinoico (RXR, del inglés *retinoic X receptor*),
- iii) dominio de unión al ADN (DBD, del inglés *DNA binding domain*) y
- iv) lugar de unión a proteínas nucleares coreguladoras del complejo transcripcional que modulan el nivel de transcripción de los genes diana.

El dominio de unión a ligando se localiza en la porción terminal COOH- del VDR y es responsable de la unión de alta afinidad con la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. También tiene capacidad para unirse a la $25(\text{OH})\text{D}_3$ y a la $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pero sin embargo lo hace con un grado de afinidad 100 veces menor (Brumbaugh and Haussler 1974; Mellon and DeLuca 1979). La región A de la proteína VDR es crítica para la correcta unión de la vitamina D al VDR.

En el extremo C-terminal se localiza el dominio de activación de la función-2 (AF-2, del inglés *activation function-2*). Su activación requiere la unión de proteínas motoras (Racz and Barsony 1999), que son responsables de la rápida translocación del VDR desde el citoplasma al núcleo a través de los microtúbulos (Barsony and McKoy 1992).

El VDR actúa como un heterodímero uniéndose al receptor del ácido retinoico. Dicha unión conlleva variaciones en los tres dominios de heterodimerización, que inducen un cambio conformacional en el VDR esencial para las funciones transactivadoras del receptor.

En la región N-terminal se localiza el dominio de unión al ADN (DBD), una región altamente conservada en la familia de receptores nucleares esteroideos. En dicha



región se localizan los motivos de unión al ADN en dedos de zinc. Éstos son responsables de la interacción de alta afinidad con secuencias específicas de ADN de la región promotora de los genes diana de la vitamina D. Dichas secuencias génicas son conocidas como elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs, del inglés *vitamin D response elements*). Se han descrito mutaciones naturales en la región de dedos de zinc del gen *VDR* en humanos que dan como resultado uniones defectivas a los VDRE, siendo responsables, a nivel clínico, de la aparición de resistencias a la vitamina D (Haussler, Whitfield et al. 1998).

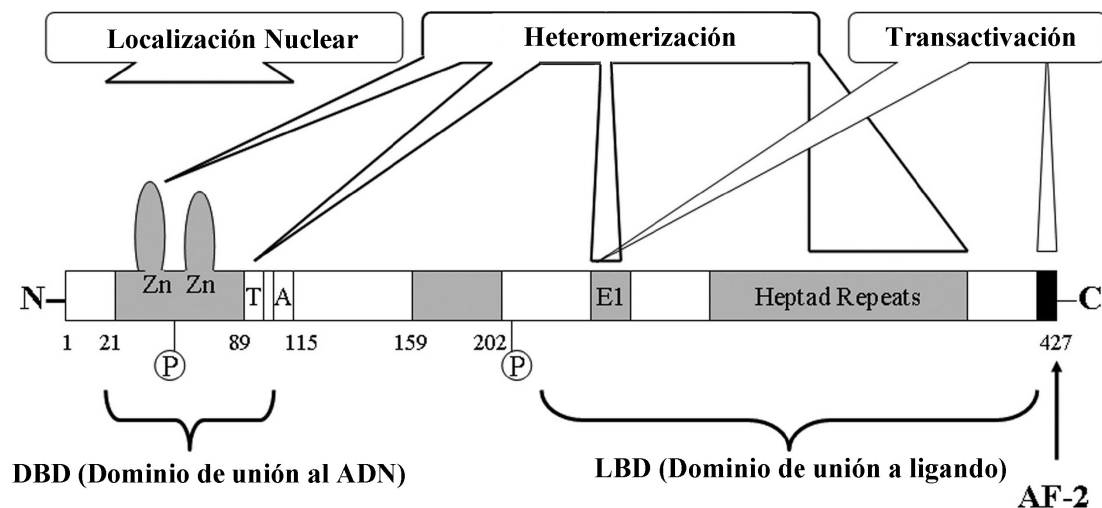


Figura 16. Estructura del receptor de la vitamina D.

2.2.- Genes diana y elementos de respuesta a vitamina D.

El VDR unido a la vitamina D se transloca del citoplasma al núcleo. En el núcleo, y ya formado el complejo heterodimérico VDR-RXR, se produce la unión de dicho complejo a los VDREs de los genes diana (Figura 17).

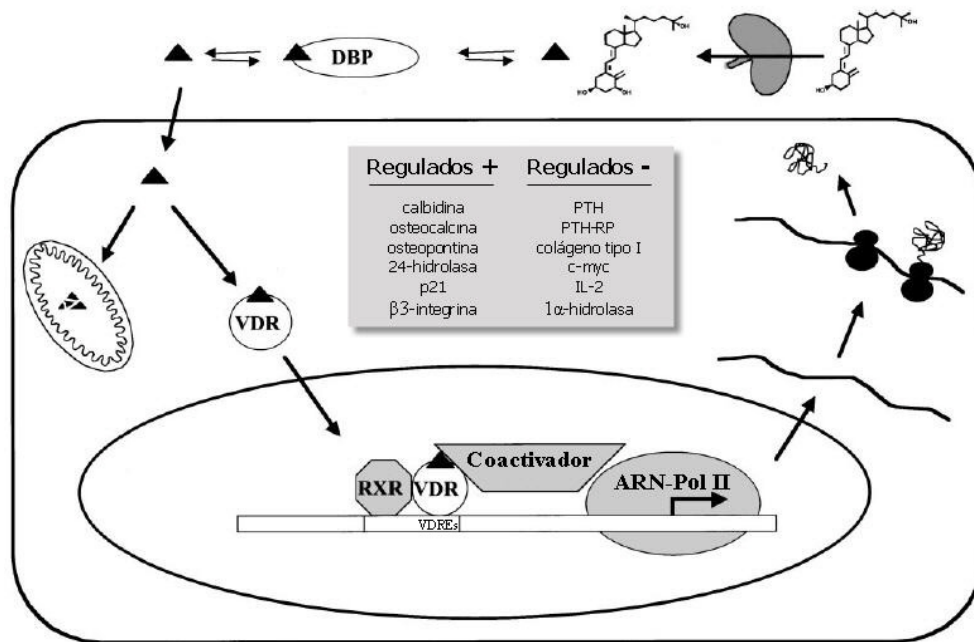


Figura 17. Modelo de la acción genómica de la vitamina D mediada por VDR. Figura adaptada de Brown, 1999 (Brown, Dusso et al. 1999).

Se han caracterizado diferentes VDREs en la región promotora de genes regulados por vitamina D. Se caracterizan por una secuencia consenso que puede definirse como repeticiones directas de 6 bases separadas por 3 (DR-3) o 9 (IP9) bases. El hexámero presenta una secuencia con dos posiciones variables: $\underline{R}GK\underline{T}CA$ (R=A,G, K=G,T). (Dunlop, Vaisanen et al. 2005)

Los VDREs de la clase IP-9 presentan una diferencia adicional respecto a los DR-3. En los IP9 la orientación de la primera secuencia hexamérica es inversa a la segunda, de forma que ambas se disponen encontradas, mientras que en los DR-3 ambas secuencias consenso se encuentran orientadas en la misma dirección tal y como puede apreciarse en la Figura 18.

Estas secuencias son las responsables de la orientación del heterodímero VDR-RXR en el promotor de los genes regulados por la vitamina D. La fracción RXR del heterodímero queda localizada en la posición 5' de la secuencia promotora mientras que la fracción VDR queda orientada en 3'.

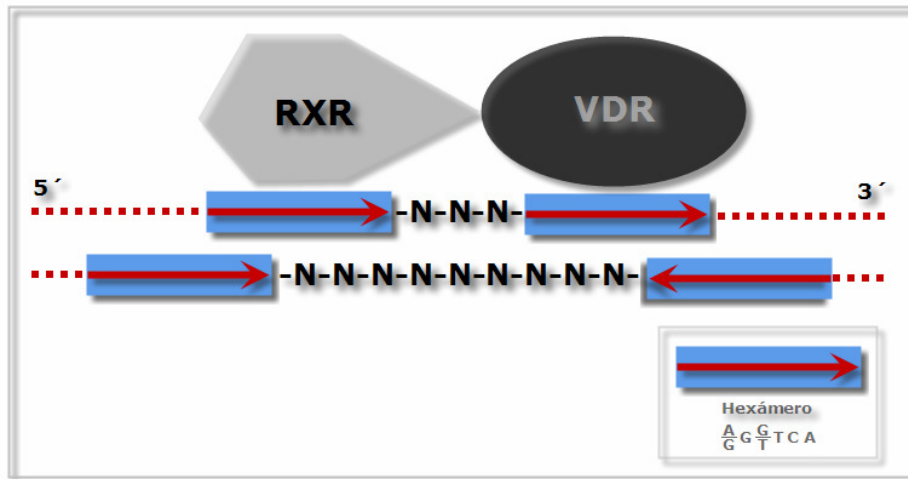


Figura 18. Estructura de los VDREs de la clase IP-9 y DR-3

Asimismo, se han caracterizado algunos de los VDREs de genes regulados negativamente por la vitamina D, como el gen *inhibidor de la proteína quinasa A* y el gen de la *osteocalcina* de ratón, entre otros. En estos, la represión génica está mediada por la unión del complejo vitamina D-VDR a los VDREs localizados en los genes diana. Sin embargo, en el caso de la inhibición del gen *IL2*, el VDR no actúa mediante el reconocimiento de dichos VDREs. En este caso el heterodímero VDR-RXR bloquea el complejo de transcripción NFATp/AP-1 que interviene en la expresión de la IL-2 (Alroy, Towers et al. 1995). Para que el VDR realice su función ha de interactuar con factores transcripcionales y coactivadores. La región AF2 del VDR interactúa de forma directa con distintas proteínas que son componentes del complejo de inicio de la transcripción y coactivadores. Una de estas proteínas, el factor de transcripción TFIIB, juega un papel fundamental en procesos de transcripción dependiente de ligando (Blanco, Wang et al. 1995). El VDR también se asocia con una proteína que es coactivador de receptores esteroideos, la proteína SRC-1. La unión a este coactivador es fundamental para la actividad transcripcional de la superfamilia de receptores esteroideos.

Además de estas, el VDR puede interactuar con otras muchas proteínas entre las que cabe destacar NCoA-62, p65, TAFII28 y el TIF1. La interacción del heterodímero VDR-RXR con proteínas nucleares facilita la formación y ensamblaje del complejo de transcripción y regula el ritmo de transcripción de los genes diana mediante la ARN-polimerasa II.



2.3.- Estructura del gen *VDR*.

El gen *VDR* se localiza en el cromosoma 12 (12q13.11) (Figura 19). Presenta una secuencia de una longitud aproximada de 63,5 kb. La longitud del transcrito varía entre especies de forma que en humano y rata presenta una extensión de 4,63 Kb mientras que en aves es de 2,7 kb y en anfibios (*Xenopus laevis*) es de 2 kb. Sin embargo la proteína tiene un tamaño parecido entre las distintas especies, presentando una extensión en humanos de 427 aminoácidos, 424 en rata y 422 en *Xenopus*.

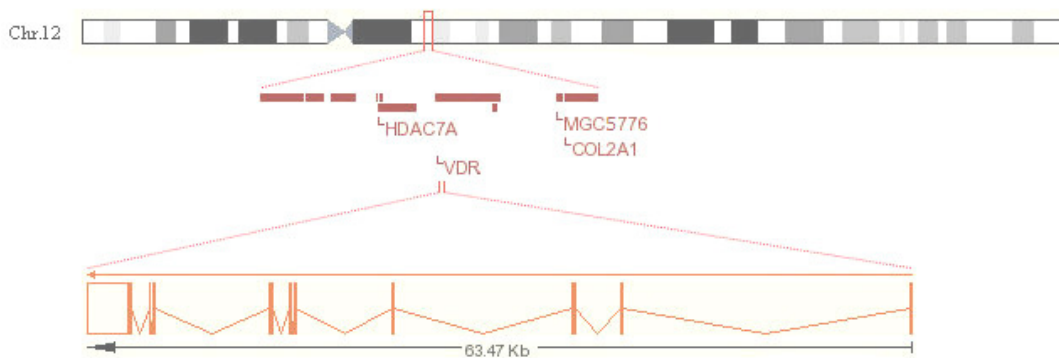


Figura 19. Localización genómica, genes vecinos y estructura del gen *VDR*

El gen está constituido por 8 exones codificantes (exones 2 al 9 según la nomenclatura del gen en humanos (Miyamoto, Kesterson et al. 1997)) y un número variable de exones no codificantes en la región 5' UTR (exones 1a-1d) (Figura 20).

Se ha descrito el uso alternativo de los distintos promotores del gen. En humanos se ha documentado la existencia de tres posibles promotores del *VDR*. Un primer promotor se localiza cerca del exón 1a, un segundo cerca del exón 1f, y un tercero cerca del exón 1c. La utilización de los distintos promotores varía según el tipo celular que expresa el *VDR* (Byrne, Flanagan et al. 2000). Asimismo, se ha descrito *splicing* alternativo de los exones 1a, 1b y 1c, y 1d, 1e y 1f, que puede generar 14 transcritos diferentes en humanos (Miyamoto, Kesterson et al. 1997; Crofts, Hancock et al. 1998) (Figura 20).

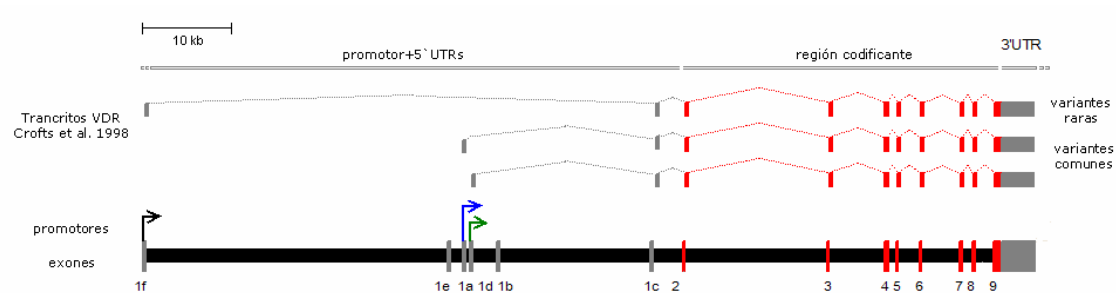


Figura 20. Promotores alternativos del gen *VDR* (flechas de color).

3.- Variantes del gen *VDR*.

Se han detectado polimorfismos en la región 5'UTR, región codificante y región 3'UTR (Figura 21). Algunos de estos polimorfismos tienen un efecto directo sobre la estructura o expresión del *VDR* o bien sobre la estabilidad del ARNm. Sin embargo, otros polimorfismos no presentan, aparentemente, efectos directos sobre la función de la proteína *VDR*.

3.1.- Polimorfismos de la región 5'UTR.

En la región promotora del *VDR* se ha identificado un lugar de unión para el factor de transcripción CDX-2, específico de células intestinales, que participa en la regulación de la expresión del *VDR* en dichas células. Se ha descrito que la proteína CDX-2 está relacionada con fenómenos de absorción de calcio a nivel intestinal (Yamamoto, Miyamoto et al. 1999) y juega un papel importante en el desarrollo y diferenciación del intestino (Freund, Domon-Dell et al. 1998). En la zona de unión a este factor en el gen *VDR* se localiza un polimorfismo, el rs11568820-A/G, (conocido en la literatura como *Cdx*) que altera la afinidad al factor CDX-2. El alelo A confiere una mayor afinidad por la unión al CDX-2 dando lugar a una mayor capacidad transactivadora y por tanto mayores niveles de expresión del *VDR* en las células intestinales (Arai, Miyamoto et al. 2001).

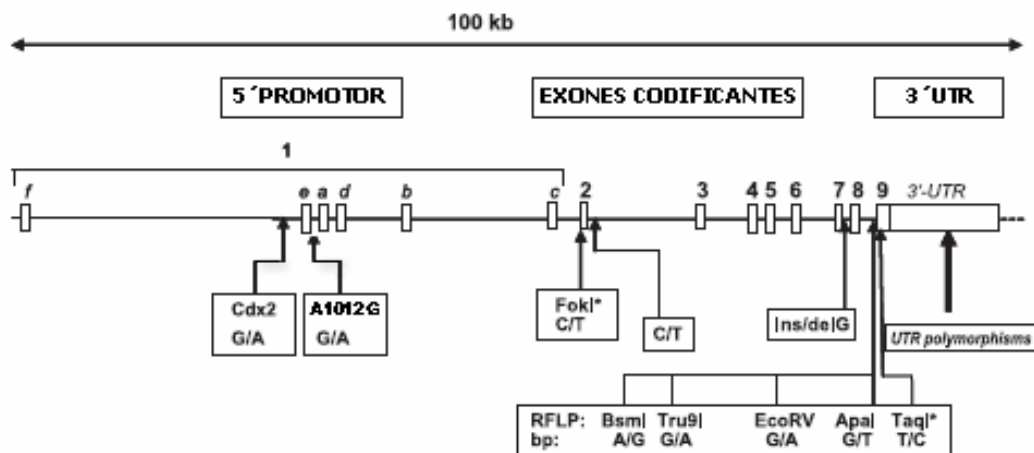


Figura 21.-Estructura del gen *VDR* y polimorfismos conocidos (*polimorfismos localizados en región codificante). Figura adaptada de Uitterlinden 2004 (Uitterlinden, Fang et al. 2004)

Otro polimorfismo localizado en la región 5'UTR del gen *VDR*, próximo al exón 1a, es el polimorfismo rs4516035-A/G, también conocido como *A1012G* (Halsall, Osborne et al. 2005). El alelo A introduce un sitio de reconocimiento para un factor de transcripción de la familia GATA. Dicho factor está implicado en la polarización a de los linfocitos T hacia Th2 (Rengarajan, Szabo et al. 2000). Se ha descrito que la vitamina D induce la expresión de GATA-3 y que esta promueve la polarización a Th2 (Boonstra, Barrat et al. 2001). Se ha descrito que el elemento a respuesta a GATA-3 en el alelo A del promotor del *VDR* genera un aumento en la polarización a Th2 inducida por GATA-3.

3.2.- Polimorfismos de la región codificante.

En la región codificante se localiza un polimorfismo que modifica la secuencia de sitio de inicio de transcripción del exón 2. Este polimorfismo, el rs1073810-C/T, consiste en un cambio de base C por T que introduce una diana de restricción para la enzima Fok-I. La nomenclatura utilizada para los polimorfismos de tipo RFLP (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*) hace referencia a la ausencia o presencia de la diana de restricción. La ausencia de la diana se denota con la letra mayúscula, mientras que la presencia de la diana se denota con letra minúscula. En el caso del polimorfismo *Fok-I*, el alelo *F*, que indica la ausencia de diana, se corresponde con el alelo C a nivel de secuencia, y el alelo *f*, que indica



la presencia de diana, se corresponde con el alelo T. Cuando la variante C está presente se pierde el codón de inicio de transcripción (ATG > ACG) de forma que se utiliza un lugar de inicio de transcripción alternativo localizado en el codón 4, dando lugar a una proteína más corta. Por este motivo, este polimorfismo produce dos isoformas alternativas de la proteína VDR que se diferencian en tres aminoácidos. Los tres aminoácidos presentes en la isoforma *f*, la más larga, son Met-Glu-Ala. Se ha descrito que la isoforma *F* del VDR es la que presenta una mayor actividad transcripcional. Estos resultados se relacionan con estudios que demuestran que la interacción del factor de transcripción TFIIB y el VDR presenta una mayor afinidad en la variante derivada del alelo *F*.

3.3.- Polimorfismos de la región 3'UTR.

En la región 3'UTR del gen *VDR* se ha descrito una alta variabilidad genética debida a la presencia de varios polimorfismos. El número y posición de estos ha sido ampliamente discutido en la literatura de forma que Morrison et al. (Morrison, Qi et al. 1994) habla de 13 polimorfismos y Durrin et al. (Durrin, Haile et al. 1999) describe 7 de estos. Algunos de estos polimorfismos son de tipo RFLP como por ejemplo los polimorfismos *Apa-I* (Faraco, Morrison et al. 1989), *Bsm-I* (rs1544410-C/T)(Morrison, Yeoman et al. 1992), *Taq-I* (Morrison, Qi et al. 1994), y *Tru9* (Ye, Reis et al. 2000)

La región 3'UTR del gen *VDR* está relacionada con la estabilidad del ARNm y como consecuencia con el nivel de expresión de VDR. Los polimorfismos *Bsm-I*, *Taq-I* y *Apa-I* se localizan en una región que presenta un alto desequilibrio de ligamiento lo que explica la asociación observada entre ellos. Mediante el estudio de expresión con el gen *luciferasa* como gen reportero, Morrison et al. (Morrison, Qi et al. 1994) demostró que el haplotipo *BA^t* genera mayor actividad luciferasa que el haplotipo *ba^T*, lo que sugiere que el haplotipo *BA^t* confiere una mayor estabilidad del ARNm en células que presentaban dicho haplotipo. Sin embargo otros trabajos no encontraron efectos significativos de las variantes alélicas de la



región 3'UTR en la estabilidad o niveles de ARNm (Mocharla, Butch et al. 1997; Gross, Krishnan et al. 1998; Durrin, Haile et al. 1999).

En un reciente estudio, Fang et al. (Fang, van Meurs et al. 2005) determinó las diferencias en los niveles de expresión de ARNm entre los dos haplotipos más frecuentes del 3'UTR observando que el haplotipo *baT* induce un nivel de expresión un 15% menor que el haplotipo *BAt*.

Además de estos SNPs se ha localizado un polimorfismo de tipo microsatélite conocido como *polyA* (rs17878969), que consiste en la repetición de un número variable de adeninas. Dicho polimorfismo presenta una distribución bimodal con repeticiones de 15 a 18 adeninas (alelo *S*, de *small*) y repeticiones de más de 20 (alelo *L*, de *large*)

El desequilibrio de ligamiento de la región del 3'UTR también afecta al polimorfismo *polyA*. Así, las múltiples localizaciones polimórficas del extremo 3'UTR del gen *VDR* forman un grupo de ligamiento con el polimorfismo *polyA* de tal forma que el haplotipo *baT* está asociado con el alelo *L* (haplotipo extendido *baTL*) y el haplotipo *BAt* con el alelo *S* (haplotipo extendido *BAtS*) (Ingles, Haile et al. 1997).

Se conoce la existencia de una proteína de unión a secuencias polyA de la región 3'UTR (PABP, del inglés, *poly A binding protein*) especialmente afín a las formas largas del polyA. Se ha descrito en mamíferos que dicha proteína puede facilitar la translocación del ARNm mediante la interacción con otras proteínas (Mangus, Evans et al. 2003). Normalmente esta proteína se une a la cola de poly A de los ARNm, de forma que cada monómero de ésta ocupa unas 27 adeninas. Sin embargo, varios trabajos sugieren que la presencia de 11 de estas adeninas es suficiente para la unión de la proteína, siendo 25 el número de adeninas necesario para obtener la máxima afinidad de la PABP. Según ello el alelo *L* del polimorfismo *polyA* presentaría una mayor afinidad por la PABP y por tanto la presencia de dicho alelo conferiría al ARNm mayor capacidad de translocación (Whitfield, Remus et al. 2001).



4.- Patrón de desequilibrio de ligamiento y estructura de bloques de la región genómica del gen *VDR*.

El conocimiento de la relación de vecindad entre polimorfismos contiguos en una determinada región genómica resulta ser de gran interés. Dicha relación se obtiene a partir del estudio del desequilibrio de ligamiento de la región y el establecimiento del patrón de bloques de la misma. Los SNPs contenidos en un mismo bloque presentan un alto desequilibrio de ligamiento entre ellos y muy bajo desequilibrio de ligamiento con SNPs que se encuentran fuera de este bloque.

Fang et al. llevó a cabo un trabajo de caracterización de los polimorfismos del gen *VDR* en una población de caucasianos. A partir de sus resultados y de los descritos anteriormente por otros autores (Nejentsev, Godfrey et al. 2004), estableció un patrón de bloques consenso formado por un total de siete bloques con alto desequilibrio de ligamiento (Fang, van Meurs et al. 2005) que se distribuyen a lo largo del gen *VDR*. (Figura 22).

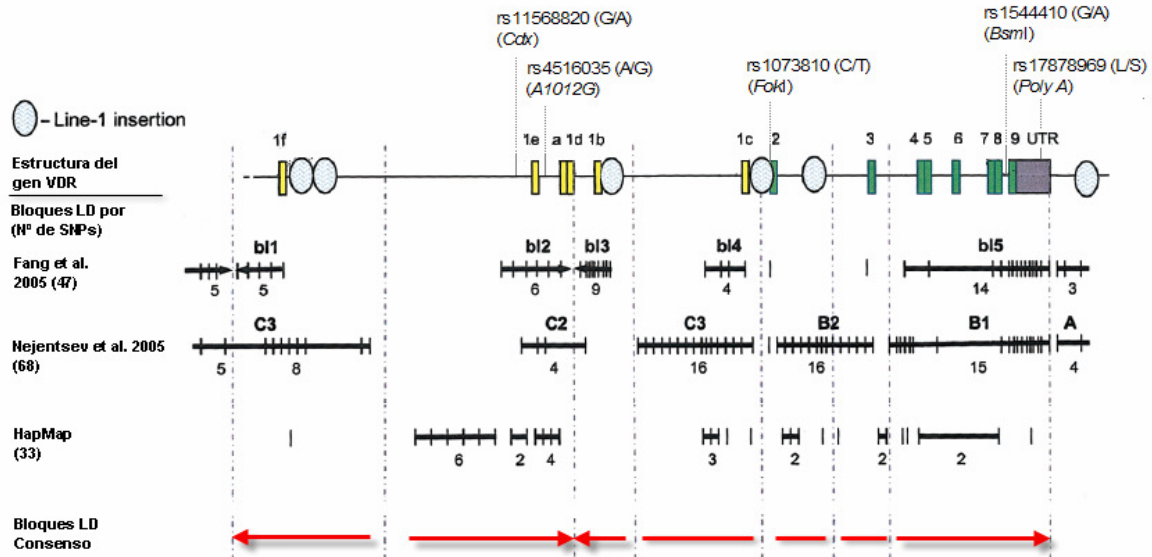


Figura 22.- Estructura de bloques del gen *VDR* según Fang et al. 2005 (Fang, van Meurs et al. 2005), Nejentsev et al. 2004 (Nejentsev, Godfrey et al. 2004), HapMap Project y patrón de bloques de LD consenso. Figura adaptada de Fang et al. 2005 (Fang, van Meurs et al. 2005). El número de SNPs analizados en cada estudio está indicado entre paréntesis. En la parte superior de la Figura se indica la posición de los SNPs seleccionados en este estudio (véase más adelante)



5.- Asociaciones descritas entre variantes del gen *VDR* y patologías humanas.

Se han publicado numerosos trabajos describiendo asociación de variantes del gen *VDR* con distintas patologías humanas. La interpretación de dichas asociaciones es compleja debido al hecho de que muchos de los polimorfismos asociados no son responsables de la asociación observada sino que actúan como marcadores de la variante causativa.

Dado que la vitamina D a través del receptor VDR interviene en numerosos procesos biológicos es posible encontrar que alteraciones en el nivel de expresión o función del VDR, debidas a la presencia de variantes del gen estén relacionadas con la manifestación de distintas enfermedades. La complejidad de muchas de estas patologías hace difícil establecer una relación causa-efecto y muchas de las asociaciones descritas no son fácilmente interpretables, presentándose en algunas ocasiones resultados contradictorios.

Tabla 5. Asociaciones descritas de variantes del gen VDR con diferentes patologías humanas

Enfermedad	Polimorfismos analizados	Polimorfismos asociados	Población/País	Referencia
Matabolismo óseo				
Osteoporosis/ Densidad ósea/ Fracturas de hueso				
	BsmI	BsmI	Australia	Morrison <i>et al.</i> 1994
	FokI, BsmI	BsmI	Amerindia	Lisker <i>et al.</i> 2003
	BsmI, PolyA	BsmI, PolyA	Suecia	Grundberg <i>et al.</i> 2003
	BsmI	BsmI	Francia	Garnero <i>et al.</i> 2005
	BsmI, ApaI, TaqI	BsmI, TaqI, ApaI	Caucasiana	Fang <i>et al.</i> 2005
	Cdx-2, FokI, BsmI, TaqI	Cdx-2	Caucasiana	Uitterlinden <i>et al.</i> 2006 ¹
	BsmI	BsmI	Hungría	Rass <i>et al.</i> 2006
	FokI, BsmI, ApaI, TaqI		Caucasiana	Zintzaras <i>et al.</i> 2006 ¹
	FokI, BsmI, ApaI, TaqII	BsmI	Asiática	Zintzaras <i>et al.</i> 2006 ¹
	FokI, BsmI	FokI, BsmI	Bulgaria	Ivanova <i>et al.</i> 2006
	BsmI		China	Wu <i>et al.</i> 2007
Hiperparatiroidismo				
	FokI, BsmI		Caucasiana	Sosa <i>et al.</i> 2000 ²
	BsmI, ApaI, TaqI	BsmI, ApaI, TaqI	Suecia	Carling <i>et al.</i> 1998 ²
	BsmI	BsmI	Caucasiana	Fernandez <i>et al.</i> 1997 ³
	BsmI	BsmI	Japón	Nagaba <i>et al.</i> 1998 ³
Proliferación celular				
Cáncer				
	BsmI, ApaI, TaqI	ApaI	Japón	Obara <i>et al.</i> 2007 ⁴
	PolyA	PolyA	Estados Unidos	Ingles <i>et al.</i> 1997 ⁴
	TaqI	TaqI	Estados Unidos	Taylor <i>et al.</i> 1996 ⁴
	FokI, TaqI, PolyA	TaqI, PolyA	Caucasiana	Correa-Cerro <i>et al.</i> 1999 ⁴
	TaqI, PolyA		Estados Unidos	Kibel <i>et al.</i> 1998 ⁴
	FokI, BsmI, TaqI, PolyA	FokI, BsmI, PolyA	Caucasiana, Africana, Asiática	Ntais <i>et al.</i> 2003 ^{1,4}
	TaqI, PolyA		Estados Unidos	Cheteri <i>et al.</i> 2004 ⁴
	TaqI, PolyA		Austria	Gsur <i>et al.</i> 2004 ⁴
	BsmI, PolyA	BsmI, PolyA	Caucasiana	Guy <i>et al.</i> 2004 ⁵

Tabla 5 (continuación). Asociaciones descritas de variantes del gen VDR con diferentes patologías humanas

Inmunidad				
Diabetes (Tipo I/Tipo II)				
	BsmI	BsmI	India	McDermott <i>et al.</i> 1997 ⁶
	BsmI, ApaI, TaqI	BsmI	Taiwan	Chang <i>et al.</i> 2000 ⁶
	BsmI	BsmI	Japón	Motohashi <i>et al.</i> 2003 ⁶
	BsmI, ApaI, TaqI	BsmI, ApaI, TaqI	Croacia	Skrabic <i>et al.</i> 2003 ⁶
	BsmI	BsmI	Alemania	Ortlepp <i>et al.</i> 2001 ⁷
	FokI	FokI	Croacia	Zemunik <i>et al.</i> 2005 ⁶
Psoriasis				
	A1012G, FokI	A1012G	Reino Unido	Halsall <i>et al.</i> 2005
	FokI, BsmI, ApaI, TaqI	BsmI, TaqI, FokI	Japón	Saeki <i>et al.</i> 2002
	ApaI		Korea	Park <i>et al.</i> 1999
Esclerosis múltiple				
	FokI	FokI	Reino Unido	Partridge <i>et al.</i> 2004
	ApaI, TaqI		Canadá	Steckley <i>et al.</i> 2000
	BsmI	BsmI	Japón	Fukazawa <i>et al.</i> 1999
Enfermedad de Graves				
	FokI	FokI	Japón	Ban <i>et al.</i> 2000
	FokI, Tru9, BsmI, ApaI, TaqI, Poly A		Reino Unido	Ban <i>et al.</i> 2000
Lupus eritematoso				
	BsmI	BsmI	Japón	Ozaki <i>et al.</i> 2000
	BsmI	BsmI	China	Huang <i>et al.</i> 2002
	FokI		China	Huang <i>et al.</i> 2002
Enfermedad de Crohn				
	FokI, ApaI, TaqI	TaqI	Caucasianos	Simmons <i>et al.</i> 2000
Tuberculosis				
	ApaI, TaqI	TaqI	Gambia	Bellamy <i>et al.</i> 1999
	FokI, TaqI		Cambodia	Delgado <i>et al.</i> 2002
	FokI, BsmI, ApaI, TaqI	FokI, BsmI, ApaI, TaqI	Africana	Lombard <i>et al.</i> 2006
	FokI	FokI	China	Liu <i>et al.</i> 2003
VIH-1 y sida				
	BsmI	BsmI	Caucasiana	Barber <i>et al.</i> 2001
	FokI	FokI	Caucasiana	Nieto <i>et al.</i> 2004
Hepatitis B				
	FokI, TaqI	FokI	China	Li <i>et al.</i> 2006
	ApaI, TaqI	ApaI, TaqI	India	Suneetha <i>et al.</i> 2006

(1) Meta-análisis, (2) HPT primario, (3) HPT secundario, (4) Cáncer de riñón, (5) Cáncer de próstata, (6) Cáncer de mama, (7) Diabetes Tipo I, (8) Diabetes Tipo II.



En la tabla 5 se muestra una relación de diversas patologías humanas en las cuales se ha descrito asociación con variantes del gen *VDR* haciendo un énfasis especial en aquellas que están relacionadas con disfunciones del sistema inmune.

6.- Papel de la Vitamina D en la regulación de la respuesta inmune.-

Tal y como ha sido mencionado anteriormente, la vitamina D ejerce una función moduladora del sistema inmune, tanto en la respuesta innata como adquirida.

La piel constituye la primera barrera natural del organismo frente al ataque de agentes patógenos. Sin embargo una vez que dichos agentes patógenos atraviesan la barrera epitelial y acceden al interior del huésped estos son reconocidos por una serie de receptores que participan en la respuesta inmune innata. Dichos receptores situados en la membrana plasmática de monocitos, macrófagos y células dendríticas son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs (del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) y reciben el nombre de *toll-like receptors* (TLRs) (Karin, Lawrence et al. 2006). Numerosos estudios demuestran que la vitamina D estimula la respuesta inmune innata en células presentadoras de antígenos como son las células dendríticas y los macrófagos. Al mismo tiempo la vitamina D interviene regulando la respuesta inmune adquirida controlando el balance Th1/Th2.

Se han descrito 11 TLRs diferentes que tienen la capacidad de reconocer una amplia variedad de antígenos, incluyendo péptidos, lípidos y ácidos nucleicos. La activación de estos receptores desencadena la inducción de diversas rutas de señalización intracelular que terminan con la destrucción del agente patógeno y el inicio de la respuesta inmune adquirida por parte de las células T y células B.

Se ha descrito que los TLRs pueden actuar en el reconocimiento de antígenos propios, que en determinadas situaciones conlleva el desencadenamiento de una respuesta autoinmune. La vitamina D tiene capacidad para reprimir este tipo de respuesta al inhibir la síntesis de TLRs en monocitos (Sadeghi, Wessner et al. 2006). Los macrófagos tienen la capacidad de sintetizar vitamina D a nivel local mediante la acción de la 1α -hidroxilasa endógena. En el caso de la infección por *M.*



tuberculosis, se ha descrito que el contacto del macrófago con la bacteria a través del TLR2, induce la síntesis de vitamina D. La vitamina D, a través de su receptor, tiene la capacidad de promover el procesamiento de antígenos (Rigby, Shen et al. 1984), la fagocitosis (Tokuda and Levy 1996) y la producción de IL1 y TNF- α , que permiten combatir de forma eficiente el ataque del agente patógeno (Fagan, Prehn et al. 1991; Prehn, Fagan et al. 1992). En este contexto la vitamina D estaría actuando como una *defensina*, entendiendo a esta como un agente antimicrobiano de síntesis endógena (Klotman and Chang 2006).

Estudios recientes han mostrado detalles relevantes del papel de las citoquinas en el proceso de la regulación de la síntesis de vitamina D a nivel de macrófagos. El IFN- γ , cuyos niveles de producción aumentan en el proceso de infección por *M. tuberculosis*, induce la expresión de la 1α -hidroxilasa y por ende la producción de vitamina D (Dusso, Brown et al. 2005), lo que permite controlar *in vivo* la infección. Sin embargo, en experimentos *in vitro*, la vitamina D suprime la síntesis de IFN- γ e IL12, y por tanto de la respuesta Th1, lo cual no se corresponde con el papel de la vitamina D descrito *in vivo*.

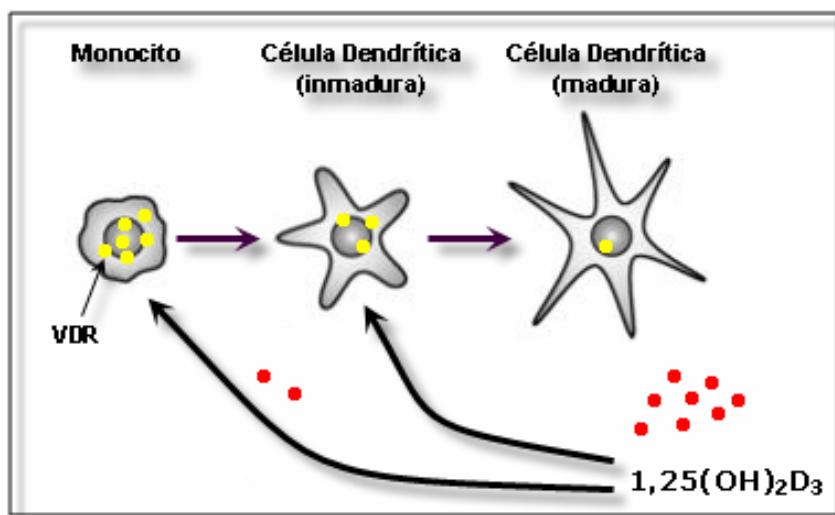


Figura 23. - Mecanismo de regulación paracrina en la maduración de células dendríticas mediada por vitamina D. Figura adaptada de Hewison (Hewison, Zehnder et al. 2004).

Diversos estudios demuestran que la vitamina D interviene en el proceso de maduración de las células dendríticas. Se ha descrito que la vitamina D inhibe la

maduración de monocitos a células dendríticas (Penna and Adorini 2000). También se ha descrito que las células dendríticas presentan la capacidad de sintetizar vitamina D (Fritsche, Mondal et al. 2003). Hewison et al. (Hewison, Zehnder et al. 2004) (Figura 23) presentó un modelo de regulación paracrina de la maduración de células dendríticas mediada por la vitamina D. Según este modelo los niveles de síntesis de vitamina D van incrementando conforme avanza el proceso de maduración de la célula dendrítica mientras que los niveles de expresión del receptor VDR disminuyen. Así, la vitamina D producida por las células dendríticas maduras inhibiría la maduración de nuevas células dendríticas, las cuales serían más sensibles a la vitamina D que las células maduras ya que estas expresan mayores niveles de VDR. Los bajos niveles de VDR producidos por las células dendríticas maduras hacen que estas pierdan la capacidad de responder a la vitamina D durante el proceso de maduración. Mediante este mecanismo la vitamina D sintetizada por las células dendríticas maduras sería capaz de regular de forma paracrina la maduración de nuevas células dendríticas.

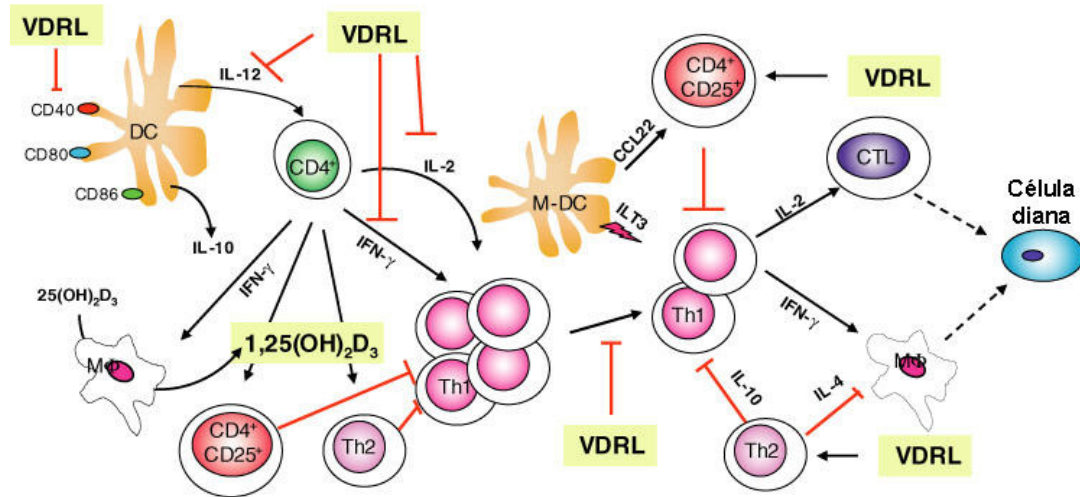


Figura 24.- Mecanismos implicados en la regulación de la respuesta inmune mediada por ligandos de VDR (VDRL). Los VDRL tienen la capacidad de modular la respuesta inmune a través de diversos mecanismos en órganos linfoides secundarios y tejidos diana. En órganos linfoides secundarios, la vitamina D inhibe la producción de IL12 y la expresión de moléculas de superficie de células dendríticas (DC) y aumenta la expresión de IL10 en estas, inhibiendo por tanto la diferenciación de células Th1 y favoreciendo la inducción de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ y células Th2. Los VDRL también ejercen su función en células T inhibiendo la síntesis de IL2 e IFN γ . Los macrófagos (M Φ), al igual que las células T y las células dendríticas, pueden sintetizar vitamina D la cual contribuye en la regulación de la respuesta inmune a nivel local. En los tejidos diana, las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ y las células Th2, inducidas por VDRL, reducen el número y la actividad de macrófagos activos y células Th1 autoinmunes con capacidad de dañar células diana mediante la inducción de células T citotóxicas. (en la imagen las puntas de flecha indican activación, las flechas sin punta indican inhibición y las flechas discontinuas indican citotoxicidad). Figura adaptada de Luciano Adorini, Vitamin D, 2^a Edición. Capítulo 36.



La vitamina D juega un papel fundamental en la regulación del balance Th1/Th2. La vitamina D sintetizada por células dendríticas y macrófagos también actúa sobre la función linfocitaria. Esta, a través del receptor VDR, inhibe la diferenciación y proliferación de linfocitos T (Bhalla, Amento et al. 1984), controlando la respuesta celular frente a antígenos propios, respuesta autoinmune, en la que intervienen las células Th1 que tienen capacidad de dañar células diana por vía de las células T citotóxicas y macrófagos activos. La vitamina D actúa como represor de la respuesta Th1 inhibiendo la síntesis de IFN- γ , IL2 e IL12 (Muller, Odum et al. 1993), principales citoquinas pertenecientes al patrón Th1 (Figura 24). Además de inhibir la respuesta Th1, la vitamina D favorece la inducción de células T reguladoras CD4+CD25+ y células Th2. Por tanto, en un entorno de producción de vitamina D se verá favorecido el desplazamiento del balance Th1/Th2 hacia una respuesta Th2 (Figura 24).



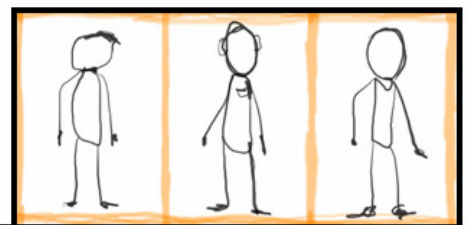
OBJETIVOS



La infección por VIH-1 y la progresión a sida pueden ser estudiadas desde la perspectiva de una patología compleja que afecta al sistema inmunológico y en la que influyen factores ambientales y factores propios de cada paciente. El estudio y conocimiento de los factores genéticos que afectan a la respuesta inmune frente a la infección por VIH-1 y al ritmo de progresión a sida es fundamental para combatir la enfermedad.

Esta tesis propone evaluar el papel de variantes del gen *VDR*, relacionado con la respuesta inmune, y del gen *CCR5*, que codifica para el correceptor del virus VIH-1, en la susceptibilidad a la infección por VIH-1 y el ritmo de progresión a sida. Por este motivo los objetivos de esta tesis son:

- 1.- Caracterización de variantes polimórficas y estructura de desequilibrio de ligamiento de la región genómica en la que se localiza el gen *VDR*, en las distintas poblaciones de estudio.
- 2.- Estudio de los haplotipos del gen *VDR* y su asociación con la vulnerabilidad a la infección por VIH-1.
- 3.- Estudio de los haplotipos de los genes *VDR* y *CCR5* y su asociación con el ritmo de progresión a sida.
- 4.- Estudio de los efectos fenotípicos de los haplotipos del gen *VDR* en la expresión del receptor CCR5 y su ligado natural RANTES y en el balance Th1/Th2 en pacientes VIH+ ADVP y controles sanos.



MATERIALES Y MÉTODOS



1.- Test de seropositividad en sangre.

Los tests de seropositividad fueron realizados mediante detección de anticuerpos contra VIH-1 en suero y fueron confirmados posteriormente mediante ensayo por *Western-blotting*.

2.- Extracción de ADN.

Una vez tomadas las muestras biológicas de los pacientes incluidos en las cohortes de estudio se realizó una extracción de ADN con el fin de determinar los genotipos para los polimorfismos seleccionados en los estudios que fueron llevados a cabo. Los métodos de aislamiento del material genético fueron llevados a cabo mediante el uso de dos técnicas según la procedencia de la muestra biológica.

2.1.- Extracción de ADN a partir de sangre periférica.

A partir de muestras de sangre por centrifugación se aisló el *buffy coat* que contiene las células nucleadas de la sangre. Posteriormente se realizó la extracción de ADN con la ayuda del kit de extracción *MaterPure Genomic DNA Purification Kit* (Epicentre, Cat. No. MG71100 Madison , Wisconsin).

2.2.- Extracción de ADN a partir de saliva.

A partir de muestras de saliva se aisló ADN con ayuda del kit de *extracción BucalAmp Extraction Kit* (Epicentre, Cat.No.BQ0901S, Madison , Wisconsin)(Richards, Skoletsky et al. 1993).

3.- Amplificación de fragmentos de ADN y determinación de polimorfismos.

Una vez obtenido el material genético de los individuos incluidos en el estudio, procedimos a la amplificación de los fragmentos de DNA para el genotipado de los polimorfismos de interés mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polimerase chain reaction*).

El diseño de los *primers* fue realizado con ayuda de la herramienta web Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000).

Los *primers* utilizados para la amplificación de los fragmentos de interés así como los métodos de genotipado se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6.- Métodos de genotipado.

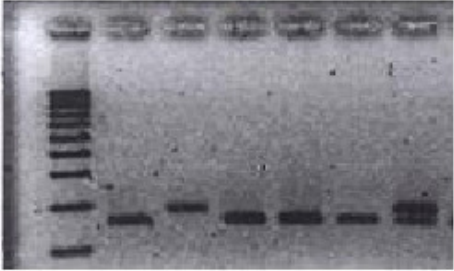
SNP ^a (alias)	Secuencia de los oligos (5'-3')	Tamaño (bp)	Tm (°C)	Protocolo de amplificación	Técnica de genotipado
RFLP rs4516035 (A1012G)	Forward: CCTCCTCTGTAAGAGGCGAATAGCGAT Reverse: GGACAGGTGAAAAGATGGGGTTC rs 4516035 (A1012G)	178	61	45 sec 94°C 45 sec 61°C 45 sec 72°C x40 ciclos	Los fragmentos amplificados eran incubados 4h a 37°C en presencia de 10 unid. de ECORV (Takara Bio Inc. Otsu, Shiga, Japan). Los fragmentos dirigidos eran resueltos en un gel 3.5% de agarosa. La secuencia del oligo <i>forward</i> fue modificada para introducir una diana de restricción para EcoRV (subrayado).
	<p>Mw</p>  <p>TT CC TT TT TT CT</p>				

Tabla 6 (continuación).- Métodos de genotipado.

SNP ^a (alias)	Secuencia de los oligos (5'-3')	Tamaño (bp)	Tm (°C)	Protocolo de amplificación	Técnica de genotipado
Análisis de fragmentos					
rs17878969 (Poly A)	Forward: CAGTTTGGGAGGTCGAGGTA Reverse: FAM-CCTGGGTCAATTCTTCTGC	184-190	63	30 sec 94°C 30 sec 60°C 30 sec 72°C x40 ciclos	Los fragmentos amplificados fueron resueltos por electroforesis capilar en un ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los fragmentos pueden ser resueltos en un gel de agarosa al 3,5% a 4°C durante 240 min. a 120V.
	rs17878969 (polyA)				

Tabla 6 (continuación).- Métodos de genotipado.

SNP ^a (alias)	Secuencia de los oligos (5'-3')	Tamaño (bp)	Tm (°C)	Protocolo de amplificación	Técnica de genotipado
Análisis de fragmentos					
rs333 (CCR5-Δ32)	Forward: TTTAAAGCCAGGACGGTCAC Reverse: GACCAGCCCCAAGATGACTA	204 172	65	60 sec 94°C 60 sec 65°C 60 sec 72°C x35 ciclos	Los fragmentos amplificados fueron resueltos en un gel de agarosa al 3% a temperatura ambiente durante 90 minutos a 120V.
rs333 (Δ32)					
Mw					
wtΔ32 wtΔ32 wtwt wtwt Δ32Δ32					

Tabla 6 (continuación).- Métodos de genotipado.

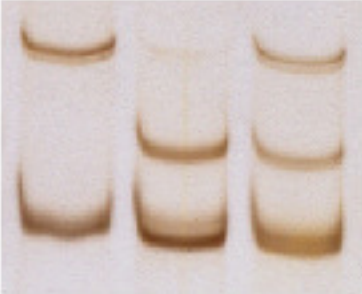

SNP ^a (alias)	Secuencia de los oligos (5'-3')	Tamaño (bp)	T _m (°C)	Protocolo de amplificación	Técnica de genotipado
SSCP					
rs1544410 (<i>Bsm I</i>)	Forward: AGTGTGCAGGCGATTCGTAG Reverse: ATAGGCAGAACCATCTCTCAG	192	65	45 sec 94°C 45 sec 65°C 45 sec 72°C x35 ciclos	2 µl de fragmentos amplificados mezclados con 40 µl de solución de desnaturalización (50% formamida, 0,05% SDS, 5mM EDTA) fueron incubados 10 min. a 98°C y 45 min. a 4°C. Las cadenas sencillas fueron resueltas en un gel de acrilamida no desnaturalizante al 12% a temperatura ambiente durante 240 min. a 120V. Las bandas eran detectadas mediante una tinción de plata. Los patrones observados se correlacionaban cada uno con unos de los genotipos. No se observaron patrones discordantes.
rs10735810 (<i>Fok-I</i>)	Forward: AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT Reverse: ATGGAAACACCTTGCTTCTCTCCCTC	265	65	45 sec 94°C 45 sec 65°C 45 sec 72°C x35 ciclos	
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>rs154410 (<i>Bsm_I</i>)</p>  <p>TT CC CT</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>rs10735810 (<i>Fok_I</i>)</p>  <p>AA GG GA</p> </div> </div>					

Tabla 6 (continuación).- Métodos de genotipado.

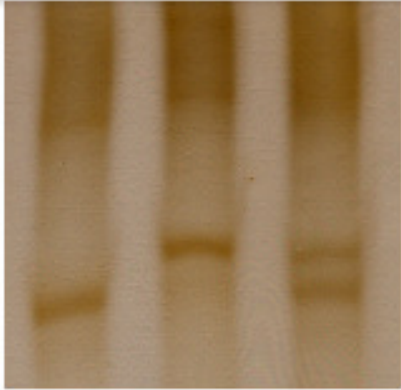
SNP ^a (alias)	Secuencia de los oligos (5'-3')	Tamaño (bp)	T _m (°C)	Protocolo de amplificación	Técnica de genotipado
SSCP					
rs1799988/ rs41469351/ rs1800023 (Promotor <i>CCR5</i>)	Forward: AGTGGGATGAGCAGAGAACA Reverse: TTCTTTTGAAGGAGGGTGGGA	180	63	45 sec 94°C 45 sec 63°C 45 sec 72°C x35 ciclos	2 µl de fragmentos amplificados mezclados con 8 µl de solución de desnaturalización (95% formamida, 0,1% bromofenol. 10mM NaOH) fueron incubados 3 min. a 95°C y 10 min. a 4°C. Las cadenas sencillas fueron resueltas en un gel de acrilamida no desnaturalizante al 12% con glicerol al 50%, a 4°C y 5W constantes 200 min. Las bandas eran detectadas mediante una tinción de plata. Los patrones observados se correlacionaban cada uno con uno de los haplotipos del promotor: P1/Px. No se observaron patrones discordantes.
rs1799988/ rs41469351/ rs1800023 (Promotor <i>CCR5</i>)					
		PxPx	P1P1	P1Px	

Tabla 6 (continuación).- Métodos de genotipado.

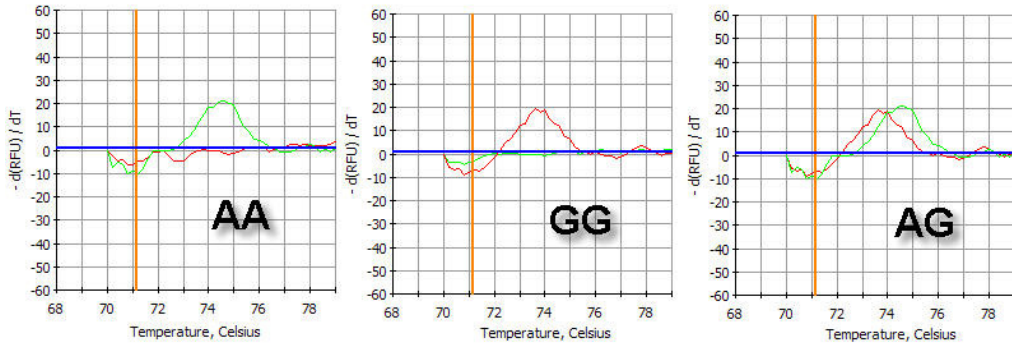
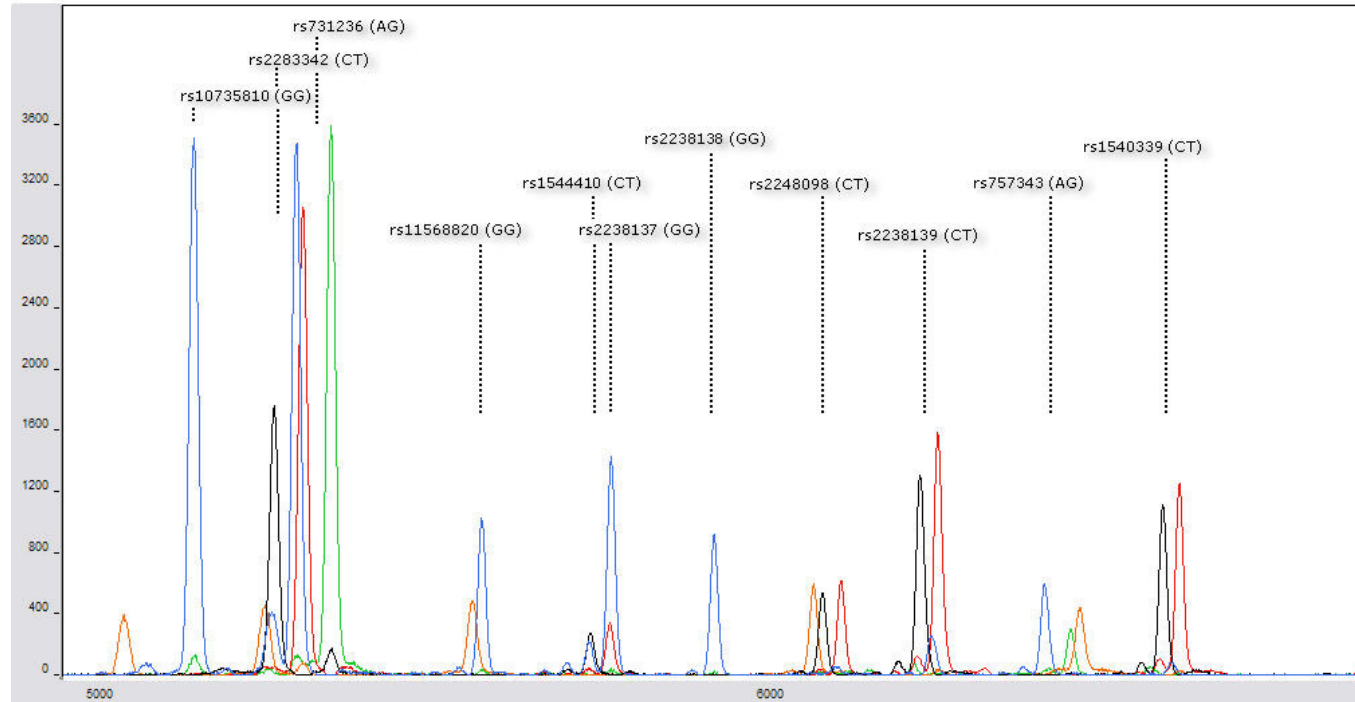
SNP ^a (alias)	Secuencia de los oligos (5'-3')	Tamaño (bp)	T _m (°C)	Protocolo de amplificación	Técnica de genotipado
Miss-match					
rs11568820 (Cdx)	Primer común: AACATCTTTTGTTCAGGAAGCTT G primer específico: CCCATAATAAGAAATAAGTTTT <u>A</u> AC A primer específico: CCCATAATAAGAAATAAGTTTT <u>A</u> AT	76	57	45 sec 94°C 45 sec 57°C 45 sec 72°C x35 ciclos	Los <i>primers</i> específicos de alelo incorporan un <i>miss-match</i> en el antepenúltimo nucleótido (subrayado) que garantiza la amplificación específica de alelo. Los fragmentos amplificados eran incubados con SYBR Green (dilución 10 ⁻⁵) en un rango de temperatura comprendido entre 100°C y 65°C. Las curvas de <i>melting</i> eran seguidas en un sistema iCycler BioRad (BioRad, Hercules, CA, USA).
					

Tabla 6 (continuación).- Métodos de genotipado.

SNP ^a (alias)	Secuencia de los oligos (5'-3')	Tamaño (bp)	Tm (°C)	Protocolo de amplificación	Técnica de genotipado
SNaPshot					
rs10735810 (<i>Fok-I</i>)	Forward: AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT Reverse: ATGGAACACCTTGCTTCTCCCTC SNaPshot: TGCTGGCCGCCATTGCCTCC	265	65	45 sec 94°C 45 sec 65°C 45 sec 72°C x35 ciclos	Los genotipados fueron realizados mediante la técnica de <i>SNaPshot</i> .
rs2283342 (D4)	Forward: AATGAACGGCACAGACATGA Reverse: AGGAAGGGAAAGGATGAGGA SNaPshot: AGATGTATGTCTTTTCCCTGG	265	63	45 sec 94°C 45 sec 63°C 45 sec 72°C x35 ciclos	Los fragmentos de PCR se mezclaron formando un pool de fragmentos de PCR. 3 µl del pool de PCR eran mezclados con 5 µl de <i>SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix</i> (<i>ABI PRISM® SNaPshot® Multiplex Kit, Applied Biosystems</i> . Ref. 4323161), 1 µl del pool de oligos de <i>SNaPshot</i> y con 1 µl de agua desionizada. La reacción de <i>SNaPshot</i> era incubada en un termociclador siguiendo un programa de 25 repeticiones del ciclo: 96°C 10seg, 50°C 5seg, 60°C 30seg
rs731236 (<i>Taq-I</i>)	Forward: TCGGCTAGCTTCTGGATCAT Reverse: CTGCCGTTGAGTGTCTGTGT SNaPshot: (T) ₈ CAGGACGCCGCTGAT	186	63	45 sec 94°C 45 sec 63°C 45 sec 72°C x35 ciclos	Posteriormente, la mezcla era incubada con 1 unidad de SAP (fosfatasa alcalina de crustáceo) a 37°C durante 60 minutos, seguido de un paso de inactivación del enzima a 75°C durante 15 minutos.
rs11568820 (<i>Cdx</i>)	Forward: TAGAAAACATTGTAGAATC Reverse: AGCTGTAGCAATGAAAGCAAACC SNaPshot: (T) ₁₃ ATCCTGAGTAAACTAGGTCACA	158	55	45 sec 94°C 45 sec 55°C 45 sec 72°C x35 ciclos	0,5 µl de la reacción de <i>SNaPshot</i> eran finalmente mezclados con 9 µl de Hi-Di Formamida y 0,5 µl de marcador (<i>GeneScan™-120 LIZ™ Size Standard, Applied Biosystems</i> , Ref. 4324287).
rs1544410 (<i>Bsm-I</i>)	Forward: AGTGTGCAGGCGATTCGTAG Reverse: ATAGGCAGAACCATCTCTCAG SNaPshot: AGAGCAGAGCCTGAGTATTGGAATG(T) ₁₂	180	63	45 sec 94°C 45 sec 63°C 45 sec 72°C x35 ciclos	Esta mezcla era procesada en un secuenciador <i>ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer</i> (<i>Applied Biosystems</i> , Ref. 3100-AVANT).
rs2238137 (B1)	Forward: TTTCAGGTGCACAACCTCGAT Reverse: CGATTCTCATGCCAGAGACC SNaPshot: (T) ₁₆ CTAGTTCCTGTATCCTGAGCAGAC	355	64	45 sec 94°C 45 sec 64°C 45 sec 72°C x35 ciclos	
rs2238138 (B2)	Forward: TTTCAGGTGCACAACCTCGAT Reverse: CGATTCTCATGCCAGAGACC SNaPshot: (T) ₂₇ ACGTTGCATAACCCAGGC	355	64	45 sec 94°C 45 sec 64°C 45 sec 72°C x35 ciclos	
rs2248098 (E)	Forward: TGGGTGTCAATGTGTGTGG Reverse: TGGACACAGCCTCTGTTCTG SNaPshot: (T) ₃₀ GGCAATCAAGAAATGCTTCA	265	64	45 sec 94°C 45 sec 64°C 45 sec 72°C x35 ciclos	
rs2238139 (D1)	Forward: AATGAACGGCACAGACATGA Reverse: AGGAAGGGAAAGGATGAGGA SNaPshot: (T) ₃₀ GAAATTCTCACAACACTCCCTAAAT	265	63	45 sec 94°C 45 sec 63°C 45 sec 72°C x35 ciclos	

Tabla 6 (continuación).- Métodos de genotipado.

SNP ^a (alias)	Secuencia de los oligos (5'-3')	Tamaño (bp)	T _m (°C)	Protocolo de amplificación	Técnica de genotipado
SNaPshot					
rs757343 (Tru9)	Forward: CTTCTCTTCGGCCTTTTCT Reverse: AGTGTGCAGGCGATTCGTAG SNaPshot: (T) ₄₅ ACCAGCGGAAGAGGT	265	65	45 sec 94°C 45 sec 65°C 45 sec 72°C x35 ciclos	
rs1540339 (C3)	Forward: GGGTCTGAGGAATCGGAGT Reverse: GCTTTGCAGAGGCTGTCTTC SNaPshot : (T) ₄₈ GTTGGTGCCACCTAA	600	65	45 sec 94°C 45 sec 65°C 45 sec 72°C x35 ciclos	



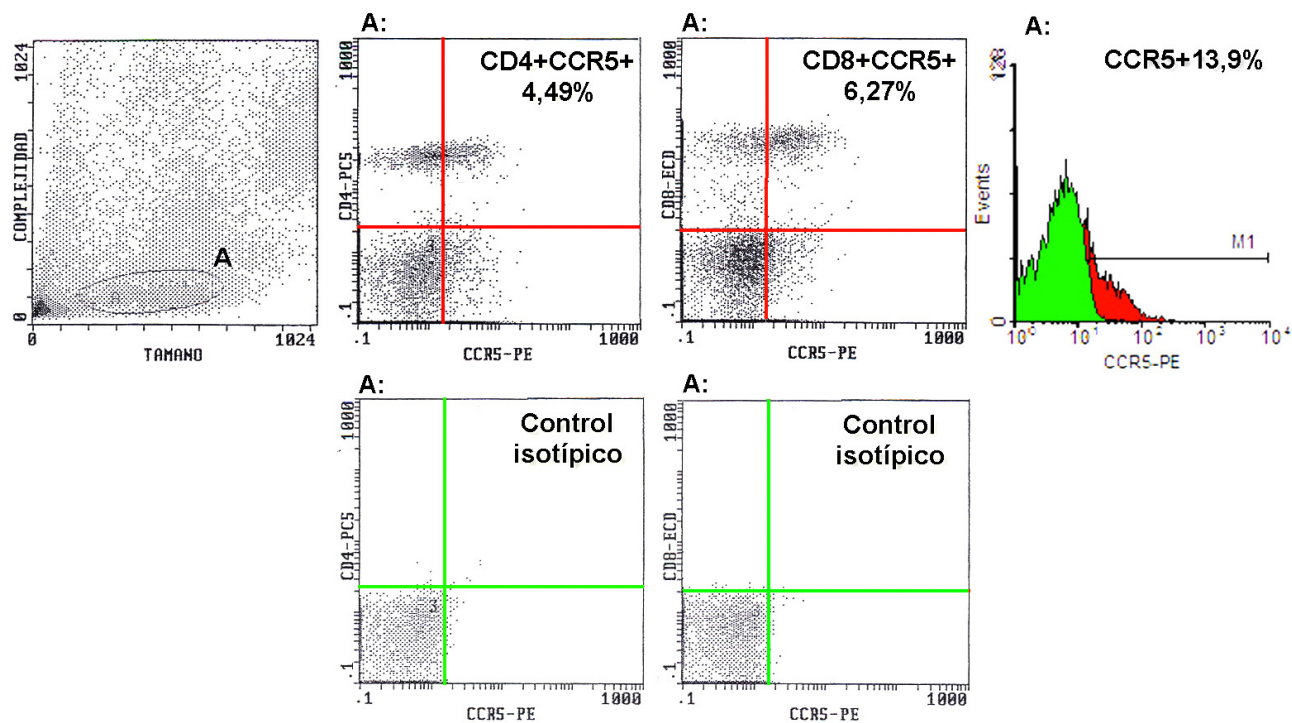


4.- Inmunofenotipado.

Muestras de sangre de pacientes VIH-1-1 positivos con distinto genotipo para el rs1544410 (*Bsm-I*) y con genotipo *wtwt* para el rs333 ($\Delta 32$) fueron recogidas y procesadas para su posterior caracterización inmunofenotípica. Se utilizaron los marcadores CD4-PC5, CD8-ECD y CCR5-PE con sus correspondientes controles isotópicos IgG1-PC5, IgG1-ECD, IgG2a-PE (Tabla 7) Una vez recogida la muestra de sangre periférica se procesaba en un intervalo de tiempo inferior a 4 horas para garantizar la estabilidad del receptor CCR5 (Shalekoff and Tiemessen 2001). Mediante el uso del kit de preparación de muestras de sangre total para lectura en citómetro de flujo *ImmunoPrep Reagent System Whole Blood Lysing Reagents* (Beckman Coulter. Ref. 7546946)(Caldwell and Taylor 1986) las muestras eran procesadas y posteriormente marcadas con los anticuerpos de interés. Una vez fijadas eran leídas en un citómetro de flujo Beckman Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Ref. 6605464).

Tabla 7: Inmunofenotipado

Anticuerpo	Inmunoglobulina	Clon	Fluorocromo	Proveedor	Referencias
CD4	IgG1	13B8.2	PC5	Beckman Coulter (Ref. A07752)	(Fauci 1988; Vaickus, Ball et al. 1991)
CD8	IgG1	SFC121ThyD3	ECD	Beckman Coulter (Ref. 6604728)	(Morimoto, Letvin et al. 1985; Morimoto, Letvin et al. 1986)
CCR5	IgG2a	2D7/CCR5	PE	BD Pharmingen (Ref. 555993)	(Choe, Farzan et al. 1996; Raport, Gosling et al. 1996)
Control isotípico IgG1	IgG1	679.1Mc7	PC5	Beckman Coulter (Ref. A07798)	(Stewart and Stewart 1994)
Control isotópico IgG2a	IgG2a	7T4-1F5	ECD	Beckman Coulter (Ref. A07797)	(Stewart and Stewart 1994)
			PE	Beckman Coulter (Ref. A09142)	(Stewart and Stewart 1994)





5.- Análisis estadístico de los datos.

Con el fin de clasificar, representar y resumir los datos obtenidos y finalmente realizar inferencias, se utilizó un amplio conjunto de métodos de análisis.

5.1.- Estadística descriptiva.

Mediante el uso de distintas herramientas de estadística descriptiva se analizó el conjunto de datos obtenidos durante el periodo experimental. Con ayuda del software de análisis estadístico SPSS (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois) se calcularon los parámetros básicos descriptivos como las medidas de posición (media, mediana) medidas de dispersión (varianza, desviación típica), histogramas y cálculo de intervalos de confianza.

5.2.- Tests no paramétricos.

Nos decantamos por la realización de test no paramétricos por el hecho de que, en el caso de que los datos siguieran una distribución normal, a pesar de que los métodos no paramétricos son ligeramente inferiores a los paramétricos, el precio no es excesivo por la ventaja de poder utilizar siempre los métodos no paramétricos sin necesidad de dedicar tiempo a la verificación de la normalidad de variables.

5.2.1.- Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg.

El equilibrio Hardy-Weinberg fue testado mediante la comparación de las frecuencias genotípicas esperadas y observadas utilizando la distribución *chi*-cuadrado con un grado de libertad para alelos y dos grados de libertad para genotipos.



5.2.2.- Estudio caso control. Análisis de haplotipos y estudio de asociación.

Para la realización de un estudio de asociación se planteó un diseño de estudio caso-control ya que éste es el estudio epidemiológico más ampliamente utilizado en este tipo de estudios.

A partir de los datos obtenidos del genotipo de cada individuo de las poblaciones estudiadas se llevó a cabo un análisis de los datos para la estima de haplotipos y sus frecuencias y para los estudios de asociación. Mediante Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Barrett, Fry et al. 2005) fueron realizadas las inferencias de haplotipos a partir de los genotipos obtenidos.

La estima de diplotipos para cada individuo se realizó a partir de los haplotipos inferidos mediante el uso del software PHASE (<http://depts.washington.edu/ventures/>

[UW_Technology/Express_Licenses/PHASEv2.php](http://depts.washington.edu/ventures/UW_Technology/Express_Licenses/PHASEv2.php)) (Stephens, Smith et al. 2001) PHASE realiza una inferencias de haplotipos siguiendo un sistema aproximación Bayesiano que incorpora una información inicial observada que servirá como guía para realizar las estimas de haplotipos no observados previamente en la población. Utilizamos el archivo "out_pair" de PHASE que contiene la asignación de pares de haplotipos (diplotipos) para cada individuo con su probabilidad correspondiente.

Mediante el software SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>) (Sole, Guino et al. 2006) se realizó la comparación en la distribución de genotipos en las poblaciones analizadas asumiendo un diseño caso-control. Además mediante SNPstats se realizó un test de asociación entre los genotipos y la respuesta a una variable asumiendo cuatro modelos genéticos: i) modelos codominante, que compara todos los pares de genotipos, ii) el modelo dominante, que compara los homocigotos del alelo común con los heterocigotos más los homocigotos del alelo poco frecuente, iii) el modelo recesivo que compara los alelos poco frecuente con los heterocigotos más los homocigotos del alelo frecuente y iv) el modelo aditivo.

Los estudios caso-control se aplican con el fin de determinar los factores que pueden estar contribuyendo en la aparición de una determinada manifestación



fenotípica, mediante la comparación de un grupo de individuos portadores de dicha manifestación (grupo de casos) y un grupo de no portadores (grupo de controles).

En los estudios que llevamos a cabo se aplicó un modelo de regresión logística ya que la metodología de la regresión lineal no es aplicable debido a que la variable respuesta es de tipo dicotómica. La regresión logística se aplica en casos en los que las variables sigan una distribución binomial. Es por esto que en un estudio de asociación este tipo de análisis es uno de los más acertados y utilizados.

Por otra parte, una de las características que hacen tan interesante la regresión logística es la relación que guarda con un parámetro de cuantificación de riesgo conocido en la literatura como odds ratio.

Para la realización de pruebas de comparación de dos muestras (diferencias en las frecuencias, estima de proporciones y odds ratios) se hizo uso del programa Compare2 (v.1.45) que forma parte del paquete estadístico PEPI-for-Windows (WinPEPI) (<http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>) (Abramson 2004).

5.2.3.- Análisis de supervivencia.

El análisis de supervivencia abarca un conjunto de técnicas y procedimientos estadísticos mediante los cuales se evalúa el comportamiento de una variable respuesta que mide el tiempo transcurrido para que tenga lugar un evento determinado. El intervalo de tiempo viene definido por una fecha de inicio y una fecha de cierre que determinan el tiempo total de seguimiento. Las fechas de inicio y cierre son diferentes para cada individuo, pues los pacientes o personas incluidas en el estudio se pueden incorporar en momentos diferentes. En nuestro caso el seguimiento de cada paciente se estableció desde la fecha del primer test seropositivo para VIH-1 hasta la consecución del evento (sida), abandono del estudio o fecha final del mismo (febrero de 2005).

En determinadas circunstancias puede darse censura en los datos, entendida como aquella situación en la que los datos obtenidos sobre el tiempo de supervivencia de un individuo son incompletos. Así por ejemplo, todos los individuos que al final del estudio no han desarrollado el evento estudiado (sida en nuestro caso) contribuyen



de forma parcial a la información sobre el suceso. También, los individuos que abandonan el estudio sin haber desarrollado el evento (en nuestro caso suele ser una situación bastante común dadas las características socio-económicas de los enfermos VIH+ ADVP) contribuyen de forma parcial al estudio. Finalmente, puede darse una situación de censura o truncado, cuando la información parcial procede del dato sobre el momento en que se inicia el seguimiento. Dicha situación se dará en aquellos sujetos que ya habían iniciado el evento cuando dio comienzo el estudio o en aquellos que se incorporan al estudio, una vez este se ha iniciado y de los cuales no se conoce la fecha de inicio. En nuestro caso esta situación se da en los pacientes incorporados en la cohorte SERLAC (véase más adelante), dada la condición de seroprevalentes de los mismos. Se trata de una limitación importante en nuestro estudio que hemos intentado subsanar o minimizar estableciendo criterios restrictivos de inclusión de los pacientes en la cohorte (véase apartado 1 de la discusión, págs. 137-143).

La metodología estadística aplicada a los estudios de supervivencia puede incluir métodos paramétricos o no paramétricos. Los métodos estadísticos más utilizados son los no paramétricos como el test de Kaplan-Meier, que nos permite estimar la función de supervivencia, el test del logaritmo de rangos (*logrank*), que nos permite comparar las funciones de supervivencia derivadas de los distintos grupos analizados, y la regresión de Cox, que nos permite evaluar el efecto de factores o variables explicativas. Todos estos métodos están implementados en el paquete informático SPSS v14 utilizado en este trabajo para los estudios de supervivencia.



RESULTADOS



ESTUDIO DEL PATRÓN DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO Y ESTRUCTURA DE BLOQUES DE LA REGIÓN GENÓMICA DEL GEN *VDR*.

Poblaciones de estudio.

1. Población CEU: Población de residentes en Utah (EEUU), de origen del oeste y norte de Europa. La muestra esta constituida por 60 tríos de los cuales se dispone del genotipo para diferentes polimorfismos localizados en la región de interés. Los datos e información complementaria de la cohorte CEU se pueden obtener a través de <http://www.hapmap.org/genotypes/>
2. Cohorte de controles sanos: constituida por 200 individuos de origen caucásico (100 hombres y 100 mujeres) de edades comprendidas entre los 17 y 61 años que proceden de una región geográfica similar a la de los pacientes.
3. Cohorte de pacientes VIH+: cohorte de 335 varones adictos a droga por vía parenteral (ADVP) con un test seropositivo para VIH-1 (VIH-+). Todos los sujetos son de origen caucásico y nacidos en España.
4. Cohorte de controles sanos varones: cohorte constituida por 124 varones de origen caucásico formada por donantes de sangre con un test negativo para VIH-1 y hepatitis C.
5. Cohorte de expuestos no infectados (ENI): cohorte formada por 125 ADVP con un test seronegativo para VIH-1 en el momento de inclusión, que han estado expuestos al VIH-1 al haber compartido agujas hipodérmicas durante un periodo igual o superior a tres meses.
6. Cohorte SERLAC: cohorte constituida por 179 pacientes VIH+ (131 hombres y 48 mujeres) con un test positivo para VIH-1 anterior a diciembre de 1987.

Polimorfismos analizados. (Véanse las tablas 8 y 9)

Diseño del estudio.

1. Obtención de los genotipos
 - a. A partir de la base de datos de HapMap
 - b. Mediante el genotipado de las muestras disponibles
2. Análisis de los datos mediante la aplicación Haploview
 - a. Obtención de los valores de D' entre pares de SNPs
 - b. Elaboración del gráfico de desequilibrio de ligamiento
 - c. Asignación de bloques mediante el método *solid spine of LD* aplicando un valor umbral de $D' > 0.8$
3. Análisis de los datos mediante el programa GOLD
 - a. Representación gráfica de los valores de D' entre pares de SNPs
4. Análisis de los datos mediante el programa LocusView
 - a. Representación del patrón y secuencia de los haplotipos obtenidos mediante el programa Haploview

Objetivo.

Determinar la estructura de desequilibrio de ligamiento y patrón de bloques de la región genómica en la que se localiza el gen *VDR* en la población de referencia de HapMap y en las poblaciones utilizadas en este estudio. Determinar la relación de "vecindad" entre el gen *VDR* y genes próximos con el fin de evaluar la posible relación de estos con las asociaciones descritas para el gen *VDR*. Evaluar posibles diferencias y similitudes de los patrones de LD y estructura de bloques en las distintas cohortes analizadas.



1.- Patrón de desequilibrio de ligamiento de la región genómica el gen *VDR* obtenida a partir de los datos del proyecto HapMap.

A partir de los datos obtenidos de HapMap hemos analizado el patrón de desequilibrio de ligamiento (LD) de la región genómica en la que se localiza el gen *VDR*. Dicha región está comprendida entre los nucleótidos 46470000 y 46680000 del cromosoma 12 (12q13.11) (Figura 25). El análisis se realizó con un total de 43 SNPs con una frecuencia superior al 5% en la población CEU (residentes en Utah, EE.UU., con ancestros del oeste y norte de Europa) (Tabla 8). Los datos de genotipo se obtuvieron de la portal web de HapMap (<http://www.hapmap.org>). Se estimó el valor de LD (D') entre pares de SNPs mediante el programa Haploview. Los valores obtenidos de D' se representaron mediante los programas GOLD y Haploview (Figura 25B y 25D, respectivamente).

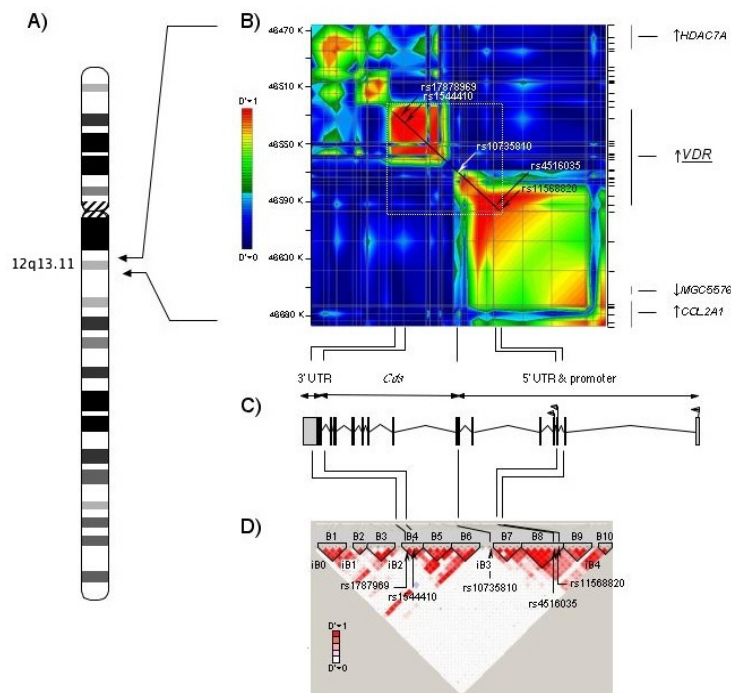


Figura 25.- Patrón de desequilibrio de ligamiento y estructura de bloques de la región cromosómica 12q13.11 (46680K-46470K) obtenida a partir de los datos procedentes de la muestra de caucasianos CEU de HapMap (residentes en UTA, EE.UU., con ancestros del oeste y norte de Europa). A; Patrón de bandas G del cromosoma 12 con la localización cromosómica 12q13.11., B; Representación de los valores de D' entre pares de SNPs mediante el software GOLD. La región punteada corresponde al gen *VDR*, C; estructura del gen *VDR*, D; Representación de los valores de D' entre pares de SNPs mediante el Software Haploview. Asignación de bloques (*solid spine of LD*; $D' > 0,8$).

Nota: La orientación del gen *VDR* en esta Figura es en dirección 3'-5' (cadena *plus* del cromosoma). En la imagen se indica la posición de los cinco marcadores seleccionados en este estudio (véase más adelante).



Tabla 8.-SNPs seleccionados del proyecto HapMap para el estudio del patrón de la región genómica del gen *VDR*.

Bloque #	códigoSNP	Posición	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	Alelos	MAF
iB0	rs3815138	46464732	0.303	0.33	0.427	98.9	G:A	0.208
B1	rs2525055	46473005	0.449	0.463	0.314	98.9	A:C	0.364
	rs11831940	46476433	0.422	0.46	0.281	100.0	G:A	0.358
	rs2544029	46481224	0.393	0.42	0.175	98.9	C:T	0.3
iB1	rs757344	46492363	0.489	0.489	1.0	100.0	A:G	0.425
B2	rs11168249	46494635	0.489	0.499	0.963	100.0	T:C	0.475
	rs7958910	46498049	0.467	0.464	1.0	100.0	A:T	0.367
B3	rs2544037	46501447	0.433	0.469	0.916	100.0	A:G	0.375
	rs1859281	46502016	0.151	0.174	0.138	95.6	C:T	0.096
	rs2544028	46502697	0.433	0.469	0.916	100.0	T:A	0.375
	rs10747524	46509741	0.544	0.498	0.453	100.0	T:C	0.467
iB2	rs11608702	46515035	0.567	0.469	0.314	100.0	A:T	0.375
B4	rs7968585	46518360	0.391	0.495	0.15	96.7	T:C	0.449
	rs1544410	46526102	0.433	0.493	0.313	100.0	G:A	0.442
	rs987849	46540943	0.4	0.486	0.087	100.0	T:C	0.417
B5	rs2239182	46541678	0.467	0.499	0.752	100.0	A:G	0.483
	rs2107301	46541837	0.456	0.406	0.443	100.0	C:T	0.283
	rs1540339	46543593	0.438	0.479	0.49	98.9	G:A	0.398
	rs2239179	46544033	0.422	0.483	0.385	100.0	A:G	0.408
B6	rs886441	46549231	0.315	0.31	0.715	98.9	T:C	0.192
	rs2189480	46550095	0.4	0.477	0.44	100.0	C:A	0.392
	rs3819545	46551273	0.437	0.479	0.78	96.7	T:C	0.397
	rs3782905	46552434	0.36	0.419	0.722	95.6	C:G	0.298
iB3	rs10735810	46559162	0.5	0.493	0.313	100.0	G:A	0.442
	rs2254210	46559981	0.378	0.469	0.079	100.0	G:A	0.375
B7	rs2238136	46563980	0.322	0.358	0.332	100.0	G:A	0.233
	rs2853564	46564754	0.489	0.489	1.0	100.0	T:C	0.425
	rs4760648	46566932	0.5	0.498	0.453	100.0	C:T	0.467
	rs2853559	46569072	0.494	0.491	1.0	98.9	C:T	0.432
B8	rs3890734	46575622	0.511	0.455	0.114	100.0	G:A	0.35
	rs3890733	46575640	0.506	0.453	0.143	98.9	C:T	0.347
	rs10783219	46581755	0.438	0.437	1.0	98.9	A:T	0.322
	rs4516035	46586093	0.5	0.495	0.988	97.8	T:C	0.448
	rs7139166	46586601	0.489	0.495	1.0	100.0	C:G	0.45
	rs11568820	46588812	0.3	0.278	0.9897	100.0	G:A	0.167
B9	rs4760670	46605880	0.407	0.416	0.621	95.6	G:A	0.295
	rs4340112	46625013	0.506	0.499	1.0	98.9	T:C	0.475
	rs2286024	46646887	0.506	0.495	0.884	98.9	T:C	0.449
	rs7307880	46647791	0.478	0.498	1.0	100.0	G:A	0.467
	rs6823	46648679	0.506	0.498	0.92	98.9	G:C	0.466
iB4	rs2071358	46652716	0.356	0.375	1.0	100.0	C:T	0.25
B10	rs1793949	46657862	0.449	0.46	1.0	98.9	C:T	0.358
	rs2276458	46661093	0.447	0.477	1.0	94.4	A:C	0.393

<http://www.hapmap.org/genotypes/>
 Población: CEU
 HapMap data release June 2005
 assembly ncbi_b34

obsHET, heterocigosidad observada; PredHET, heterocigosidad esperada;
 Hwpval, valor P de la estima de equilibrio Hardy-Weinberg valor P; %Geno, % de
 individuos genotipados; MAF, frecuencia del alelo menos frecuente

La Figura 25B muestra una representación gráfica de los valores de D' obtenidos para cada par de SNPs analizados. El gráfico se obtuvo mediante la aplicación GOLD (Abacasis et al. <http://www.sph.umich.edu/csg/abacasis/GOLD/index.html>). En el margen derecho se detalla la localización de los genes *Histone deacetylase 7A (HDAC7A)*, *Vitamin D receptor (VDR)*, secuencia codificante



MGC5576 y *Colagen 2A1 (COL2A1)*. La Figura 25C muestra un esquema detallado del gen *VDR* que incluye la estructura exón-intrón. La Figura 25D representa los valores de D' entre pares de SNPs y el patrón de bloques que se obtiene al analizar los datos mediante el programa Haploview (referencia y dirección web). La asignación de bloques se realizó mediante el método "solid spine" considerando un valor umbral de $D' > 0.8$. Se observaron un total de 10 regiones con estructura de bloque (B1 a B10) separadas por cinco regiones "interbloque" (iB0 a iB4) (véase también Tabla 8).

La zona punteada en la Figura 25B señala la región correspondiente al gen *VDR*. En dicha zona se observan dos regiones con valores altos de D' y baja frecuencia de recombinación (que comprenden los bloques B4 a B6 y B7 a B8) separadas por una región de valores bajos de D' y alta frecuencia de recombinación (iB3), que se define por tanto como un *hot spot* de recombinación.

A partir de este análisis se puede concluir que la región genómica del *VDR* se caracteriza por un patrón de bloques disperso localizados en los dos extremos del gen (región promotora y 3'UTR) y una región central, que incluye la región codificante (*cds*), con bajo desequilibrio de ligamiento. Así mismo, el patrón de bloques observado indica que las variantes localizadas en el gen *VDR* se heredan de forma independiente a las variaciones localizadas en los genes vecinos (*HDAC7* y *COL2A1*). Ello permite afirmar que las asociaciones detectadas con variantes del gen *VDR* son específicas de dicho gen y no pueden ser explicadas por variaciones en los genes próximos.

2.- Patrón de LD y estructura de bloques del gen *VDR* en la cohorte de controles sanos de origen caucásico.

Con el objeto de definir la estructura de ligamiento de la región genómica del gen *VDR* en la cohorte de controles sanos utilizada en este estudio (200 individuos: 100 hombres y 100 mujeres), se llevó a cabo el genotipado, mediante la técnica de SnaPshot, de 11 marcadores polimórficos localizados en el gen *VDR* (Tabla 9).

Tabla 9. Polimorfismos del gen *VDR* genotipados en la cohorte de controles sanos, mediante SNaPshot .

Bloque/Interbloque #	Código SNP	Posición	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	Alelos	MAF
Bloque 1	rs17878969	46522674	0.368	0.361	0.9936	95.0	L:S	0.237
	rs731236	46525024	0.518	0.471	0.224	99.5	A:G	0.379
	rs1544410	46526102	0.503	0.465	0.3338	99.5	G:A	0.367
Interbloque 2	rs2248098	46539623	0.5	0.452	0.1873	100.0	G:A	0.345
Bloque 2	rs2283342	46542126	0.175	0.2	0.1636	100.0	A:G	0.112
	rs1540339	46543593	0.452	0.457	0.9726	98.5	C:T	0.353
Interbloque 2	rs2238137	46550818	0.26	0.255	1.0	100.0	C:T	0.15
	rs10735810	46559162	0.49	0.5	0.8639	100.0	G:A	0.49
	rs1989969	46564277	0.455	0.481	0.5129	100.0	G:A	0.402
Bloque 3	rs4516035	46586093	0.485	0.47	0.7924	100.0	T:C	0.378
	rs11568820	46588812	0.455	0.468	0.768	99.0	C:T	0.374

En la Figura 26 se recogen los resultados obtenidos. La región analizada se corresponde con la zona punteada en la Figura 25B). En la Figura 26B se representan los valores de D' de para cada par de SNPs, mediante el software GOLD. La Figura 25C se presenta la estructura de bloques de dicha región, así como los haplotipos correspondientes a cada bloque, realizado mediante el programa LocusView. Finalmente, en la Figura 25D se presenta la estructura de bloques según se obtiene a partir del análisis de los datos por el software Haploview.

Se observan tres grupos de marcadores que constituyen sendas regiones en bloque ($D' > 0.8$), separados por marcadores que presentan alta recombinación con los bloques adyacentes. El bloque 1, que corresponde a la región 3'UTR del gen, está definido por los marcadores (rs17878969, rs731236, rs1544410) y en él se observan dos haplotipos mayoritarios (LTG y SCA) con una frecuencia de 0.56 y 0.34, respectivamente.

El bloque 2 está definido por los marcadores (rs2283342, rs1540339) y en él se observan tres haplotipos (TC, TT y CT) con frecuencias de 0.63, 0.22 y 0.14, respectivamente. Por último el bloque 3, que corresponde a la región 5'UTR del gen, está definido por los marcadores (rs4516035, rs11568820) y en él se observan 3 haplotipos (AG, GG y AA) con frecuencias de 0.4, 0.37 y 0.22, respectivamente.

El patrón obtenido en la muestra de controles sanos es similar al observado en el análisis de la muestra CEU de HapMap. Los bloques *B4-B6* de HapMap (Figura 25D) se corresponden con los bloques *block 1* y *block 2* en controles sanos (Figura 26D). El bloque *B8* de HapMap (Figura 25D) se corresponde con el *block 3* de controles sanos (Figura 26D). Finalmente, la región de bajo LD y alta



recombinación se observa de forma paralela en el análisis de HapMap (región *iB3*, Figura 25D) y en análisis de controles sanos (región entre los bloques *block 2* y *block 3* de la Figura 26D).

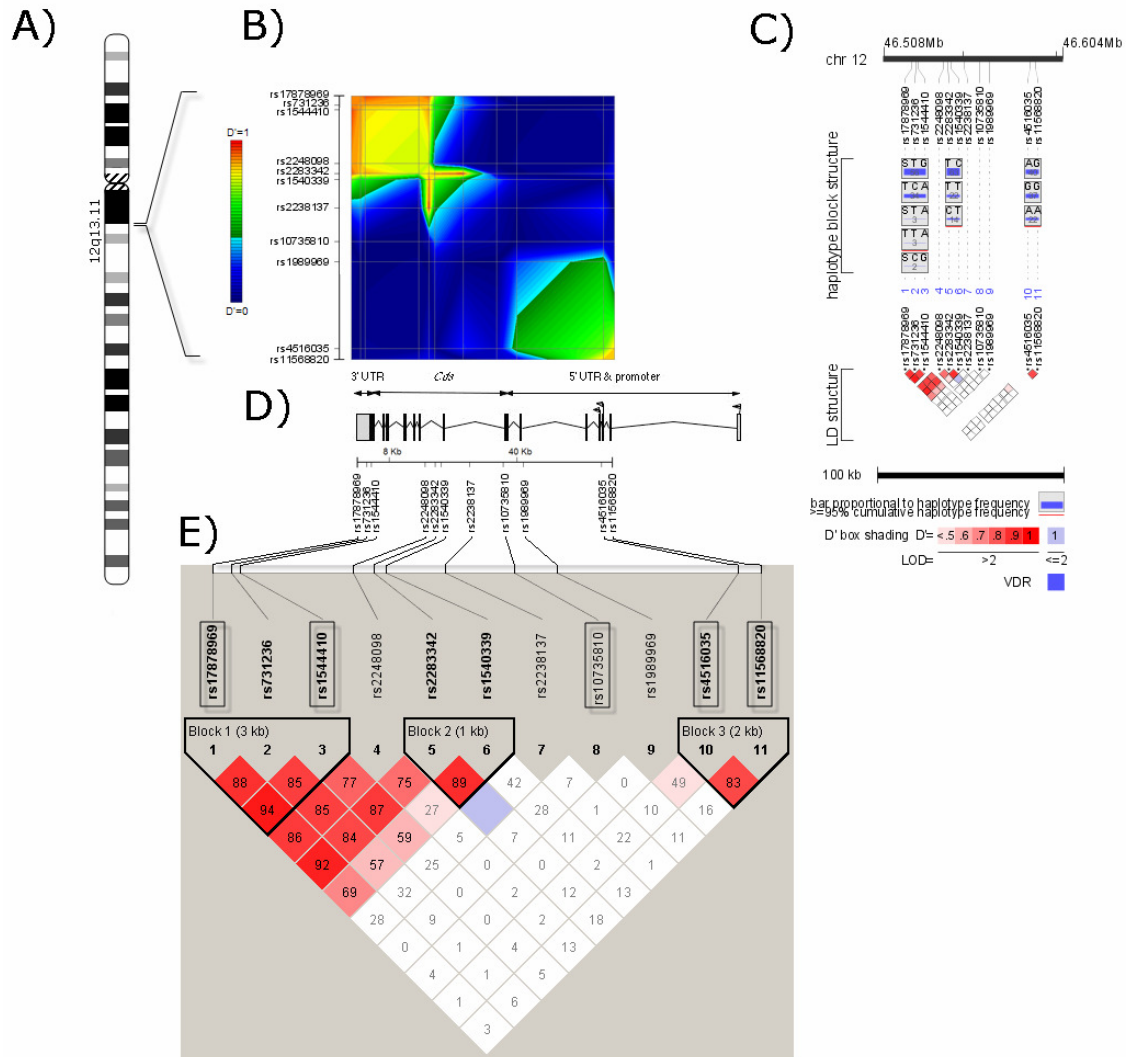


Figura 26.- Estructura de desequilibrio de ligamiento del gen *VDR* en la cohorte de 200 individuos de origen caucásico utilizada como controles sanos en el estudio. El patrón se ha obtenido a partir del genotipado de 11 marcadores polimórficos localizados en distintas posiciones del gen (véase también Tabla 9). A; Patrón de bandas G del cromosoma 12 donde se indica la localización cromosómica 12q13.11. B; representación de los valores de D' para cada pareja de marcadores generada por el software GOLD. C; Representación mediante el software LocusView de la estructura de bloques de la región del gen *VDR* en la que se detallan los haplotipos más frecuentes inferidos mediante Haploview. D; Representación gráfica del gen *VDR*. E; estructura de bloques generada por el software Haploview (definición de bloque mediante *solid spine of LD*; valor umbral $D' > 0,8$).

Nota: La orientación del gen *VDR* en esta Figura es en dirección 3'-5' (cadena *plus* del cromosoma). Los polimorfismos seleccionados para los estudios de asociación están destacados dentro de un marco.



3.- Patrón de LD y estructura de bloques del gen *VDR* en las cohortes analizadas, obtenida a partir de los cinco polimorfismos seleccionados.

Los estudios de asociación que se presentaran en secciones sucesivas de este trabajo, se han realizado a partir del genotipado de cinco polimorfismos localizados en distintas regiones del gen *VDR*. Dichos polimorfismos se han seleccionado en función de su posición: i) región promotora-5'UTR; polimorfismos rs11568820 (*Cdx*) y rs4516035 (*A1012G*); ii) región 3'UTR: polimorfismos rs1544410 (*Bsm-I*) y rs17878969 (*PolyA*) y iii) región codificante (*cds*): polimorfismo rs10735810 (*Fok-I*). Estos cinco polimorfismos permiten capturar gran parte de la variabilidad del gen *VDR*.

La Figura 27 muestra el patrón de LD y la estructura de bloques que se derivan del análisis de estos cinco polimorfismos en las diferentes cohortes utilizadas en los estudios de asociación: controles sanos del estudio de progresión (selección de 200 individuos y selección de 124 hombres), controles sanos del estudio de infección (124 hombres), cohorte VIH+ del estudio de infección (335 hombres), cohorte ENI del estudio de infección (125 hombres) y cohorte SERLAC del estudio de progresión (131 hombres y 48 mujeres).

El patrón obtenido reproduce, en líneas generales, el previamente observado en la muestra CEU de HapMap y el derivado del genotipado de 11 SNPs en la cohorte de controles sanos. Se detectó estructura de bloque ($D' > 0,8$) entre los marcadores de la región 3'UTR en las cinco poblaciones del estudio (Figura 26D-2H). En todas las cohortes analizadas el polimorfismo rs10735810 (*Fok-I*) del exón 2 se distribuyó de forma independiente a los polimorfismos de la región 5'UTR y 3'UTR. Cabe destacar la ausencia de estructura de bloque en la región promotora-5'UTR de la cohorte ENI (Figura 26F), mientras que esta sí que aparece en las demás cohortes, así como en cohortes de estudios de otros autores (Ingles, Haile et al. 1997; Fang, van Meurs et al. 2005).

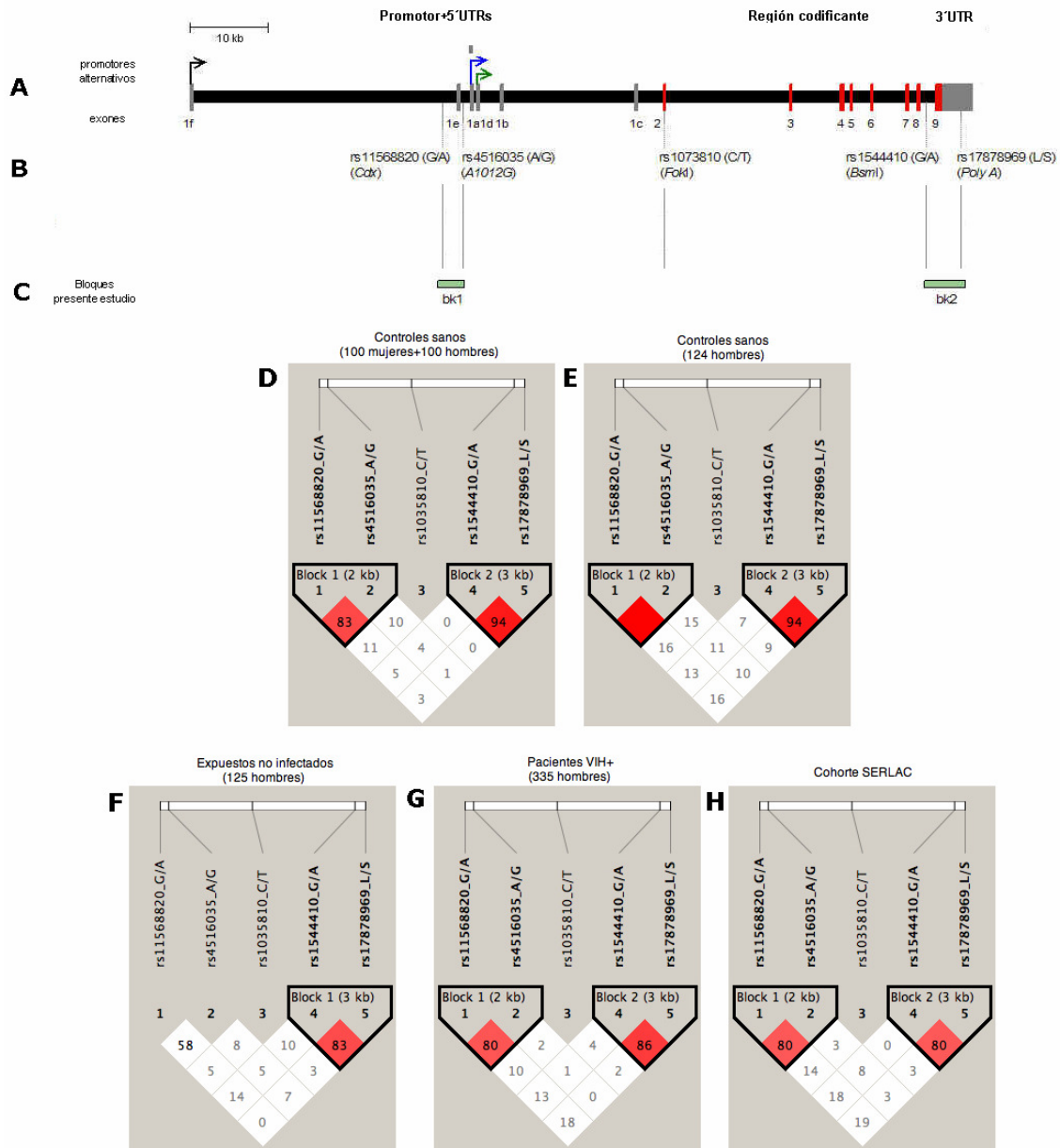


Figura 27. Estructura genómica del gen *VDR* y mapa de LD de los marcadores seleccionados en las poblaciones analizadas. A; Estructura del gen *VDR*, exones y promotores alternativos. B; Polimorfismos seleccionados en el estudio. Se especifica su posición a escala. C; Bloques observados en las cohortes (D a H) según el programa Haploview (*solid spine*; $D' > 0.8$); bk1; bloque 1; bk2; bloque 2. D a H; patrón de LD y estructura de bloques obtenida mediante los 5 marcadores seleccionados en: D, cohorte total de controles (100 hombres+100 mujeres); E, controles sanos del estudio de infección (124 hombres); F, cohorte de expuestos no infectados del estudio de infección; (125 hombres); G, pacientes VIH+ del estudio de infección (335 hombres) y H; cohorte SERLAC (*Seroprevalent Lleida AIDS cohort*) del estudio de progresión. (131 hombres y 48 mujeres).

Nota: La orientación del gen en esta Figura es 5' -> 3' (sentido de codificación del gen *VDR*)



4.- Características funcionales de los polimorfismos seleccionados.-

Los polimorfismos seleccionados para el estudio de caracterización de la estructura de bloque del gen *VDR* en las distintas poblaciones analizadas se seleccionaron en función de su posición, efecto funcional y asociación con enfermedades humanas.

La Tabla 10 muestra las principales características de los cinco polimorfismos seleccionados.

Tabla 10.- Características principales de los polimorfismos seleccionados.

Polimorfismo	Posición	Efecto asociado	Posición cromosómica	Asociación descrita con patologías humanas
rs11568820 (Cdx)	5'UTR	Capacidad transactivadora de CDX-2	46588812	Osteoporosis
rs4516035 (A1012G)	5'UTR	Capacidad transactivadora de GATA-3	46586093	Psoriasis
rs10735810 (Fok-I)	región codificante	Alteración del sitio de iniciación de transcripción	46559162	Osteoporosis Cáncer Diabetes Psoriasis Esclerosis múltiple Enfermedad de Graves Tuberculosis VIH y sida Hepatitis B
rs1544410 (Bsm-I)	3'UTR	Estabilidad del ARNm	46526102	Osteoporosis Cáncer Diabetes Psoriasis Esclerosis múltiple Tuberculosis VIH y sida
rs17878969 (Poly-A)	3'UTR	Traslocación del ARNm	46522674	Cáncer Osteoporosis



VARIABILIDAD DEL GEN *VDR* Y VULNERABILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIH-1.

Población de estudio.

La población de estudio está formada por 460 hombres de origen caucásico adictos a droga por vía parenteral (ADVP) (Tabla 11). De dicho grupo se diferencian dos subgrupos; una cohorte de 335 ADVP con un test seropositivo para VIH-1 (VIH+) y una segunda cohorte formada por 125 ADVP con un test seronegativo para VIH en el momento de inclusión, que han estado expuestos al VIH-1 al haber compartido agujas hipodérmicas durante un periodo igual o superior a tres meses (grupo de expuestos no infectados, ENI). Por último se ha incluido en el estudio una población control de referencia, formada por 124 hombres de origen caucásico que proceden del grupo de donantes de sangre con un test negativo para VIH-1 y hepatitis C. Las características epidemiológicas de dichas cohortes se detallan en la Tabla 11.

Este estudio fue aprobado por el comité ético de los hospitales de procedencia de las muestras (Hospital Arnau de Vilanova de Lleida y Hospital Valme de Sevilla). Todos los participantes del estudio firmaron un documento de consentimiento informado.

Loci y polimorfismos analizados.

Locus <i>VDR</i>	
	Región promotora: rs11568820 (<i>Cdx</i>) y rs4516035 (<i>A1012G</i>)
	Exón 2: rs10735810 (<i>Fok-I</i>)
	Región 3'UTR: rs1544410 (<i>Bsm-I</i>) y rs17878969 (<i>PolyA</i>)
Locus <i>CCR5</i>	
	Exón 3: rs333 ($\Delta 32$)

Hipótesis: Si la variabilidad del *locus VDR* esta relacionada con la vulnerabilidad a la infección por VIH-1 podemos esperar que las variantes que confieren protección sean más frecuentes en el grupo de sujetos seronegativos que han estado expuestos de forma prolongada al virus (ENI). Por el contrario las variantes que confieren riesgo de infección deberían ser más frecuentes en los sujetos que tras una exposición al virus se han infectado (VIH+).

Diseño del estudio:

- Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas de cada *loci* considerado mediante recuento de genotipos.
- Comparación de la distribución global de frecuencias entre grupos mediante tablas de contingencia:
 - 3x3 (comparación de la distribución global de genotipos en las tres cohortes simultáneamente)
 - 3x2 (comparación de la distribución global de genotipos en las cohortes apareadas)
 - 2x3 (comparación de la distribución global de alelos en las tres cohortes simultáneamente)
- Análisis de regresión mediante el programa WHAP. Comparación de la distribución de alelos y genotipos entre cohortes apareadas. Asunción de modelos genéticos alternativos asignados al alelo más frecuente, agrupación de genotipos según modelo y comparación de las frecuencias entre cohortes apareadas
 - Modelo dominante: homocigotos+heterocigotos para el alelo más frecuente comparados con homocigotos para el alelo menos frecuente
 - Modelo recesivo: homocigotos para el alelo más frecuente comparados con homocigotos+heterocigotos para el alelo menos frecuente
- Determinación de las *odds ratio*, intervalo de confianza (95%) y valor P asignado.
- Corrección para comparaciones múltiples mediante la determinación del número mínimo de *loci* que segregan de forma independiente (SNP spectral decomposition approach, mediante la aplicación informática SNPSpD)
- Estimación de las frecuencias haplotípicas mediante el algoritmo EM implementado en el paquete informático WHAP.
 - Comparación mediante regresión logística múltiple de las frecuencias haplotípicas entre cohortes apareadas (opción *omnibus-test* del paquete informático WHAP).



- b. Determinación del efecto de cada haplotipo: comparación entre cohortes apareadas de la frecuencia en que un determinado haplotipo esta presente (una o dos copias) respecto a la ausencia del mismo (opción *haplotype-specific test* del paquete informático WHAP).
- c. Asunción de modelos genéticos alternativos asignados a cada haplotipo (opciones *dom* y *rec* del paquete informático WHAP)
 - i. *Modelo dominante*: una o dos copias del haplotipo considerado comparada con ninguna copia de dicho haplotipo
 - ii. *Modelo recesivo*: dos copias del haplotipo considerado comparado con uno o ninguna copia de dicho haplotipo

7. Determinación de las *odds ratio*, intervalo de confianza (95%) y valor P asignado
Corrección de *Bonferroni* para comparaciones múltiples dividiendo el valor de significación $P=0.05$ por el número de haplotipos con frecuencia mayor del 5%.

Tabla 11. Características clínicas y epidemiológicas de las cohortes analizadas.

	Origen de la muestra ⁽¹⁾	Cohortes consideradas			
		Controles sanos	Expuestos no infectados (ENI)	VIH-1 infectados	
Número de individuos		124	125	335	
	Lleida	124	47	335	
	Sevilla	-	78	-	
Edad (media, intervalo)		36 (17-61)	31 (18-47)	38 (23-54)	
	Lleida		30 (18-42)		
	Sevilla		32 (18-47)		
Tiempo medio de consumo de drogas por vía parenteral. (meses, intervalo)		-	36 (3-240)	32 (6-195)	
	Lleida		27 (6-150)		
	Sevilla		31 (3-240)		
Periodo de recogida		1999-2001	1997-1999	1998-2001	
	Lleida		1997-1999		
	Sevilla		1998-1999		
Hepatitis C (n, %)		0	100 (80)	320 (95.5)	
	Lleida		28 (65)		
	Sevilla		72 (92)		
VIH-1 positivo (n, %)				335 (100)	
	Antes de 1984			27 (8)	
	1985-1989			99 (29)	
	1990-1994			109 (33)	
	1995-1999			100 (30)	

⁽¹⁾ Fueron incluidos en el estudio 47 individuos ENI por uso de drogas por vía parenteral que participaban en un programa de rehabilitación entre los años 1997 y 1999 en Lleida. Se seleccionaron 78 individuos ENI por uso de droga por vía parenteral que participaron en un estudio previo de epidemiología de infección por *Leishmania* que tuvo lugar desde abril de 1998 a julio de 1999 en Sevilla.



1.-Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en las poblaciones analizadas.

La Tabla 12 muestra la distribución de genotipos y las frecuencias alélicas de los marcadores seleccionados del gen *VDR* y del gen *CCR5* en las cohortes ENI, controles sanos y VIH+. Todos los polimorfismos presentaron equilibrio Hardy-Weinberg excepto el polimorfismo rs17878969 en la cohorte de VIH+. No se observaron diferencias en la distribución global de genotipos de los marcadores del gen *VDR* entre las tres cohortes de estudio (tablas 3x3) ni en la comparación de las cohortes apareadas (tablas 3x2). Sin embargo, la distribución global de genotipos para el polimorfismo *CCR5-Δ32* presentó diferencias significativas cuando se compararon las cohortes ENI y VIH+ (tablas 3x2, $P=0.046$). Tal y como cabía esperar, no se observaron homocigotos *CCR5-Δ32* en la población de VIH+. La frecuencia de los homocigotos *CCR5-Δ32* fue dos veces mayor en la cohorte ENI que en la población control (1,6% vs. 0,8%), aunque dichas diferencias no alcanzaron significación estadística, probablemente debido al bajo número de individuos en dichas categorías.

2.- Análisis de asociación de cada marcador.

Mediante un análisis de regresión logística se comparó la distribución de genotipos entre las cohortes apareadas asumiendo diferentes modelos genéticos. Se obtuvieron diferencias significativas para los marcadores del gen *VDR*; rs4516035 (localizado en la región promotora) y rs1544410 y rs17878969 (localizados en la región 3'UTR) al comparar la distribución entre las cohortes ENI y VIH+. Los resultados obtenidos indican que los alelos rs4516035-A, rs1544410-G y rs17878969-L se asocian con protección a la infección asumiendo un modelo dominante (Tabla 12). Sin embargo, ninguna de las asociaciones observadas se mantuvo significativa tras la corrección para comparaciones múltiples.

Se realizó un análisis de regresión logística incluyendo el genotipo *CCR5-Δ32* como covariable y no se observó interacción alguna con rs4516035 ($P=0.73$), rs1544410 ($P=0.78$) o rs17878969 ($P=0.17$).

Tabla 12. Distribución de genotipos y alelos en las poblaciones analizadas

SNP rs# (alias)	Genotipos /Alelos ^a	Prevalencia en las cohortes analizadas ^(b)			Análisis de regresión de la distribución de genotipos y alelos entre las cohortes VIH+ y ENI ^(c,d)	
		HIV-1 infectados (n= 335)	Controles sanos (n = 124)	ENI (n = 125)	Genotipos/alelos comparados: OR (95%CI)	P valor
rs11568820 ^(e) (<i>Cdx</i>)	GG	202 (60,8)	74 (59.7)	77 (67.5)	[GG+GA] vs. AA: 0.67 (0.22-2.04)	0.464
	GA	113 (34)	44 (35.5)	33 (28.9)		
	AA	17 (5,2)	6 (4.8)	4 (3.5)		
	G	517 (77,9)	192 (77.4)	187 (82)	G vs. A:	0.182
	A	147 (22,1)	56 (22.6)	41 (18)	0.78 (0.53-1.14)	
rs4516035 (<i>A1012G</i>)	AA	113 (33,7)	45 (36.3)	49 (39.2)	[AA+AG] vs. GG: 0.5 (0.26-0.96)	0.0276
	AG	163 (48,7)	64 (51.6)	64 (51.2)		
	GG	59 (17,6)	15 (12.1)	12 (9.6)		
	A	389 (58,1)	154 (62.1)	162 (64.8)	A vs. G:	0.0584
	G	281 (41,9)	94 (37.9)	88 (35.2)	0.75 (0.55-1.01)	
rs10735810 (<i>Fok I</i>)	CC	154 (46)	54 (43.5)	49 (39.2)	[CC+CT] vs. TT: 1.16 (0.61-2.22)	0.637
	CT	146 (43,6)	57 (46.0)	61 (48.8)		
	TT	35 (10,4)	13 (10.5)	15 (12)		
	C	454 (67,8)	165 (66.5)	159 (63.6)	C vs. T:	0.233
	T	216 (32,2)	83 (33.5)	91 (36.4)	1.2 (0.88-1.64)	
rs1544410 (<i>Bsm I</i>)	GG	125 (37,3)	44 (35.5)	51 (40.8)	[GG+AA] vs. AA: 0.53 (0.29-1.0)	0.0375
	GA	146 (43,6)	61 (49.2)	60 (48)		
	AA	64 (19,1)	19 (15.3)	14 (11.2)		
	G	396 (59,1)	149 (60.1)	162 (64.8)	G vs. A:	0.125
	A	274 (40,9)	99 (39.9)	88 (35.2)	0.79 (0.59-1.06)	
rs17878969 ^(f) (PolyA)	LL	128 (38.2)	44 (35.5)	53 (42.4)	[LL+LS] vs. SS: 0.57 (0.33-0.99)	0.0384
	LS	127 (37.9)	60 (48.4)	53 (42.4)		
	SS	80 (23.9)	20 (16.1)	19 (15.2)		
	L	383 (57.2)	148 (59.7)	159 (63.6)	L vs. S:	0.104
	S	287 (42.8)	100 (40.3)	91 (36.4)	0.8 (0.61-1.05)	
rs333 (Δ 32)	wtwt	284 (84,8)	105 (84.6)	100 (80)	[wtwt+wt Δ 32] vs. [Δ 32 Δ 32] No calculado ^(g)	0.022
	wt Δ 32	51 (15,2)	18 (14.5)	23 (18.4)		
	Δ 32 Δ 32	0 (0)	1 (0.8)	2 (1.6)		
	wt	619 (92,4)	228 (91.9)	223 (89.2)	wt vs. Δ 32:	0.123
	Δ 32	51 (7,6)	20 (8.1)	27 (10.8)	0.7 (0.4-1.1)	

a) Los alelos del *VDR* están codificados de acuerdo con la secuencia con sentido del gen *VDR*.

b) El análisis mediante tablas de contingencia para la distribución global de genotipos (tablas 3X3 y 3X2) y alelos (tablas 2x3 y 2X2) no mostró diferencias significativas .

c) Análisis de regresión para cada marcador realizado mediante la aplicación WHAP. Aplicando un modelo dominante para el alelo más frecuente se comparó la frecuencia de homocigotos más la de heterocigotos con la frecuencia de homocigotos para el alelo menos frecuente. Las comparaciones significativas se indican en itálicas.

d) Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon los grupos VIH+ y VIH- (controles sanos+ENI)

e) No se obtuvieron genotipos para el rs11568820 (*Cdx*) en once individuos ENI y en tres individuos VIH+.

f) El polimorfismo rs17878969 (PolyA) muestra una distribución bimodal con una repetición corta de adeninas (S) (de 13 a 17) y una repetición larga (L) (de 18 a 24)

g) No es posible estimar la Odds ratio mediante WHAP ya que no se observan homocigotos Δ 32 en los VIH+.

h) Ninguna de las asociaciones descritas resulta significativa tras la corrección por multiplicidad de ensayos (el valor P de corrección estimado mediante el programa SNPS fue de 0.0107). wt. Alelo salvaje (*wild type*). Δ 32. alelo de delección de 32 pb. OR. Odds ratio. 95%IC. 95% intervalo de confianza



3.- Estima de la frecuencia de haplotipos y distribución entre cohortes

La Tabla 13 muestra la distribución de haplotipos para los 5 polimorfismos estudiados del gen *VDR* en las tres cohortes analizadas. Se observaron un total de 17 haplotipos distintos de los cuales 8 presentaron una frecuencia superior al 5% (haplotipos detallados en la Tabla 13). La distribución de haplotipos fue similar en las tres cohortes, excepto para los haplotipos GACGL (rs11568820-G:rs4516035-A:rs10735810-C:rs1544410-G:rs17878969-L) y GATGL (rs11568820-G:rs4516035-A:rs10735810-T:rs1544410-G:rs17878969-L). En ambos casos su frecuencia fue superior en la cohorte ENI que en las cohortes de controles sanos y VIH+. El haplotipo GATGL mostró las máximas diferencias entre cohortes. Su frecuencia fue alta en los sujetos ENI (12.1%), intermedia en los controles sanos (8.1%) y baja en los pacientes VIH+ (6.9%). Las diferencias fueron significativas al comparar las cohortes ENI y VIH+ (Figura 1, $P=0.006$). Mediante un análisis de regresión múltiple el efecto de haplotipo para GATGL fue estadísticamente significativo ($P=0.0025$). Así mismo, se obtuvieron diferencias significativas asumiendo un modelo dominante tanto para el haplotipo GATGL ($P=0.0012$) como para el haplotipo GACGL ($P=0.019$).

Considerando el patrón de bloques observado se estudió la distribución de haplotipos de los marcadores localizados en la región promotora (bloque 1: rs11568820 y rs4516035) y en la región 3'UTR (bloque 2: rs1544410 y rs17878969). Se distinguieron tres haplotipos distintos con frecuencia $> 5\%$ en la región promotora y dos haplotipos distintos con frecuencia $>5\%$ en la región 3'UTR (Tabla 13).

Se observaron diferencias significativas en la distribución de haplotipos de la región del promotor entre las cohortes VIH+ y ENI (Figura 28). La frecuencia del haplotipo GA (rs11568820-G: rs4516035-A) fue mayor en la cohorte ENI (48%) que en la cohorte VIH+ (38%) (Figura 28, $P=0.003$). En el análisis de regresión múltiple se obtuvo significación estadística para el efecto de haplotipo ($P=0.0054$) así como para la asignación de un modelo dominante ($P=0.011$) (Tabla 13)



La distribución de haplotipos en la región 3'UTR presentó diferencias marginales al comparar las cohortes VIH+ y ENI. La frecuencia del haplotipo GL (rs1544410-G:rs17878969-L) fue superior en la cohorte ENI (60%) que en la cohorte VIH+ (54%). En el análisis de regresión múltiple, las diferencias fueron significativas al asumir un modelo dominante ($P=0.0063$).

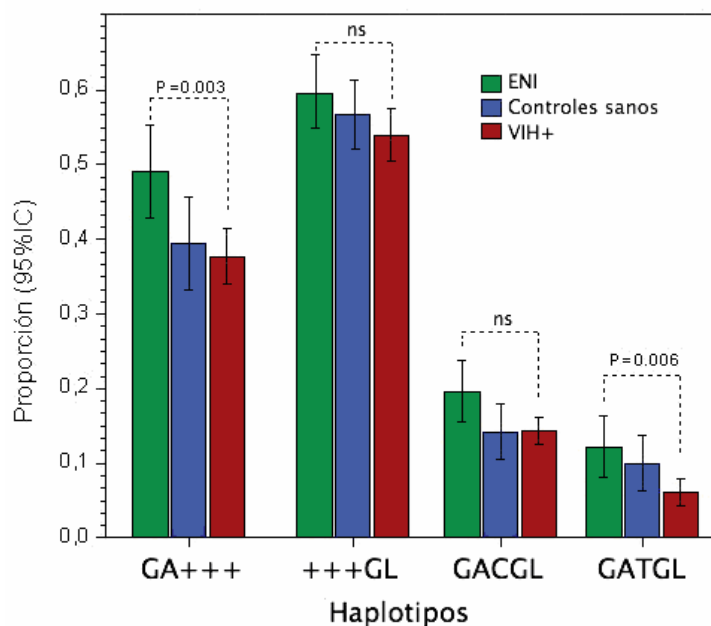


Figura 28. Distribución de los haplotipos de protección en las tres cohortes analizadas. Los haplotipos rs11568820-G:rs4516035-A (GA+++); rs1544410-G:rs17878969-L (+++GL); rs11568820-G:rs4516035-A:rs10735810-C:rs1544410-G:rs17878969-L (GACGL) y GATGL rs11568820-G:rs4516035-A:rs10735810-T:rs1544410-G:rs17878969-L (GATGL) presentaron una frecuencia alta en la cohorte ENI, intermedia en los controles sanos y baja en la cohorte VIH+. Las diferencias de proporciones de los haplotipos GA+++ y GATGL fueron significativas entre la cohorte ENI y VIH+.

Tabla 13. Distribución de haplotipos en las cohortes analizadas.

Haplotipos para los 5 polimorfismos	Haplotipos (secuencia 5'-3')					Comparación de la distribución de haplotipos entre VIH+ y ENI ^(b)							
	rs11568820	rs4516035	rs10735810	rs1544410	rs17878969	Prevalencia de los haplotipos ^(a)				Efecto de cada haplotipo		Haplotipos modelo dominante ^(c)	
						Global	VIH+	Controles sanos	ENI	OR (95%IC)	P-valor	OR (95%IC)	P-valor
	G	A	C	G	L	16.8	15.6	15.2	20.0	0.69 (0.45-	0.0912	0.29 (0.09-	0.0196
	G	G	C	G	L	14.8	14.9	16.8	11.5				
	G	A	C	A	S	10.5	10.2	11.6	9.1				
	G	G	C	A	S	9.8	10.6	8.7	8.1				
	G	G	T	G	L	8.4	8.9	7.4	8.3				
	G	A	T	G	L	8.2	6.9	8.1	12.1	0.4 (0.22-0.72)	0.0025	0.34 (0.18-	0.0012
	A	A	C	G	L	7.1	7.3	8.3	5.6				
	A	A	T	A	S	5.8	6.1	7.0	4.2				
	Haplotipos raros ^(d)					18.6	19.5	16.9	20.4				
Haplotipos del bloque													
	G	A				40.4	37.9	37.4	47.9	0.66 (0.49-	0.0054	0.46 (0.25-	0.0113
	G	G				38.1	40.0	40.0	33.3				
	A	A				20.0	20.1	22.1	16.9				
	A	G				1.5	2.0	0.5	1.9				
Haplotipos del bloque													
				G	L	56.2	54.1	58.3	59.8	0.82 (0.62-	0.1441	0.42 (0.21-	0.0063
				A	S	36.6	37.8	38.6	31.4				
				Raros		7.2	8.1	3.1	8.8				

a) Las frecuencias de haplotipos se estimaron mediante el algoritmo EM implementado en el programa WHAP. (<http://www.broad.mit.edu/personal/shaun/whap/>).

b) Test específico de haplotipo realizado mediante el programa WHAP. Las comparaciones estadísticamente significativas después de una corrección de Bonferroni para multiplicidad de ensayos se denotan en *itálicas*. Se obtuvieron resultados similares al comparar VIH+ y VIH- (controles sanos+ENI)

c) Comparación de la distribución de haplotipos asumiendo un modelo dominante (la frecuencia de individuos portadores de una o dos copias del haplotipo se comparó con la frecuencia de individuos no portadores de dicho haplotipo).

d) Se consideraron haplotipos raros aquellos con una frecuencia global inferior al 5%: GGTAT (4.5), GATAT (3.3), AACAT (3.2), AATGA (2.8), GACAA (1.4), GGCGT (1.3), AACGT (1.2) y GACGT (1.1)

e) Se consideraron haplotipos raros aquellos con una frecuencia global inferior al 5%: GS (4.3) y AL (2.9)



4.- Estimación ponderada del efecto de cada alelo en los haplotipos de gen *VDR*

Mediante la aplicación WHAP se obtuvieron las frecuencias en cada cohorte de todos los haplotipos posibles seleccionando grupos de 2, 3, 4 o 5 marcadores del gen *VDR*. La Figura 29 muestra las *odds ratio* correspondientes a las combinaciones que presentaron diferencias significativas en la comparación de las cohortes ENI y VIH+. Los haplotipos están ordenados de menor (protección) a mayor (riesgo) *odds ratio*.

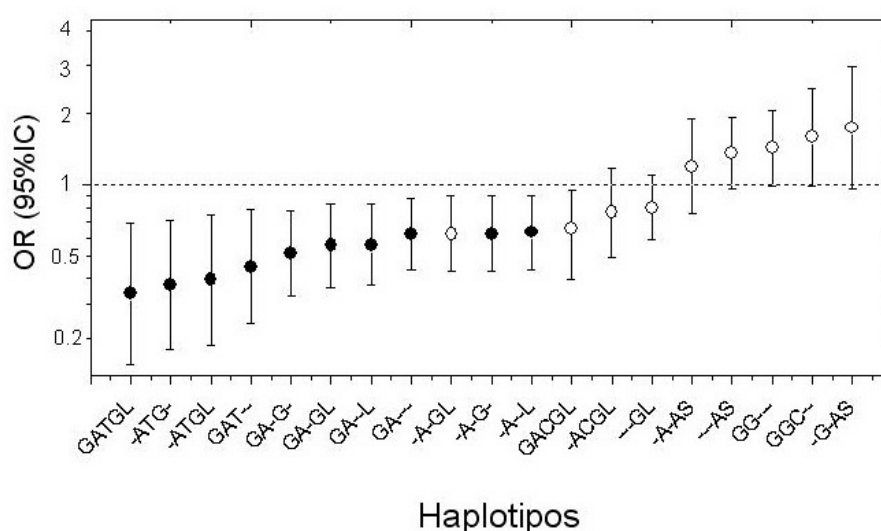


Figura 29. *Odds ratio* estimados mediante el programa WHAP comparando la distribución de haplotipos entre las cohortes ENI y VIH+. Se evaluaron todos los haplotipos posibles obtenidos a partir de las combinaciones de 2, 3, 4 o 5 *loci* polimórficos. En la gráfica los haplotipos están ordenados de menor (protección) a mayor (riesgo) *odds ratio*. Los símbolos oscuros indican aquellas comparaciones que son significativas después de una corrección para comparaciones múltiples.

Con el fin de obtener una representación gráfica de la contribución de cada alelo en el haplotipo de protección ($OR < 1$) o riesgo ($OR > 1$), la secuencia correspondiente a cada uno de los haplotipos de la Figura 30 se incorporó como *input* del programa WebLogo (Crooks, Hon et al. 2004) (<http://weblogo.berkeley.edu/>). WebLogo es una aplicación on-line que permite obtener la representación gráfica de un grupo de secuencias alineadas dando a cada letra un tamaño proporcional al número de veces que esta aparece en una determinada posición en el grupo de secuencias presentadas.



La Figura 30 presenta los resultados obtenidos en dicho análisis. La secuencia GATGL emerge del grupo de secuencias que confieren protección, siendo mayoritaria la contribución de los alelos A (rs4516035) y L (rs17878969). La asociación con protección observada para los marcadores de la región 5'UTR del gen es atribuible principalmente a la combinación alélica GA (rs11568820:rs4516035), mientras que la combinación GG está asociada con riesgo. En la región 3'UTR la combinación alélica GL (rs1544410:rs17878969) confiere protección y su complementaria, AS, confiere riesgo. En cuanto al papel de los alelos C/T del polimorfismo localizado en la región codificante (rs10735810) puede apreciarse que la variante T contribuye principalmente a la protección.

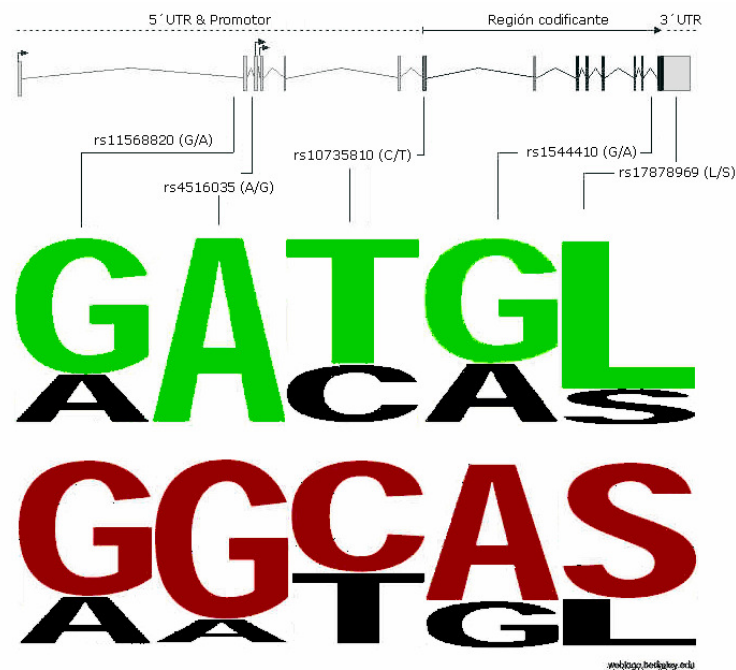


Figura 30.-Representación gráfica obtenida por el software WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) de la contribución relativa de cada alelo a la asociación observada para el haplotipo de riesgo o protección. Para el haplotipo que confiere protección los alelos más y menos frecuentes están en color verde y gris respectivamente. Para el haplotipo de riesgo los alelos más y menos frecuentes están en color rojo y gris respectivamente



ESTUDIO DEL RITMO DE PROGRESIÓN A SIDA EN FUNCIÓN DE LA VARIABILIDAD DE LOS GENES *VDR* Y *CCR5*

El tiempo de progresión a sida, considerado como el periodo de tiempo transcurrido desde la fecha de seroconversión (infección por VIH-1) hasta la fecha en la que se presenta la primera manifestación clínica (infecciones indicativas de sida) o inmunológica-celular (niveles de CD4 < 200/μL), es variable entre los pacientes.

En el presente trabajo hemos estudiado la variabilidad en el ritmo de progresión a sida en relación al genotipo de los genes *VDR* y *CCR5*. Las variantes analizadas para cada gen se detallan en la tabla siguiente:

Loc*i* y polimorfismos analizados.

Locus <i>VDR</i>	
	Región promotora: rs11568820 (Cdx) y rs4516035 (A1012G)
	Exón 2: rs10735810 (Fok-I)
	Región 3'UTR: rs1544410 (Bsm-I) y rs17878969 (PolyA)
Locus <i>CCR5</i>	
	Promotor: rs1799988
	Promotor: rs41469351
	Promotor: rs1800023
	Exón 3: rs333 ($\Delta 32$)

Diseño del estudio.

El análisis se realizó mediante dos aproximaciones estadísticas: estudio caso-control anidado y análisis de supervivencia.

En la primera aproximación los 179 pacientes de la cohorte SERLAC se han agrupado en dos clases, *progresores* y *no progresores* atendiendo a tres criterios de progresión:

1. Criterio clínico:

No progresores pacientes clasificados en los grupos A y B (n=124)

Progresores; pacientes clasificados en el grupo C (n=55)

2. Criterio inmuno-celular:

No progresores; pacientes con niveles de CD4 > 200/μL (grupos 1 y 2) (n=103)

Progresores; pacientes con niveles de CD4 < 200/μL (grupo 3) (n=76)

3. Criterio CDC 1993

No progresores; Pacientes clasificados en los grupos A, B, 1 y 2 (n=83)

Progresores; Pacientes clasificados en los grupos C y 3 (n=96)

Se comparó la distribución de frecuencias de los alelos y genotipos entre cada grupo de progresión, mediante tablas de contingencia. Se estimó la frecuencia de haplotipos en cada grupo mediante el algoritmo EM implementado en el programa WHAP y se compararon dichas frecuencias entre cada grupo de progresión mediante un análisis de regresión logística múltiple implementado en el mismo programa.

En una segunda aproximación, se estudió el tiempo de progresión a sida, según los criterios del CDC 1993, de los pacientes agrupados según su genotipo o diplotipo mediante un análisis de supervivencia Kaplan-Meier. Se estimó el tiempo medio de supervivencia para cada genotipo y se compararon las curvas de supervivencia asignadas a cada genotipo mediante el test no paramétrico del logaritmo del rango (*Log-rank test*). Asimismo, se evaluaron las diferencias en el tiempo de progresión a sida-93 de cada genotipo, mediante una Regresión de Cox, asumiendo un modelo de riesgo proporcional. A partir del análisis de regresión de Cox se estimó la razón de riesgos (*hazard ratio*) incorporando al modelo de regresión como covariables la edad en el momento de seroconversión, el sexo (hombre, mujer) y el tratamiento antiretroviral (tratados y no tratados).



En el análisis de asociación para cada *loci* se realizó una corrección para comparaciones múltiples mediante la determinación del número mínimo de *loci* que segregan de forma independiente (SNP spectral decomposition approach, mediante la aplicación informática SNPSpD). En el análisis de asociación de haplotipos, se realizó una corrección de *Bonferroni* para comparaciones múltiples dividiendo el valor de significación $P=0.05$ por el número de haplotipos con frecuencia mayor del 5%

Población de estudio

Se constituyó una cohorte seroprevalente de pacientes VIH-1 positivo procedentes de la unidad de sida del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida. Los criterios de inclusión en la cohorte fueron:

1. Origen caucásico, y
2. Pertenencia al grupo de riesgo de transmisión por vía sanguínea como consecuencia del intercambio de jeringas durante la práctica de la drogadicción por vía parenteral (pacientes adictos a droga por vía parenteral, ADVP), y
3. Primer test de seropositividad para VIH anterior a 31 de diciembre de 1989, o
4. Edad en el primer test de seropositividad par VIH-1 inferior a los 21 años.

Atendiendo a dichos criterios se seleccionaron un total de 179 pacientes que constituyeron la cohorte SERLAC (*Seroprevalent Lleida AIDS Cohort*) utilizada en el presente estudio.

La fecha de seroconversión se estimó para cada paciente de la cohorte SERLAC atendiendo a los siguientes criterios:

1. Para los pacientes con una primera fecha de test positivo para VIH-1 anterior a 31 de diciembre de 1989 (137 pacientes), la fecha de seroconversión se estimó como el tiempo medio entre la fecha del primer test seropositivo y el 1 de enero de 1981.
2. Para los pacientes con una edad inferior a los 20 años en el momento del primer test de seropositividad (42 pacientes) la fecha de seroconversión fue estimada como el tiempo medio entre la fecha del primer test positivo para VIH y la fecha en la que el paciente tenía 15 años.

El estudio fue aprobado por le comité ético del hospital Arnau de Vilanova de Lleida. Todos los participantes firmaron un documento de consentimiento informado.



1.-Estudio de las variantes del gen *VDR* y su asociación con el ritmo de progresión a sida

1.1- Análisis de asociación de cada marcador.

La Tabla 14 muestra las frecuencias alélicas y la distribución de genotipos de los marcadores seleccionados del gen *VDR* en los pacientes SERLAC. Todos los marcadores se hallaban en equilibrio Hardy-Weinberg.

Se comparó la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores seleccionados entre cada grupo de progresión considerado. Se observaron diferencias significativas en la distribución alélica del marcador rs17878969 (*poly A*) para los tres criterios considerados; "categoría clínica CDC" ($\chi^2_{1d.f.} = 4.16; p = 0.041$), "recuento de células CD4" ($\chi^2_{1d.f.} = 5.59; p = 0.018$) y "sida CDC 1993" ($\chi^2_{1d.f.} = 6.59; p = 0.01$). La distribución de genotipos para el polimorfismo *polyA* fue significativamente distinta entre los pacientes agrupados según los criterios de progresión "recuento de células CD4" ($\chi^2_{2d.f.} = 12.003; p = 0.002$) y "sida CDC 1993" ($\chi^2_{2d.f.} = 11.502; p = 0.003$). La frecuencia del genotipo polyA-T/T fue 3 veces superior en los progresores que en los no progresores para los criterios "recuento de células CD4" (*odds ratio* [OR]=3.63; 95% intervalo de confianza [IC]: 1.7-7.9; P=0.0008) y "sida CDC 1993" (OR=4.0; 95%IC:1.7-9.5; P=0.0001). Asimismo, la distribución de genotipos para el polimorfismo *Bsm-I* fue significativamente distinta entre los pacientes agrupados según los criterios de progresión "sida CDC 1993" ($\chi^2_{2d.f.} = 6.39; p = 0.041$). La frecuencia del genotipo *Bsm-I-A/A* fue 2,4 veces superior en los progresores que en los no progresores para los criterios "recuento de células CD4" (OR=2.5; 95%IC: 1.1-5.6 ; P=0.02) y "sida CDC 1993" (OR=2.9; 95%IC: 1.2-7 ; P=0.01). Después de aplicar la corrección para análisis múltiples, se encontró asociación significativa en la distribución de frecuencias genotípicas para los polimorfismos *Bsm-I* y *polyA* atendiendo a los criterios de progresión "recuento de células CD4" y "sida CDC 1993". Según estos resultados los alelos *Bsm-I-A* y *polyA-S* muestran asociación significativa con progresión asumiendo un modelo recesivo.

Tabla 14: Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en controles sanos y pacientes SERLAC.

SNP rs# (alias) (Localización cromosómica)	Genotipos/Alelos ^a	Distribución de genotipos y alelos n (%)									
		Distribución de genotipos y alelos n (%)		Distribución en pacientes según criterio de progresión, n (%)							
		SERLAC (n = 179) ^b	Categoría Clínica CDC			Recuento de células CD4			sida CDC 1993		
			Categoría A+B	Categoría C	P valor ^c	> 200/μL	< 200/μL	P valor ^c	No	Si	P valor ^c
Gen VDR											
rs11568820 (<i>Cdx</i>) (Chr12: 46588812)	GG	102 (58)	72 (59)	30 (56)	0.599	56 (55)	46 (61)	0.559	44 (54)	58 (62)	0.557
	GA	64 (36)	42 (34)	22 (40)		40 (39)	24 (32)		33 (40)	31 (33)	
	AA	10 (6)	8 (7)	2 (4)		5 (5)	5 (7)		5 (6)	5 (5)	
	G	268 (76)	186 (76)	82 (76)	0.959	152 (75)	116 (77)	0.650	121 (74)	147 (78)	0.332
	A	84 (24)	58 (24)	26 (24)		50 (25)	34 (23)		43 (26)	41 (22)	
rs4516035 (<i>A1012G</i>) (Chr12: 46586093)	AA	64 (36)	45 (37)	19 (35)	0.348	37 (37)	27 (35)	0.985	32 (39)	32 (33)	0.664
	AG	71 (40)	45 (37)	26 (47)		40 (39)	31 (41)		30 (37)	41 (43)	
	GG	42 (24)	32 (26)	10 (18)		24 (24)	18 (24)		19 (24)	23 (24)	
	A	199 (56)	135 (55)	64 (58)	0.971	114 (57)	85 (56)	0.989	94 (56)	105 (55)	0.528
	G	155 (44)	109 (45)	46 (42)		88 (43)	67 (44)		84 (44)	87 (45)	
rs10735810 (<i>Fok I</i>) (Chr12: 46559162)	CC	74 (42)	50 (41)	24 (44)	0.314	48 (47)	26 (35)	0.207	36 (43)	38 (40)	0.410
	CT	77 (43)	51 (41)	26 (47)		39 (38)	38 (50)		32 (37)	45 (47)	
	TT	27 (15)	22 (18)	5 (9)		16 (15)	11 (15)		15 (18)	12 (13)	
	C	225 (63)	151 (61)	74 (67)	0.287	135 (66)	90 (60)	0.285	104 (63)	121 (64)	0.840
	T	131 (37)	95 (38)	36 (33)		71 (34)	60 (40)		62 (37)	69 (36)	
rs1544410 (<i>Bsm I</i>) (Chr12: 46526101)	GG	60 (34)	43 (35)	17 (31)	0.158	35 (34)	25 (33)	0.054	30 (36)	30 (31)	0.041
	GA	88 (49)	64 (52)	24 (44)		56 (54)	32 (42)		45 (54)	43 (45)	
	AA	31 (17)	17 (14)	14 (25)		12 (12)	19 (25)		8 (10)	23 (24)	
	G	208 (58)	150 (60)	58 (53)	0.170	126 (61)	82 (54)	0.196	105 (63)	103 (54)	0.066
	A	150 (42)	98 (40)	52 (47)		80 (39)	70 (46)		61 (37)	89 (46)	
rs17878969 (<i>Poly_A</i>) (Chr12: 46522674)	LL	64 (37)	47 (39)	17 (31)	0.062	39 (39)	25 (34)	0.002	33 (40)	31 (34)	0.003
	LS	74 (42)	54 (45)	20 (37)		50 (49)	24 (33)		41 (50)	33 (36)	
	SS	36 (21)	19 (16)	17 (32)		12 (12)	24 (33)		8 (10)	28 (30)	
	L	202 (58)	148 (62)	54 (50)	0.041	128 (63)	74 (51)	0.018	107 (65)	95 (52)	0.010
	S	146 (42)	92 (38)	54 (50)		74 (37)	72 (49)		57 (35)	89 (48)	

- ^a Alelos codificados de acuerdo a la secuencia de la cadena *mas* del cromosoma 12. Los alelos del rs17878969 (Poly-A) S (T<18) y L (T>20) corresponden a un fragmento de 15-18 y 20-22 copias de T, respectivamente.
- ^b Los genotipos para el rs17878969 no pudieron ser obtenidos para 2 controles y 5 pacientes SERLAC. Los genotipos para el rs10735810 no pudieron ser obtenidos para 1 paciente SERLAC. Los genotipos para el rs4516035 no pudieron ser obtenidos para 1 control a
- ^c P valor del análisis mediante tablas de contingencia de la distribución de alelos y genotipos entre los grupos considerados. Los P valores estadísticamente significativos están denotados mediante letra cursiva. Los P valores que mantienen la significación después de una corrección por *multiple-testing* están denotados en negrita.



1.2- Análisis de la distribución de haplotipos del gen *VDR* en los pacientes agrupados según su estatus de progresión a sida CDC 93

La Tabla 15 muestra la frecuencia de haplotipos del gen *VDR* en la población SERLAC agrupada según el criterio de progresión a sida CDC 1993. Se realizó un análisis de regresión logística múltiple mediante el programa WHAP de todos los haplotipos posibles, considerando agrupaciones de 2,3, 4 y 5 marcadores. Se comparó la presencia o ausencia de un determinado haplotipo (efecto de haplotipo), así como su distribución asumiendo un modelo dominante (una o dos copias de un determinado haplotipo respecto a ninguna copia) o recesivo (dos copias de un determinado haplotipo respecto a uno o ninguna copia del mismo). Los resultados presentados en la Tabla 15 corresponden a las combinaciones haplotípicas que dieron significación estadística ($P=0.05$) en alguno de los modelos considerados.

Para cada combinación haplotípica se estimó la *odds ratio* correspondiente. Los haplotipos listados en la Tabla 15 están ordenados de menor a mayor *odds ratio*. Los haplotipos que mostraron asociación después de la corrección para *multiple-testing* están indicados en negrita.

La presencia de los alelos *Bsm-I-G* y *polyA-L*, de la región 3'UTR, se asocia con no progresión, siguiendo un modelo dominante. Por el contrario, la presencia de los alelos *Bsm-I-A* y *polyA-S* se asocia con progresión siguiendo un modelo recesivo.

La incorporación de alelo *Cdx-G* en combinación con los haplotipos GL y AS de los marcadores de la región 3'UTR, incrementó la significación tanto de la protección (haplotipo **G++GL**) como del riesgo (haplotipo **G++AS**) de progresión a sida CDC 93.

Todas las secuencias posibles de cada uno de los haplotipos listados en la Tabla 15 se utilizaron como *input* del programa WebLogo. Las secuencias correspondientes a los haplotipos con un *odds ratio* < 1 (haplotipos asociados



con no progresión) se codificaron como protectoras. Las secuencias correspondientes a los haplotipos con un odds ratio > 1 (haplotipos asociados con progresión) se codificaron como de riesgo. A partir de la representación gráfica de dichas secuencias con WebLogo se obtuvo una representación ponderada de la contribución de cada alelo en la asociación descrita (Figura 31).

Tabla 15: Asociación de haplotipos del gen VDR con progresión a sida.

rs11568820-C/T	rs4516035-T/C	rs10735810-G/A	rs1544410-C/T	rs17878969-L/S	SERLAC (progresión a sida CDC 1993)		EFECTO DE HAPLOTIPO		EFECTO DE DIPLOTIPO				
					Frecuencia en progresores	Frecuencia no progresores	OR (± 95%C.I.)	p-valor ^c	MODELO DOMINANTE		MODELO RECESIVO		P límite ^d
									OR (± 95%C.I.)	p-valor ^b	OR (± 95%C.I.)	p-valor ^c	
Haplotipos (5'-3') ^{a,b}													
+	A	T	G	L	0.08	0.13	0.55 (0.24-1.27)	0.143	0.61 (0.24-1.56)	0.286	n.e.	0.049	0.007
+	+	+	+	L	0.52	0.65	0.61 (0.40-0.93)	0.020	0.25 (0.11-0.60)	0.001	0.81 (0.44-1.51)	0.444	0.025
+	+	+	G	L	0.48	0.59	0.66 (0.44-1.01)	<i>0.049</i>	0.29 (0.12-0.71)	0.003	0.85 (0.49-1.45)	0.535	0.017
+	+	C	+	L	0.33	0.42	0.67 (0.43-1.04)	0.072	0.33 (0.12-0.88)	<i>0.019</i>	n.e.	0.465	0.013
+	+	C	G	L	0.29	0.38	0.68 (0.43-1.07)	0.093	0.34 (0.12-0.98)	<i>0.034</i>	0.84 (0.52-1.36)	0.470	0.013
G	+	C	+	L	0.27	0.33	0.68 (0.42-1.10)	0.116	0.29 (0.09-0.92)	<i>0.022</i>	0.88 (0.54-1.44)	0.608	0.008
G	+	+	+	L	0.43	0.52	0.70 (0.45-1.07)	0.096	0.30 (0.10-0.87)	<i>0.015</i>	0.85 (0.52-1.40)	0.526	0.013
+	+	+	G	+	0.54	0.63	0.70 (0.45-1.09)	0.107	0.36 (0.15-0.86)	0.015	0.87 (0.46-1.65)	0.676	0.025
G	+	C	G	L	0.23	0.29	0.70 (0.43-1.16)	0.164	0.92 (0.56-1.53)	0.757	0.25 (0.07-0.90)	<i>0.018</i>	0.008
G	+	+	G	L	0.39	0.48	0.73 (0.47-1.13)	0.126	0.21 (0.06-0.74)	0.004	0.92 (0.57-1.48)	0.763	0.013
+	A	+	G	+	0.28	0.35	0.74 (0.46-1.18)	0.152	0.46 (0.21-1.01)	<i>0.047</i>	0.98 (0.58-1.66)	0.953	0.013
G	+	+	G	+	0.44	0.50	0.79 (0.51-1.23)	0.293	0.22 (0.06-0.80)	0.008	0.98 (0.59-1.61)	0.871	0.013
G	G	+	G	+	0.26	0.28	0.93 (0.58-1.50)	0.762	0.34 (0.12-0.97)	<i>0.030</i>	1.23 (0.75-2.01)	0.416	0.008
G	A	+	A	S	0.13	0.10	1.33 (0.63-2.80)	0.442	1.13 (0.48-2.64)	0.776	n.e.	0.047	0.008
+	G	+	A	+	0.20	0.14	1.59 (0.84-3.04)	0.142	1.35 (0.64-2.85)	0.433	n.e.	0.008	0.013
+	+	+	A	S	0.42	0.31	1.60 (1.02-2.51)	<i>0.038</i>	1.33 (0.72-2.46)	0.364	3.85 (1.38-10.75)	0.004	0.017
G	+	+	A	+	0.34	0.24	1.70 (1.00-2.89)	<i>0.041</i>	1.47 (0.76-2.86)	0.251	5.89 (1.25-27.76)	0.007	0.013
+	G	+	+	S	0.21	0.14	1.75 (0.95-3.21)	0.058	1.64 (0.77-3.47)	0.189	7.08 (0.85-58.75)	<i>0.023</i>	0.013
+	G	+	A	S	0.18	0.11	1.77 (0.89-3.50)	0.086	1.54 (0.69-3.42)	0.283	n.e.	0.008	0.013
G	G	+	A	+	0.19	0.11	1.87 (0.94-3.75)	0.061	1.66 (0.74-3.71)	0.207	n.e.	0.008	0.008
+	+	C	A	S	0.26	0.18	1.87 (1.00-3.50)	<i>0.039</i>	1.78 (0.90-3.49)	0.093	n.e.	<i>0.030</i>	0.013
+	+	C	+	S	0.30	0.21	1.88 (1.07-3.28)	<i>0.023</i>	1.74 (0.90-3.35)	0.096	7.80 (0.95-64.31)	<i>0.016</i>	0.013
G	+	+	A	S	0.31	0.20	1.89 (1.09-3.27)	<i>0.018</i>	1.69 (0.87-3.29)	0.118	9.89 (1.22-80.10)	0.004	0.013
G	+	+	+	S	0.35	0.22	1.91 (1.15-3.17)	0.008	1.86 (0.97-3.59)	0.057	5.06 (1.37-18.71)	0.005	0.013
G	G	+	A	S	0.18	0.10	1.95 (0.94-4.02)	0.055	1.76 (0.76-4.09)	0.179	n.e.	<i>0.010</i>	0.008
G	+	C	+	S	0.25	0.15	2.21 (1.17-4.16)	<i>0.010</i>	2.33 (1.14-4.75)	<i>0.020</i>	4.66 (0.53-41.09)	0.109	0.008
G	+	C	A	S	0.22	0.14	2.23 (1.11-4.47)	<i>0.020</i>	2.18 (1.06-4.49)	<i>0.031</i>	n.e.	0.119	0.008
G	G	C	A	+	0.16	0.09	2.25 (0.98-5.17)	<i>0.041</i>	2.21 (0.92-5.30)	0.064	n.e.	0.192	0.006
+	G	C	A	+	0.16	0.09	2.28 (0.97-5.38)	<i>0.044</i>	2.23 (0.90-5.55)	0.075	n.e.	0.120	0.007
G	G	C	A	S	0.14	0.08	2.45 (0.96-6.23)	<i>0.042</i>	2.43 (0.90-6.53)	0.063	n.e.	0.132	0.006
+	G	C	+	S	0.15	0.08	2.61 (1.08-6.33)	<i>0.020</i>	2.60 (1.00-6.78)	<i>0.038</i>	n.e.	0.058	0.006
+	G	C	A	S	0.14	0.07	2.70 (1.03-7.08)	0.026	2.71 (0.97-7.53)	<i>0.040</i>	n.e.	0.123	0.007
G	G	C	+	S	0.16	0.08	2.82 (1.19-6.67)	<i>0.009</i>	2.84 (1.13-7.12)	<i>0.018</i>	n.e.	0.059	0.006

^a Los alelos están codificados de acuerdo a la cadena menos del cromosoma 12.

^b Los haplotipos asociados con protección a progresión a sida según criterio CDC 1993 están denotados en negrita.

^c P valor del análisis mediante regresión logística. Los P valores significativos están denotados en letra cursiva. Los P valores significativos despues de ser corregidos por *multiple testing* están denotados en negrita

^d P valores límite calculados para el análisis por *multiple testing*



Figura 31.- Representación gráfica del haplotipo de riesgo (1) y protección (2) del gen *VDR* para la progresión a sida según CDC 1993 en la población SERLAC.

1.3- Estudio supervivencia para los haplotipos del gen *VDR*

Se realizó un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes SERLAC clasificados según los haplotipos asociados con protección y según los resultados obtenidos en el apartado anterior: Dichos haplotipos fueron: GL y AS considerando solo los marcadores *Bsm-I* y *polyA* localizados en la región 3'UTR del gen y G++GL y G++AS considerando además al marcador *Cdx*, localizado en la región 5'UTR.

La asignación de haplotipos y diplotipos para cada individuo se realizó mediante el programa WHAP. La probabilidad de los diplotipos asignados de los marcadores de la región 3'UTR fue > 0.95 en todos los casos. Sin embargo, la probabilidad de asignación de los diplotipos al incorporar el marcador *Cdx* de la región 5'UTR fue inferior a 0.95 en 38 de los pacientes. Con el objeto de minimizar el efecto de la imprecisión en la asignación de diplotipos, sólo se consideraron en el estudio de supervivencia aquellos pacientes con una probabilidad de asignación > 0.95 (141 pacientes).

1.4.- Análisis de supervivencia según los haplotipos de la región 3'UTR

La Figura 32 muestra las curvas de supervivencia de los pacientes SERLAC agrupados según el haplotipo para la región 3'UTR. El análisis se realizó



asumiendo un modelo dominante para el efecto del haplotipo GL y un modelo recesivo para el efecto del haplotipo AS. Los pacientes portadores de un diplotipo GL/- progresaron a sida tras un tiempo medio de 211 (IC95%: 192-229) meses, mientras que los portadores de un diplotipo AS/AS lo hicieron tras un tiempo medio de 164 (IC95%:140-187) meses. Los portadores de otros genotipos se agruparon en una misma clase y su tiempo medio de progresión fue de 190 (IC95%:159-219), intermedio entre los dos anteriores. La curvas de supervivencia fueron significativamente distintas al comparar los dos grupos extremos (*Log-rank test*, $P=0.0036$) (Figura 32). Mediante un análisis de regresión de *Cox* se estimaron los *hazard-ratio* (HR) correspondientes a cada diplotipo ajustando para sexo, edad de seroconversión y tratamiento antiretroviral. Se obtuvo significación estadística en la comparación de los pacientes portadores del diplotipo GL/- respecto a los portadores del diplotipo AS/AS (HR: 0.47; IC95% [0.3-0.8]; $P=0.005$) (Figura 33).

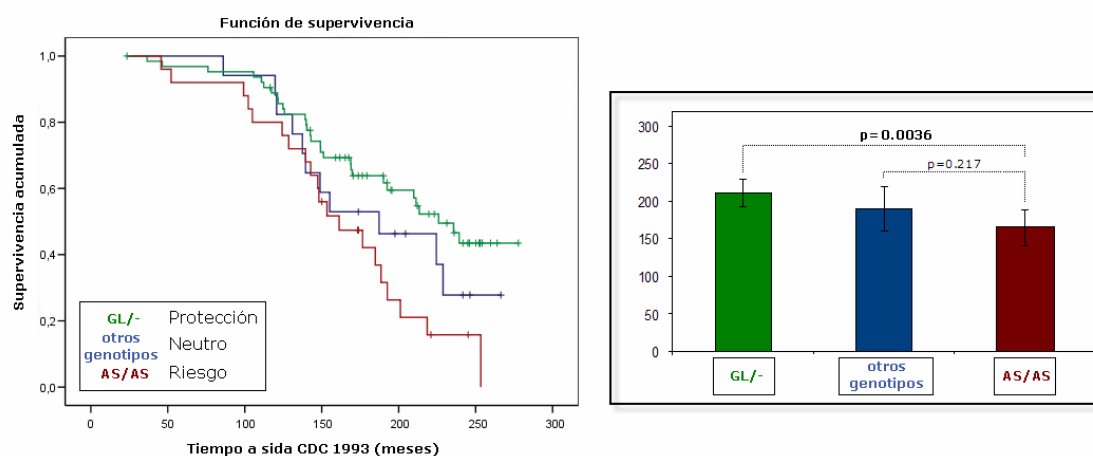


Figura 32. Función de supervivencia y tiempo medio de progresión a sida según CDC 1993 (en meses) de los pacientes SERLAC clasificados según el haplotipo para 3'UTR (marcadores *Bsm-I* y *poly-A*). Los p-valores significativos están denotados con letra en negrita.

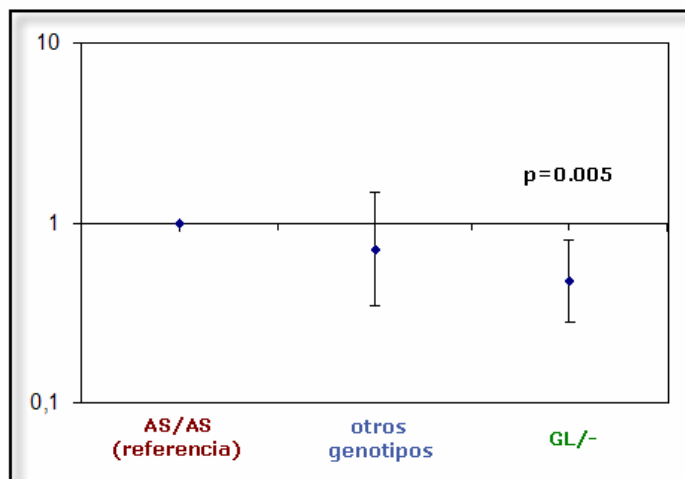


Figura 33.-Hazard-ratio para la comparación entre genotipos de protección (GL/-), "intermedio" (otro genotipos) y riesgo (AS/AS) para la región 3'UTR del gen *VDR*.

1.5- Análisis de supervivencia según los haplotipos definidos por los marcadores *Cdx* (5'UTR) y *Bsm-I, polyA* (3'UTR)

La Figura 34 muestra las curvas de supervivencia de los pacientes SERLAC agrupados según el haplotipo para por los marcadores *Cdx* (5'UTR) y *Bsm-I, polyA* (3'UTR). El análisis se realizó asumiendo un modelo dominante para el efecto del haplotipo G++GL y un modelo recesivo para el efecto del haplotipo G++AS. Los pacientes portadores de un diplotipo G++GL/- progresaron a sida tras un tiempo medio de 208 (IC95%: 194-223) meses, mientras que los portadores de un diplotipo G++AS/G++AS lo hicieron tras un tiempo medio de 154 (IC95%:131-178) meses. Los portadores de otros diplotipos se agruparon en una misma clase y su tiempo medio de progresión fue de 184 (IC95%:162-208), intermedio entre los dos anteriores. La curvas de supervivencia fueron significativamente distintas al comparar los dos grupos extremos (*Log-rank* test, $P=0.0022$), siendo marginalmente significativa la comparación entre G++AS/G++AS y el grupo de otros diplotipos (*Log-rank* test, $P=0.057$) (Figura 34). Mediante un análisis de regresión de *Cox* se estimaron los *hazard-ratio* (HR) correspondientes a cada diplotipo ajustando para sexo, edad de seroconversión y tratamiento antiretroviral. Se obtuvo significación estadística en la comparación de los pacientes portadores del



diplotipo G++GL/- respecto a los portadores del diplotipo G++AS/G++AS (HR: 0.4; IC95% [0.2-0.8]; P=0.0008) (Figura 35).

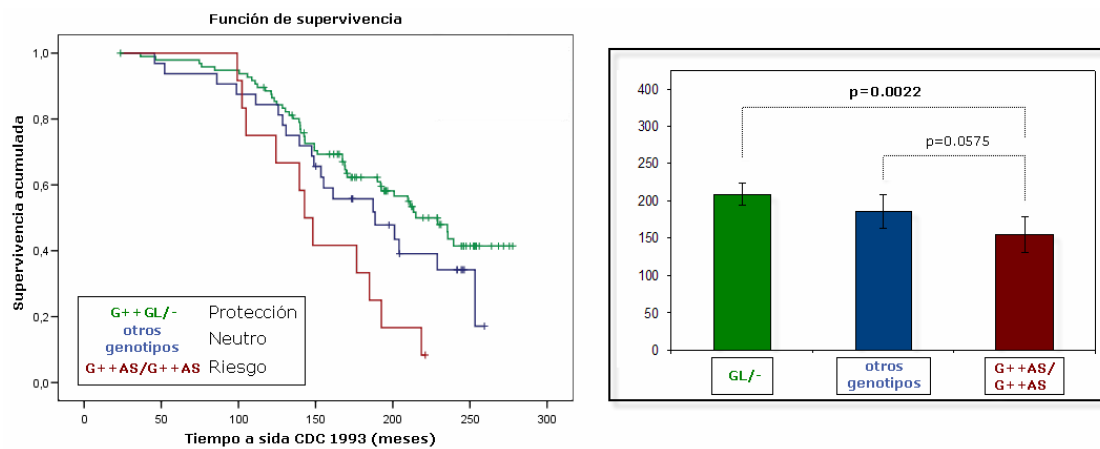


Figura 34. Función de supervivencia y tiempo medio de progresión a sida según CDC 1993 (en meses) de los pacientes SERLAC clasificados según el haplotipo para la región 5´-3´ (marcadores CDX, Bsm-I y Poly-A). Los p-valores significativos están denotados con letra en negra.

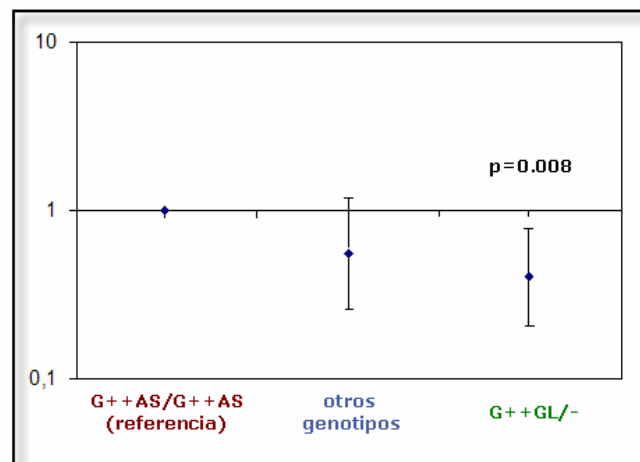


Figura 35.-Hazard-ratio para la comparación entre genotipos de protección (GL/-), "intermedio" (otro genotipos) y riesgo (AS/AS) para la región 3´UTR del gen *VDR*.



2.-Estudio de las variantes del gen *CCR5* y su asociación con el ritmo de progresión a sida

2.1- Análisis de la distribución de alelos y genotipos del gen *CCR5* en los pacientes agrupados según su estatus de progresión a sida CDC 93

La Tabla 16 muestra las frecuencias alélicas y la distribución de genotipos de los marcadores seleccionados del gen *CCR5* en los pacientes SERLAC. Todos los marcadores se hallaron en equilibrio Hardy-Weinberg. No se identificaron individuos homocigotos $\Delta 32$ en dicha cohorte

Se comparó la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos de progresión considerados sin que se observaran diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas (Tabla 17).

En la Tabla 16 se muestran los cuatro haplotipos posibles de la combinación de los haplotipos P1 y Px del promotor y de los alelos *wt* y $\Delta 32$ del exón 3. Se observaron tres de dichos haplotipos (denominados A, B y C) mientras que el cuarto haplotipo (D) no se detectó debido al desequilibrio de ligamiento total entre el haplotipo P1 del promotor y el alelo $\Delta 32$ del exón 3.

Tabla 16.- Haplotipos del gen *CCR5*.

	Haplotipos			
	A	B	C	D ^(a)
Promotor <i>CCR5</i>	P1	Px	P1	Px
rs333 ($\Delta 32$)	$\Delta 32$	wt	wt	$\Delta 32$

^(a) El haplotipo D no aparece en la muestra analizada debido a la existencia de desequilibrio de ligamiento entre los alelos P1 y $\Delta 32$ ($D' > 0.99$).

No se observaron diferencias significativas en la distribución de haplotipos en los pacientes agrupados según los criterios de progresión considerados. Mediante el software WHAP se realizó la asignación de diplotipos para cada individuo. La probabilidad de asignación fue en todos los casos superior al 0.95. De entre las comparaciones realizadas, se observaron diferencias



significativas en la distribución global de diplotipos entre los pacientes agrupados según el criterio de progresión sida CDC 93 ($\chi^2_{4d.f} = 10.72; p = 0.03$).

La frecuencia del diplotipo AB (P1Δ32/Pxwt) fue significativamente superior en los pacientes con CD4 > 200 cel/ μ L (OR= 0.26; 95%IC: 0.06-0.9, P=0.03) y en aquellos que no habían desarrollado sida CDC93 (OR= 0.24; 95%IC: 0.06-0.73, P=0.01).

La asociación del diplotipo AB con protección frente a la progresión a sida CDC 93 se mantuvo significativa después de una corrección para *multiple-testing*.

Tabla 17: Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en controles sanos y pacientes SERLAC.

SNP rs# (alias) (Localización cromosómica)	Genotipos/Alelos ^a	Distribución en controles y pacientes, n (%)	Distribución en pacientes con mala progresión, n (%)								
		SERLAC (n = 179) ^b	Categoría Clínica CDC			Recuento de células CD4			sida CDC 1993		
			Categoría A+B	Categoría C	P valor ^c	> 200/μL	< 200/μL	P valor ^c	No	Si	P valor ^c
Gen CCR5											
Promotor CCR5	P1P1	42 (23)	28 (23)	14 (25)	0.89	26 (25)	16 (21)	0.78	22 (26)	20 (21)	0.69
	P1Px	104 (58)	72 (58)	32 (58)		58 (56)	46 (61)		47 (57)	57 (60)	
	PxPx	32 (18)	23 (19)	9 (17)		19 (19)	17 (18)		14 (17)	18 (19)	
	P1	188 (53)	128 (52)	60 (55)		110 (53)	78 (49)	0.429	91 (55)	97 (51)	0.491
	Px	168 (47)	118 (48)	50 (45)		96 (47)	80 (51)		75 (45)	93 (49)	
rs333 (Δ32) (Chr3: 46389951)	wtwt	151 (85)	104 (85)	47 (85)	0.88	84 (82)	67 (89)	0.15	67 (81)	84 (88)	0.15
	wtΔ32	27 (15)	19 (15)	8 (15)		19 (18)	8 (11)		16 (19)	11 (12)	
	Δ32Δ32	0 (0)	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
	wt	329 (92)	227 (92)	102 (93)	0.915	187 (91)	142 (95)	0.192	150 (90)	179 (94)	0.197
	Δ32	27 (8)	19 (8)	8 (7)		19 (9)	8 (5)		16 (10)	11 (6)	
Haplotipo CCR5 ^d	A	28 (8)	8 (7)	20 (8)	0.765	18 (8)	8 (4)	0.474	16 (9)	12 (4)	0.438
	B	170 (48)	50 (45)	120 (48)		98 (48)	72 (48)		78 (47)	94 (47)	
	C	160 (44)	52 (48)	108 (44)		90 (44)	70 (48)		72 (44)	84 (43)	
Diplotipo CCR5	AB	17 (10)	14 (11)	3 (5)	0.45	14 (8)	3 (4)	0.16	13 (16)	4 (4)	0.03
	BB	31 (17)	23 (19)	8 (15)		18 (10)	13 (17)		14 (17)	17 (18)	
	CA	10 (6)	5 (4)	5 (9)		5 (3)	5 (7)		3 (4)	7 (7)	
	CB	91 (51)	61 (50)	30 (55)		47 (27)	44 (59)		36 (43)	55 (58)	
	CC	29 (16)	20 (16)	9 (16)		19 (11)	10 (13)		17 (20)	12 (13)	
	noAB	161 (90)	109 (89)	52 (95)	0.21	89 (92)	72 (96)	0.03	70 (84)	91 (96)	0.01

^a Haplotipos de CCR5; haplotipo A (P1Δ32), haplotipo B (Pxwt), haplotipo C (P1wt)

^b Los genotipos para el promotor CCR5 y rs333 no pudieron ser obtenidos para 1 paciente SERLAC.

^c P valor del análisis mediante tablas de contingencia de la distribución de alelos y genotipos entre los grupos considerados. Los P valores estadísticamente significativos están denotados mediante letra cursiva. Los p valores que mantienen la significación después de la corrección por multiple-testing están denotados en negrita.



2.2- Estudio de supervivencia de los pacientes SERLAC según el diplotipo del gen *CCR5*.

La Figura 36 muestra las curvas de supervivencia de los pacientes SERLAC agrupados según el diplotipo de *CCR5*. El diplotipo que presentó un tiempo de progresión más largo fue el diplotipo AB, 221 (IC95%: 193-248) meses (Figura 36c), siendo los portadores del diplotipo CA los que presentaron una progresión más rápida a sida. Las curvas de supervivencia de ambos diplotipos (Figura 36a) fueron significativamente distintas (Log-rank test, $P=0.017$). Asimismo se observaron diferencias significativas entre las curvas de progresión a sida entre el diplotipo AB y los diplotipos CB ($P=0.038$) y CC ($P=0.38$) (Figura 36c).

Cuando se comparó el diplotipo AB con el resto de diplotipos considerados en un mismo grupo (noAB) se observaron diferencias marginales en las curvas de progresión ($P=0.054$).

Mediante un análisis de regresión de *Cox* se estimaron los *hazard-ratio* (HR) correspondientes a cada diplotipo ajustando para sexo, edad de seroconversión y tratamiento antiretroviral. Se obtuvo significación estadística en las comparaciones: CA vs. AB (HR: 4.8; IC95% [1.3-17.3]; $P=0.02$) (Figura 36d) y CB vs. AB (HR: 2.4; IC95% [1.02-8]; $P=0.05$) y diferencias marginales en la comparación AB vs. noAB (HR: 0.38; IC95% [0.14-1.05]; $P=0.06$) (Figura 36b).

3.-Estudio del efecto combinado de los genes *VDR* y *CCR5* en el ritmo de progresión a sida

3.1- Estudio de supervivencia según el genotipo combinado para los genes *VDR* y *CCR5*.

En función de los resultados obtenidos se evaluó la posible interacción o acción sinérgica de los genes *CCR5* y *VDR* con la progresión a sida. Para ello los individuos se agruparon en función de los genotipos de protección y riesgo previamente identificados para cada loci. Para el *locus* de *CCR5* se consideró de protección al diplotipo AB y de riesgo al diplotipo noAB. Asimismo, para el *locus* *VDR* se consideró de protección al diplotipo G+ +GL/- y de riesgo al diplotipo G+ +AS/G+ +AS.

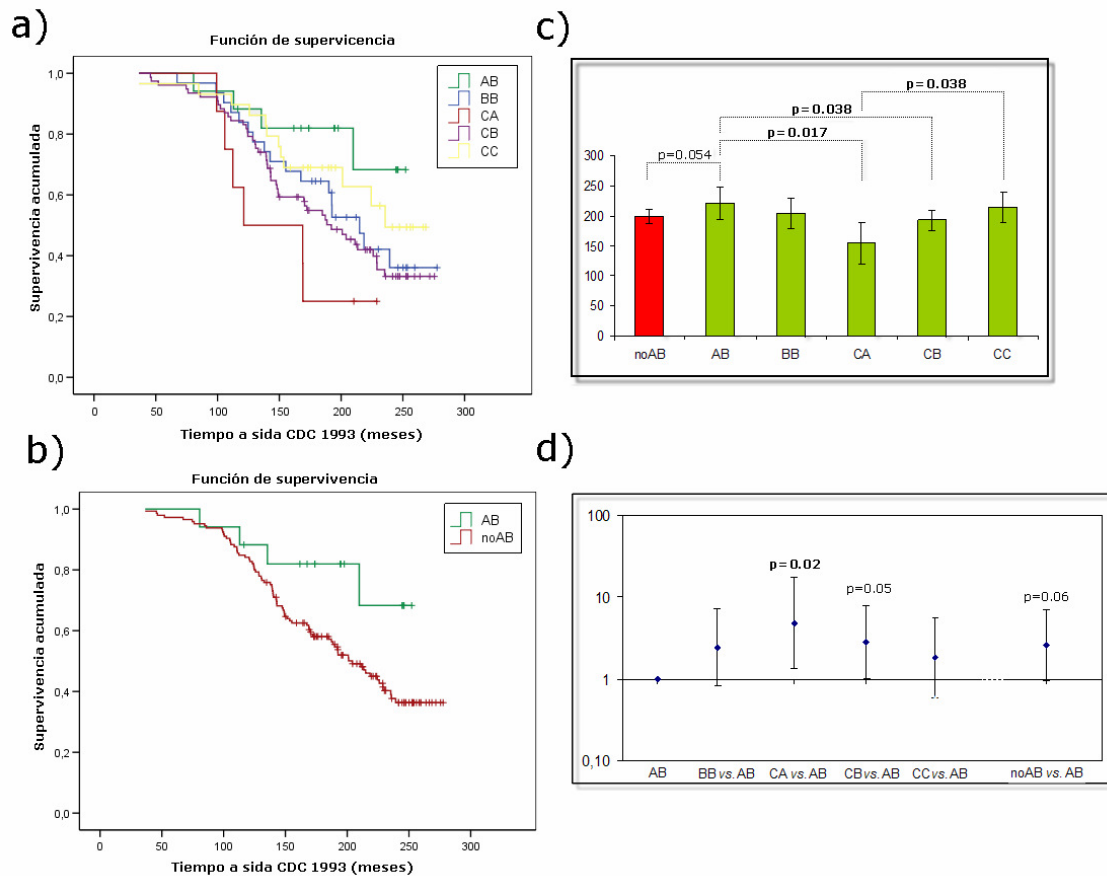


Figura 36. Función de supervivencia y tiempo medio de progresión a sida según CDC 1993 (en meses) de los pacientes SERLAC clasificados; a) según el diplotipo que presenta de los observados en la población, y b) según el diplotipo que presenta después de considerar los grupos extremos en cuanto a riesgo o protección (noAB vs. AB). c) tiempo medio de progresión a sida según CDC 1993 de los pacientes clasificados según el diplotipo para CCR5. d) Hazard-ratio para la comparación entre diplotipos de CCR5 en la población SERLAC. Los p-valores significativos están denotados en letra negra.

Sólo se consideraron en el estudio de supervivencia los pacientes que eran portadores de alguna de las configuraciones diplotípicas anteriormente descritas. Asignando una puntuación de 0 a los diplotipos de protección y una puntuación de 1 a los diplotipos de riesgo se obtuvieron tres grupos de combinaciones diplotípicas.

- I. Pacientes con puntuación total 0 (protección a *VDR* y protección a *CCR5*)
- II. Pacientes con puntuación total 1 (protección a *VDR* o protección a *CCR5*)
- III. Pacientes con puntuación total 2 (riesgo a *VDR* y riesgo a *CCR5*)

Se evaluó las curvas de supervivencia de los pacientes agrupados según dichas puntuaciones obteniéndose curvas de supervivencia claramente diferenciadas entre



los tres grupos (Figura 37A). Las curvas de supervivencia fueron significativamente distintas para todas las comparaciones realizadas (Figura 37B).

El tiempo medio de progresión a sida de los pacientes con una puntuación de 0 fue de 234 (IC95%: 215-256) meses, los pacientes con puntuación 1 de 198 (IC95%: 184-211) meses y los pacientes con puntuación 2 de 154 (IC95%: 313-178). La diferencia en el tiempo medio de progresión entre los grupo extremos de 80 meses ($p=0.00035$).

Mediante un análisis de Cox se obtuvo un valor de *hazard-ratio* de 9 (IC95%: 2-41; $P=0.0045$) para la comparación de los pacientes con puntuación 0 respecto a los pacientes con puntuación 2 (Figura 38).

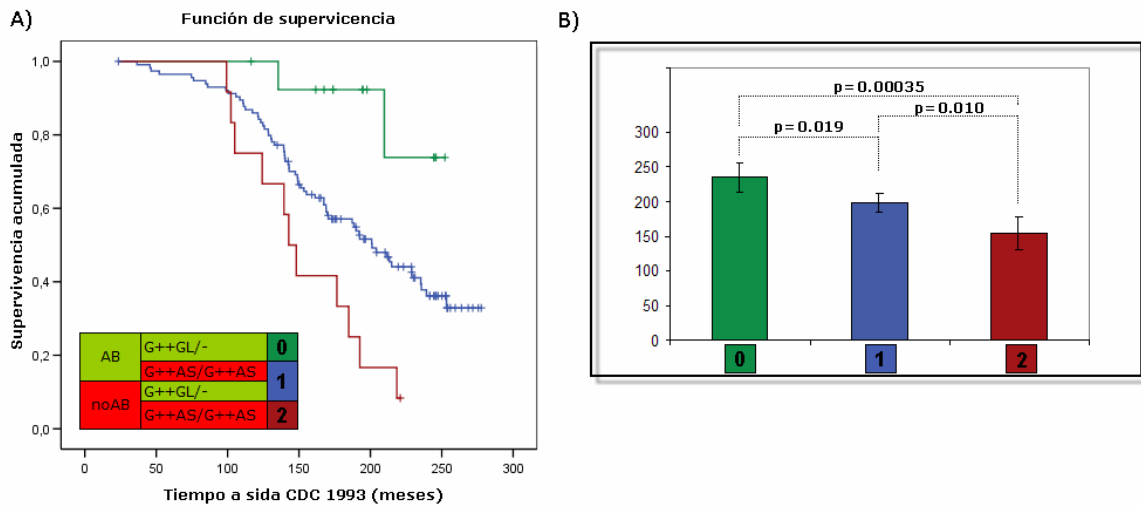


Figura 37.- Función de supervivencia y tiempo medio de progresión (en meses) de los pacientes SERLAC clasificados según el genotipo combinado de protección (1), “intermedio” (2) y riesgo (3) para los genes *CCR5* y *VDR*. Los p-valores significativos están denotados con letra en negrita.

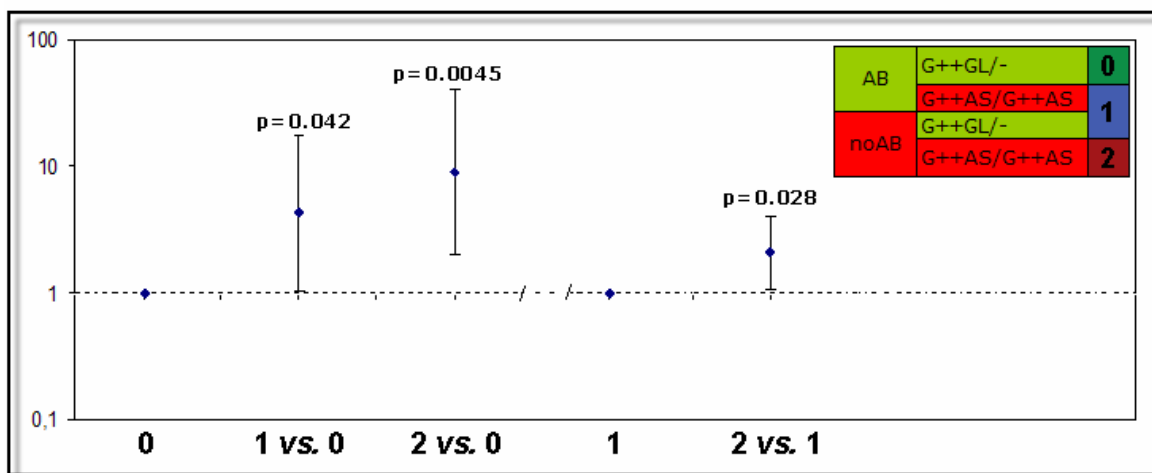


Figura 38.- Hazard-ratio para la comparación entre genotipos combinados de protección (1), “intermedio” (2) y riesgo (3) para los genes *CCR5* y *VDR*. Los p-valores significativos están denotados mediante letra en negrita.



DETERMINACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL DE LA ASOCIACIÓN DESCRITA ENTRE VARIANTES DEL *LOCUS VDR* INFECCIÓN POR VIH-1 Y PROGRESIÓN A SIDA.

Población de estudio.

Se seleccionaron 30 pacientes de la cohorte total en seguimiento en la unidad de VIH/sida del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida. Todos los pacientes seleccionados se habían infectado por VIH por el intercambio de jeringas consecuencia de la inyección de drogas por vía parenteral. 15 pacientes eran homocigotos para los alelos Bsm-I-A y polyA-S (diplotipo AS) y otros 15 lo eran para los alelos Bsm-I-G y polyA-L (diplotipo GL). En todos los pacientes seleccionados se confirmó su condición de homocigotos para el alelo *wt* del gen *CCR5*. Asimismo se seleccionó un grupo de 30 individuos control con la misma distribución de genotipos para los genes *VDR* y *CCR5*.

La distribución de edades y sexo fue similar entre los grupos seleccionados.

Este estudio fue aprobado por el comité ético del hospital de procedencia de las muestras (Hospital Arnau de Vilanova de Lleida). Todos los participantes del estudio firmaron un documento de consentimiento informado.

Locí y polimorfismos seleccionados:

<i>Locus VDR</i>	
	Región 3'UTR: rs1544410 (Bsm-I) y rs17878969 (PolyA)
<i>Locus CCR5:</i>	
	Exón 3: rs333 ($\Delta 32$)

Con el objetivo de determinar la relación genotipo-fenotipo de las variantes del *locus VDR* asociadas con susceptibilidad a la infección y ritmo de progresión a sida se han evaluado dos hipótesis:

- i) el desplazamiento Th1 > Th2 varía en función del genotipo *VDR*
- ii) los niveles del receptor CCR5 y su ligando natural RANTES varían en función del genotipo *VDR*.

Hipótesis: Si los haplotipos caracterizados para el *locus VDR* están relacionados con la vulnerabilidad a la infección por VIH y ritmo de progresión a sida podemos esperar que los individuos con genotipos que confieren protección frente a la infección por VIH y progresión a sida presenten un menor desplazamiento del balance Th1/Th2 hacia la respuesta Th2. Además dichos genotipos de protección estarían relacionados con unos bajos niveles de expresión del receptor CCR5. Por el contrario los individuos con genotipos que confieren riesgo frente a la infección por VIH y progresión a sida presentarían un mayor desplazamiento del balance Th1/Th2 hacia una respuesta Th2 y mayores niveles de expresión del receptor CCR5.

Diseño del estudio:

En los pacientes VIH+ y controles sanos agrupados según su genotipo del gen *VDR* se determinó:

- A.- Los niveles plasmáticos de las citoquinas Th1 específicas (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y Th2 específicas (IL-4, IL-6 e IL-10).
- B.- Los porcentajes de células CD4+ y CD8+ en sangre periférica que expresan CCR5 y la intensidad de fluorescencia media (MFI) para CCR5, mediante citometría.
- C.- Los niveles plasmáticos de RANTES, ligando natural de CCR5.



1.- Análisis del balance Th1-Th2 según el genotipo para *VDR*

A partir de sangre periférica total se determinaron los niveles plasmáticos de las citoquinas Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) (Figura 39) en pacientes VIH+.

Excepto en el caso de TNF- α , se pudo observar que los niveles de citoquinas Th1 son ligeramente superiores en los pacientes con genotipo de riesgo AS/AS para la región 3'UTR del gen *VDR*. Por el contrario, los niveles de citoquinas Th2 son superiores en los pacientes con genotipo de protección. Sin embargo, en ningún caso las diferencias llegan la significación estadística.

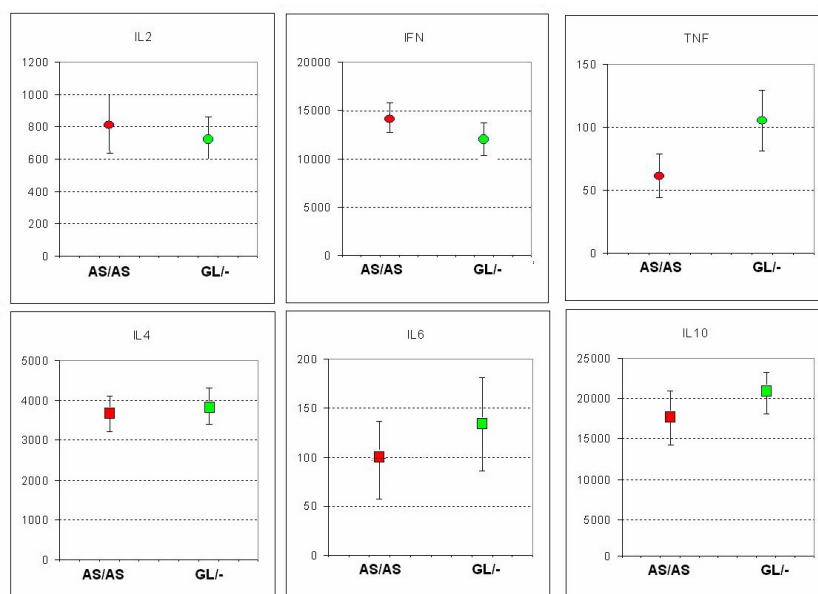


Figura 39.- Cuantificación de los niveles de citoquinas Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) en pacientes HIV+ clasificados según el genotipo para el locus *VDR*. Según los resultados obtenidos en los estudios de asociación, se considera diplotipo de riesgo a los individuos homocigotos AS/AS (símbolos rojos) y diplotipo de protección a los portadores de uno o dos alelos GL (símbolos verdes). La concentración de la citoquina cuantificada está en pg/ml.

2.- Cuantificación de los niveles del receptor CCR5 y su ligando natural RANTES según el genotipo para *VDR*.

Se seleccionaron 27 pacientes VIH+ (11 con genotipo AS/AS para la región 3'UTR del gen *VDR*, y 16 con genotipo GL/-) y 14 controles sanos (3 AS/AS y 12 GL/-). Los pacientes se han agrupado según su estatus (HIV+ y controles sanos). A partir de sangre periférica total se han determinado los porcentajes de células



CD4+ y CD8+ que expresan CCR5 y la intensidad de fluorescencia media (MFI) para CCR5 mediante citometría de flujo. Asimismo, se determinaron los niveles plasmáticos de RANTES, ligando natural de CCR5.

La intensidad de fluorescencia media (MFI, del inglés *median fluorescence intensity*) para CCR5 en linfocitos totales (Figura 40A) y en células CD4+ (Figura 40B) no muestra diferencias significativas según el genotipo en los pacientes VIH+. Por el contrario, en los controles sanos la MFI es significativamente menor en los individuos con genotipo de protección (GL/-) en linfocitos CD4+ ($p=0.03$). Los niveles plasmáticos de RANTES (Figura 40C) son similares en los diferentes grupos considerados.

Estos resultados indicarían que la protección conferida por el genotipo (GL/-) podría estar relacionada con la menor densidad de CCR5 en membrana observada en estos individuos.

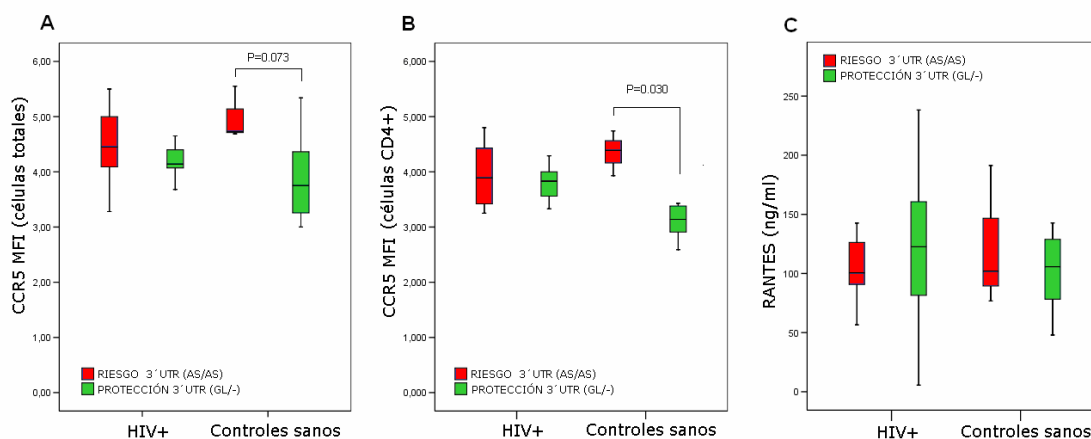


Figura 40.- Diagrama de cajas donde se representa la intensidad de fluorescencia media (MFI) para CCR5 en linfocitos totales (A) y en células CD4+ (B) y los niveles plasmáticos de RANTES (C) en pacientes HIV+ y controles sanos, distribuidos según el diplotipo 3' UTR del locus *VDR*. Según los resultados obtenidos en los estudios de asociación, se considera diplotipo de riesgo a los individuos homocigotos AS/AS (símbolos rojos) y diplotipo de protección a los portadores de uno o dos haplotipos GL (símbolos verdes).



DISCUSIÓN



1. Descripción de las cohortes incluidas en los estudios.

Todos los sujetos incluidos en las cohortes de estudio han participado dando su consentimiento informado. Todos los estudios han sido aprobados por el comité ético del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida y del Hospital Universitario Valme de Sevilla.

1.1- Cohorte de pacientes VIH+.

La unidad de sida del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida realiza el seguimiento de un total de 668 pacientes seropositivos de los cuales el 70% (pertenece al grupo de riesgo de adictos a droga por vía parenteral (ADVP) (Figura 41).

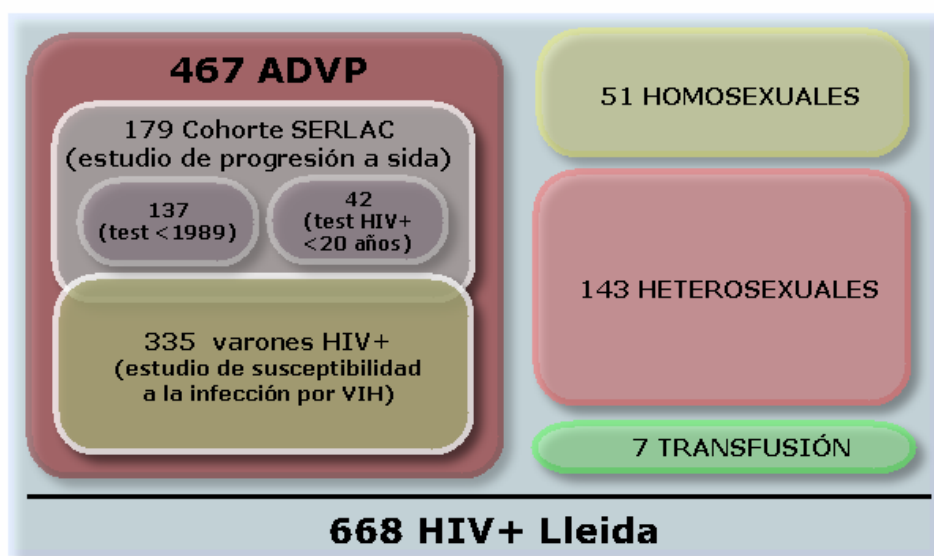


Figura 41.- Distribución de las cohortes de individuos VIH-1+ utilizadas en este estudio.

Con el objeto de minimizar las fuentes de variabilidad debidas a la selección de los pacientes, el estudio se ha centrado en pacientes ADVP (467) de origen caucásico, de los cuales han surgido las distintas cohortes analizadas; cohorte SERLAC y cohorte de VIH+. La selección de pacientes ADVP-VIH+ se justifica por varias razones. En primer lugar el grupo de pacientes ADVP es el más numeroso del total de pacientes disponibles en la muestra. Los estudios de asociación



precisan de un número elevado de pacientes para poder realizar el análisis estadístico de los datos. En segundo lugar, esta documentado que la historia natural de la infección presenta ciertas características clínicas que pueden variar según sea la vía de transmisión. Los pacientes infectados por vía sanguínea a causa del intercambio de jeringas, presentan condiciones socio-económico-sanitarias características de dicho grupo de riesgo que pueden influir de forma significativa en el pronóstico de la enfermedad. La progresión clínica de los pacientes AVDP puede verse seriamente afectada por dichas características, que hacen que este grupo quede claramente diferenciado del resto de pacientes infectados. Finalmente, la selección de pacientes (y controles sanos) de origen caucásico se justifica con el objeto de evitar la variabilidad genética inherente a las distintas poblaciones humanas que podría enmascarar o confundir los resultados obtenidos.

Para el estudio de susceptibilidad a la infección la cohorte de pacientes infectados (VIH+) se ha constituido a partir de la selección de 335 hombres del total 467 de pacientes AVDP-VIH+. En dicho grupo, la edad media en el primer test de seropositividad fue de 38 (23-54) años. Del total de sujetos de esta cohorte 27 (6%) presentaron el primer test seropositivo antes de 1984, 99 (30%) en el periodo comprendido entre 1985 y 1989, 100 (32%) entre 1990 y 1994 y 100 (32%) en el periodo 1995-1999. Un total de 320 (95.5%) de los hombres seleccionados presentaron infección por el virus de la hepatitis C, siendo esta el tipo de infección viral crónica transmitida con mayor frecuencia por el intercambio de jeringas. El porcentaje de pacientes con hepatitis C positiva observado en dicha cohorte fue significativamente más alto que puede ser observado en la población general, que oscila entre el 1-2% de los individuos.

Debido a las características propias de la historia natural de la infección por el VIH-1, los pacientes seropositivos pueden haberse infectado entre pocos meses a varios años antes de ser diagnosticados como pacientes VIH+. Este hecho supone que la fecha de seroconversión no sea conocida en la mayoría de los pacientes seleccionados. Por ello, la cohorte de pacientes AVDH-VIH+ analizada en este



estudio debe ser considerada una cohorte de pacientes seroprevalentes con fecha de infección no conocida.

Este aspecto supone una seria limitación para los estudios de progresión de la enfermedad, dado que para los mismos es necesario establecer un punto de referencia temporal desde el cual estimar el tiempo transcurrido hasta el desarrollo del evento considerado. Con el objeto de minimizar el efecto de dicha limitación se realizaron una serie de consideraciones en la selección de los individuos, que permitieran establecer, con la mayor precisión posible, la fecha de seroconversión de cada paciente. Así, del total de 468 pacientes ADVP VIH-1+ se seleccionaron aquellos que presentaron un test de seropositividad anterior al 31 de diciembre de 1989 (137 pacientes). Con ello se pretendía evitar la incorporación a la cohorte de los pacientes con fecha de un primer test positivo excesivamente cercana a la fecha de finalización del estudio (febrero de 2005). En los pacientes así seleccionados, la fecha de seroconversión se estimó como el tiempo medio entre la fecha del primer test seropositivo y el 1 de enero de 1981, año en el que fue descrito el primer caso VIH+ en Cataluña (Vilaseca, Arnau et al. 1982).

Además de estos, se incluyeron los pacientes con una edad inferior a los 20 años en el momento del primer test de seropositividad (42 pacientes). En estos pacientes la fecha de seroconversión fue estimada como el tiempo medio entre la fecha del primer test positivo para VIH y la fecha en la que el paciente tenía 15 años, ya que de acuerdo con los datos epidemiológicos de VIH del Centro Nacional de Epidemiología en España, en el periodo comprendido entre los años 1981 y 2004 sólo fueron descritos 3 casos de sida para el grupo de ADVP con una edad inferior a los 15 años (CNE 2005) (Figura 42).

Siguiendo estos criterios el total de pacientes seleccionados para el estudio de progresión fue de 179 pacientes de origen caucasiano y pertenecientes al grupo de riesgo de adictos a droga por vía parenteral (ADVP), constituyendo estos la cohorte SERLAC (*Seroprevalent Lleida Aids Cohort*).

El tiempo de seguimiento para cada paciente se estableció desde la fecha estimada de seroconversión a la fecha de su última visita registrada en la unidad



de sida o fecha final del estudio (febrero de 2005). El tiempo medio de seguimiento fue de 215 meses con un mínimo 43 y un máximo de 277 meses). De los 179 pacientes seleccionados para el estudio de progresión, 12 (7%) no estaban recibiendo tratamiento antiretroviral al final del estudio, 72 (43%) estaban siendo tratados con dos análogos de nucleótidos, y 95 (57%) estaban siendo tratados con una combinación de dos análogos de nucleótidos y un inhibidor de proteasa. El tiempo medio de tratamiento fue de 69 meses para aquellos que recibían dos análogos y de 88 meses para los que estaban siendo tratados con dos análogos y un inhibidor de la proteasa.

Se realizó un seguimiento clínico de los pacientes incluidos en la cohorte SERLAC registrándose todos los episodios clínicos relacionados con VIH y el uso de fármacos antiretrovirales, además de los datos correspondientes a los análisis clínico-inmunológicos de rutina.

SIDA EN ESPAÑA. DATOS ACUMULADOS DESDE 1981
Casos por categoría de transmisión y sexo, según la edad.
Registro Nacional de SIDA. Fecha de actualización: 30 de junio de 2005.

Edad	Homo/- bisex.	UDVP		Hemoderivados		Transfusión		Madre-Hijo		Heterosexual		Otros/N.C.		Total		TOTAL
		H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	
<1	193	199	.	.	2	1	195	200	395
1-2	3	.	122	117	.	.	.	1	125	118	243
3-4	.	.	.	2	1	3	1	53	71	.	.	2	3	60	76	136
5-9	.	.	.	30	2	3	3	53	60	.	.	1	1	87	66	153
10-12	.	.	.	30	2	3	3	9	12	.	.	.	2	42	19	61
Total Pediátricos	.	.	.	62	5	12	7	430	459	.	.	5	8	509	479	988
13-14	.	3	.	28	.	2	2	2	5	.	.	1	.	36	7	43
15-19	7	207	62	77	1	5	4	5	7	15	25	5	6	321	106	427
20-24	247	2640	951	107	6	2	6	.	1	144	332	55	26	3195	1321	4516
25-29	1143	9759	2638	105	7	14	8	.	.	602	995	275	102	11898	3750	15648
30-34	1940	12591	2737	105	7	22	19	.	.	1196	1110	490	121	16444	3994	20438
35-39	1927	7447	1439	86	10	16	23	.	.	1255	783	452	92	11193	2347	13540
40-44	1570	2562	502	58	7	28	10	.	.	998	412	356	78	5672	1009	6681
45-49	1223	698	92	26	7	19	23	.	.	811	225	298	54	3074	401	3475
50-54	694	168	16	29	6	22	18	.	.	567	154	228	41	1708	235	1943
55-59	452	57	10	18	5	19	15	.	.	417	101	187	24	1150	155	1305
60 y más	538	39	2	27	10	49	32	.	.	673	165	298	54	1624	263	1887
Total adultos	9741	36371	8449	655	65	198	159	7	13	6688	4303	2645	598	56315	13588	69903
Edad desconocida	12	84	18	1	1	17	3	8	4	122	26	148
Total	9753	36455	8467	728	72	210	166	437	472	6705	4306	2658	610	56946	14093	71039

Homo/bisex.=Hombres homo y bisexuales; UDVP=Usuarios de drogas por vía parenteral, incluidos los hombres homo y bisexuales usuarios de drogas por vía parenteral; Hemoderivados=Receptores de hemoderivados; Transfusión=Receptores de transfusiones sanguíneas; Heterosexual=Relaciones heterosexuales de riesgo; Otros/N.C.=Otras exposiciones de riesgo o no conocidas ; H=Hombre; M=Mujer.

Figura 42.- Distribución de casos de sida en España desde 1981 a 2006. Imagen adaptada del informe "Vigilancia epidemiológica del sida en España. Registro Nacional de casos de sida. Año 2005" (CNE 2005).



1.2- Cohorte de Expuestos no Infectados (ENI).-

La cohorte de expuestos no infectados (ENI) está formada por un total de 125 individuos pertenecientes a dos subcohortes, una procedente del Hospital Provincial de Lleida y otra procedente del Hospital Valme de Sevilla. Del total de sujetos incluidos en la cohorte ENI, 78 fueron seleccionados del grupo de voluntarios ADVP que participaban en un estudio epidemiológico sobre la infección por *Leishmania* que tuvo lugar de abril de 1998 a abril de 1999 en Sevilla. El resto de individuos (47) fueron seleccionados de un grupo de ADVP que participaron en un programa de rehabilitación en el periodo comprendido entre 1997 y 1999 en el Hospital Provincial del Lleida.

El periodo medio de consumo de droga por vía parenteral en la cohorte ENI fue de 36 (3-240) meses en el grupo de Sevilla y 27 (5-150) meses en el grupo de Lleida. Todos los sujetos incluidos en la cohorte ENI eran asintomáticos y presentaban un test de seronegatividad para anticuerpos frente al VIH-1 en el momento de su inclusión. Con la intención de homogeneizar la muestra seleccionada sólo se incluyeron los varones ya que estos representaban el 98% del total de individuos ENI (Figura 43).

El criterio de inclusión de un individuo ADVP en la cohorte ENI fue el hecho de haber compartido agujas hipodérmicas durante al menos un periodo mínimo de tres meses.

Los individuos incluidos en la cohorte ENI presentan características que apoyan su condición de expuestos al VIH-1. Así, la frecuencia del alelo $\Delta 32$ del gen *CCR5*, reconocido como factor de protección frente a la infección por VIH, fue ligeramente superior en la cohorte ENI (11%) que en controles sanos (%) o pacientes infectados (8%).

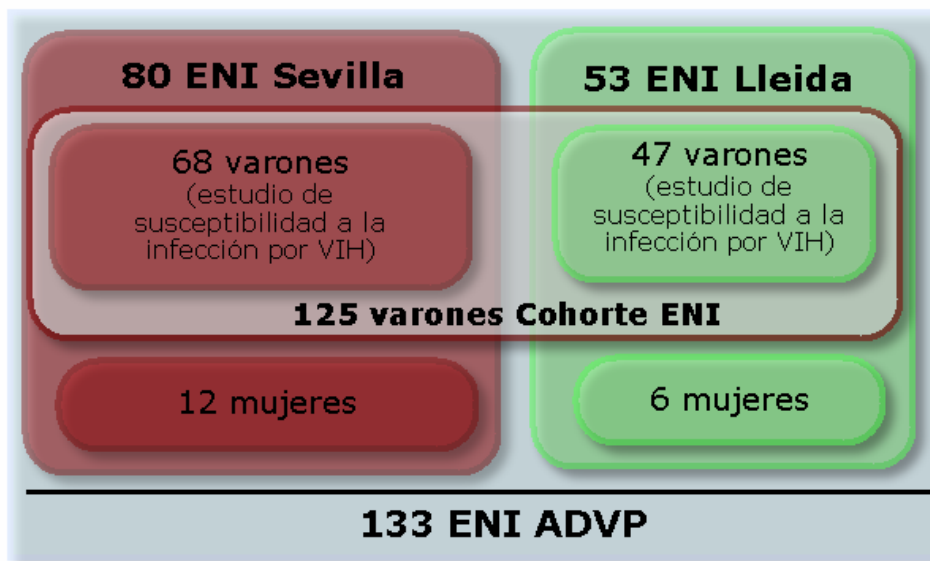


Figura 43.- Distribución de individuos de la cohorte ENI utilizada en el estudio de susceptibilidad a la infección por VIH-1.

Además, la practica de una actividad de riesgo para la infección por VIH como es el consumo de drogas por vía parenteral con intercambio de jeringas, favorece la aparición de infecciones que se transmiten conjuntamente con el VIH, como es el caso de la infección por el virus de la hepatitis C. Un total 100 (80%) individuos de la cohorte ENI eran positivos para hepatitis C mientras que el porcentaje de dicha infección en la población general española es tan solo del 1 al 2%.

1.3- Cohorte de controles sanos.-

La cohorte de controles sanos la comprenden un total de 200 individuos (124 hombres y 76 mujeres) de origen caucasiano donantes de sangre y que presentan un test negativo para VIH y para hepatitis C. La edad media de la cohorte fue de 36 (17-61) años.

De esta cohorte se seleccionaron los 124 varones para formar la cohorte control en el estudio de susceptibilidad a la infección.

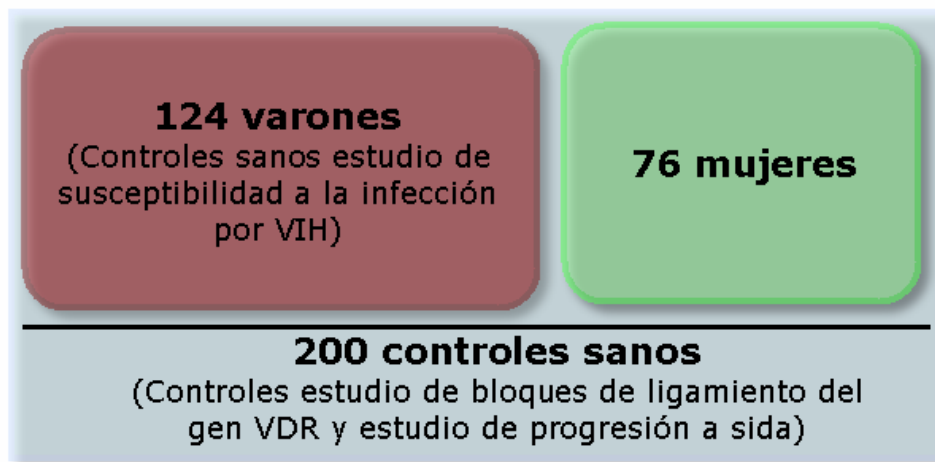


Figura 44.- Distribución de individuos de la cohorte de controles sanos.

2.-Valoración general de los estudios caso-control.-

Numerosos autores consideran el estudio caso-control como uno de los principales avances de la epidemiología moderna (Rothman KJ 1998).

El diseño de casos y controles es muy utilizado en enfermedades de baja prevalencia o con periodos de latencia largos, donde los enfermos están disponibles y no es necesario esperar un prolongado periodo de tiempo desde el inicio del estudio para obtener los datos. Es por ello que este tipo de diseño de estudio observacional resulta recomendable como una aproximación válida para el análisis de los factores genéticos implicados en las enfermedades complejas.

Los estudios caso-control identifican a las personas que han tenido un evento (casos) y a un grupo de personas que no lo han desarrollado (controles). La definición de los controles es un paso crítico en el estudio caso-control. Idealmente son una muestra aleatoria de la población general en la que se originaron los casos y son todos aquellos individuos que de haber desarrollado el evento de interés habrían sido considerados como casos en el estudio.

El estudio caso-control asume como hipótesis el hecho de que cualquier diferencia observada entre los grupos de casos y controles puede estar relacionada con la manifestación del evento. Para que esto sea así la población de casos y de controles debe seleccionarse de tal forma que sólo difieran en la manifestación del



evento, siendo el resto de características comparables entre los grupos. De esta forma se minimiza el problema potencialmente más grave en los estudios caso-control, la selección de grupos que no sean comparables, introduciendo sesgos que disminuyan la validez de los resultados obtenidos.

Los aspectos considerados frecuentemente en la selección de casos y controles están relacionados con el origen geográfico, sexo, edad y condición socio-sanitaria que deben ser similares entre los dos grupos.

En nuestro caso el genotipo es estudiado con factor de riesgo, siendo este inherente a la muestra y en ningún momento es utilizado como criterio de selección. Por ello cualquier diferencia en la distribución de genotipos entre casos y controles podrá ser asociada a la manifestación del evento considerado siempre que el resto de características se mantengan de forma similar entre los grupos considerados.

La población general no se compara con nuestras poblaciones de estudio. En el caso del estudio de susceptibilidad a infección por VIH no es comparable porque los casos (pacientes VIH+) no están sometidos a las mismas condiciones socio-sanitarias que la población general, siendo la práctica de la drogadicción un factor clave en su caracterización. El grado de exposición al virus no es comparable entre a población general y la de ADVP. Por ello, la población control, en un estudio de susceptibilidad a la infección por VIH debe provenir de la población general que presente un grado de exposición al virus similar a la de nuestros casos, es decir, aquellos individuos de la población general que sean ADVP.

En el estudio de progresión el grupo de controles está extraído de la población de donde también fueron seleccionados los casos y fue comparada la distribución de genotipos entre aquellos pacientes que habían desarrollado el evento de progresión (casos) y aquellos que se mantienen libres del evento (controles). Cuando se realizó la comparación entre casos y controles en el estudio de progresión a sida en la cohorte SERLAC ambos grupos han tenido el mismo grado de exposición al factor causante de la enfermedad, la infección por VIH.

La selección de los controles dentro de la cohorte SERLAC constituye un grupo control ideal. Es lo que algunos autores denominan estudio de casos y controles



“anidado” en una cohorte, ya que tanto casos como controles pertenecen a la misma cohorte o población fuente, que está bien definida y en la cual estudiamos todos los casos que surgen en esa cohorte y como controles se seleccionan aquellos que no manifiestan el evento

3.-Valoración de los resultados del análisis de la estructura de bloques de la región genómica del *VDR*.-

La mayor limitación que ha existido en los estudios de asociación de polimorfismos del *VDR* en enfermedades complejas ha sido el análisis de un número limitado de dichos polimorfismos (Fang, van Meurs et al. 2005) y por lo tanto la falta de conocimiento acerca de la influencia y relación con otros polimorfismos del gen. Por este motivo la caracterización de la estructura de bloques de ligamiento del gen *VDR* en la población de estudio resulta indispensable. A partir de ella será posible seleccionar los polimorfismos que capturen toda la variabilidad existente en la región genómica del *VDR*.

A partir de los datos obtenidos de HapMap, se realizó un estudio preliminar de la estructura de bloques de la región genómica del gen *VDR*, la región cromosómica 12q13.11 (46680K-46470K) en la muestra de población CEU de origen caucásico. En dicha región, además del gen *VDR*, se localizan dos genes, *HDAC7* (*histone deacetylase 7*) y *COL2A1* (*collagen type 2A1*), cuya función podría relacionarse con las asociaciones descritas para el gen *VDR*. El gen *HDAC7* codifica para una enzima perteneciente a la familia de la Clase II de histonas deacetilasas implicadas en la regulación de la expresión génica. *HDAC7* ha sido recientemente implicada en la regulación de genes implicados en la selección, tanto positiva como negativa, de timocitos durante su maduración en el timo (Mol Cell Biol. 2007 Jul;27(14):5184-200. Epub 2007 Apr 30). Por otra parte, el gen *COL2A1* codifica para la cadena alfa (II) del colágeno tipo 2. Las mutaciones en el gene *COL2A1* dan lugar a la manifestación de diversas enfermedades esqueléticas hereditarias. Si bien ambos genes vecinos desarrollan funciones potencialmente relacionadas con las atribuidas al gen *VDR*, regulación génica en células del sistema inmune para *HDAC7* y metabolismo esquelético para *COL2A1*, el patrón



de desequilibrio de ligamiento observado en la muestra de HapMap parece indicar que las variantes localizadas en el gen *VDR* no actúan como marcadoras de los genes vecinos, ya que entre estos se observa un bajo desequilibrio de ligamiento. Así pues, las asociaciones descritas de variantes del gen *VDR* con distintas enfermedades deben ser consideradas como causa directa de disfunciones en dicho gen y no pueden relacionarse con variaciones presentes en los genes vecinos.

A continuación realizamos el estudio del patrón LD en la población control de 200 individuos de origen caucásico. Para llevar a cabo dicho análisis se seleccionaron 11 polimorfismos localizados a lo largo de toda la secuencia del gen *VDR*, prescindiendo de aquellos que se localizaban en los genes vecinos. Los resultados obtenidos mostraron una alta concordancia con el patrón descrito a partir de los datos de HapMap y con los patrones anteriormente descritos por otros autores (Nejentsev, Godfrey et al. 2004; Fang, van Meurs et al. 2005). Se pueden distinguir dos regiones del gen *VDR* con un alto desequilibrio de ligamiento que forman bloques compactos en las regiones 5'UTR y 3'UTR. Sin embargo la región central del gen, donde se localiza la mayor parte de la región codificante, se caracteriza por presentar un bajo desequilibrio de ligamiento. En concreto, la región donde se localiza el exon 2, se corresponde con una zona de bajo LD y alta recombinación, tanto en nuestra muestra de controles como en la muestra analizada de HapMap. Dicha región puede ser considerada un *hotspot* de recombinación.

A la vista de los resultados obtenidos seleccionamos cinco polimorfismos para ser incorporados en los estudios observacionales que llevaríamos a cabo posteriormente. Dos de estos polimorfismos se localizan en la región 5'UTR (*Cdx* y *A1012G*), otro está localizado en el exón 2 (*Fok-I*) y dos más localizados en la región 3'UTR (*Bsm-I* y *polyA*). Se seleccionaron estos cinco polimorfismos como representativos de los bloques identificados en el gen *VDR*, además de presentar un efecto funcional conocido previamente.



Utilizando estos cinco polimorfismos evaluamos la estructura de LD en las cinco cohortes utilizadas, cohorte de varones controles sanos, cohorte ENI, cohorte de varones VIH+, cohorte SERLAC y la cohorte total de controles sanos. Las características principales del patrón de bloques observado en las cinco cohortes presento una alta correlación con los datos previamente descritos, que revelan un patrón de bloques disperso en el gen *VDR* (Nejentsev, Godfrey et al. 2004; Fang, van Meurs et al. 2005) (Figura 45). El bloque en la región 3'UTR, que puede observarse en nuestro estudio (bk2 en la Figura 45), se corresponde con el bloque 5 y el 7° bloque consenso descrito por Fang *et al.* (2005) (Fang, van Meurs et al. 2005)(bl5 y cs7 en la Figura 45), que se extienden desde el exón 4 hasta la región 3'UTR. Por otra parte, el bloque que puede observarse en la región del promotor en las poblaciones de VIH+ y controles sanos (bk2 en Figura 45C) se corresponde con el bloque 2 y 2° bloque consenso (bl2 y cs2 en Figura 45C), que incluye a los exones 1a, 1e y 1d.

El análisis de la estructura de LD en la cohorte ENI reveló la ausencia de estructura de bloque en la región del promotor (Figura 45F), que sí aparece en las demás poblaciones del estudio y en estudios previos (Ingles, Haile et al. 1997; Fang, van Meurs et al. 2005).

Debido a que la cohorte ENI ha sido seleccionada de la población general siguiendo un criterio específico, sujetos AVDP VIH seronegativos, no podemos descartar que las singularidades observadas en cuanto a la estructura de bloques sea una característica derivada del criterio de selección.

La selección de estos cinco polimorfismos para los estudios de asociación con la susceptibilidad a la infección por VIH y ritmo de progresión a sida, nos permite, no sólo asegurar que capturamos una parte importante de la variabilidad existente en la región genómica del *VDR*, sino que también nos ha de permitir establecer relaciones entre los genotipos/haplotipos que confieran protección o riesgo, con un efecto funcional que justifique su asociación, ya que dichos polimorfismos han sido previamente asociados con distintos efectos funcionales. En el caso de no encontrar evidencias funcionales que pudieran explicar su asociación, ello nos indicaría que



el responsable del efecto observado, aún siendo este desconocido, estaría próximo a los marcadores utilizados.

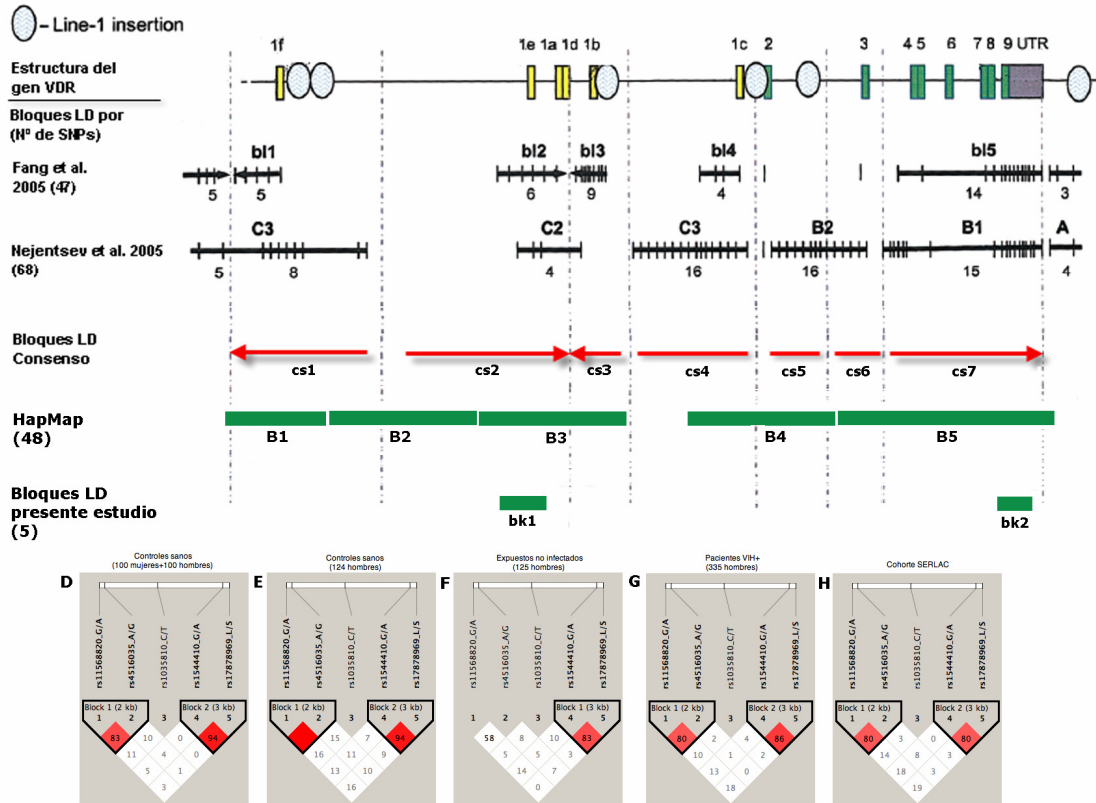


Figura 45.- Estructura de bloques del gen *VDR* según Fang et al. 2005(Fang, van Meurs et al. 2005), Nejentsev et al. 2004(Nejentsev, Godfrey et al. 2004), HapMap Project, patrón de bloques LD consenso y estructura de bloques según este estudio. Figura adaptada de Fang et al. 2005 (Fang, van Meurs et al. 2005). El número de SNPs analizados en cada estudio está indicado entre paréntesis. Estructura de bloques y mapa de LD de los cinco marcadores del gen *VDR* seleccionados en las poblaciones analizadas.

4.-Susceptibilidad a la infección por el VIH en función del genotipo de *VDR*.

Se ha estudiado la asociación de variantes del gen *VDR* con la susceptibilidad a la infección por el VIH-1 mediante el estudio de la distribución de cinco polimorfismos del gen en una población de 584 hombres de origen caucásico; 460 sujetos expuestos a la infección por VIH-1 por consumo de droga por vía parenteral (335 infectados y 125 no infectados) y 124 personas sanas.



Asumiendo que existen factores genéticos del huésped que contribuyen a la susceptibilidad/protección a la infección por VIH-1, cabe esperar un enriquecimiento de los factores que confieren protección en las personas que, a pesar de haber estado expuestas al virus no se han infectado. Por el contrario, dicho factores de protección aparecerán con una menor frecuencia en los pacientes expuestos que se han infectado (VIH+).

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de cada polimorfismo de forma independiente se encontró que los alelos *A1012G-A* (genotipos AA+AG), *Bsm-I-G* (genotipos G/G+G/A) y PolyA-L (genotipos L/L+L/S), estaban sobre-representados en la cohorte ENI, indicando un efecto de protección frente a la infección, siguiendo un modelo dominante. No obstante ninguna de las asociaciones descritas mantuvo la significación tras la corrección por *multiple-testing*.

La importancia de realizar una corrección por *multiple-testing* reside en el hecho de que cuando realizamos múltiples comparaciones aumenta la probabilidad de encontrar un falso positivo. La probabilidad global de hallar un resultado significativo (tomando como tal valores de $p < 0.05$) aumenta a medida que aumenta el número de ensayos realizados. Mediante una corrección por *multiple-testing* se pretende ajustar a la baja los valores de p en función del número ensayos independientes realizados, reduciendo así la probabilidad de encontrar un falso positivo.

En los análisis realizados se estimó la corrección del valor de p mediante dos aproximaciones. En los análisis de cada polimorfismo de forma independiente el ajuste se realizó mediante el software *Single Nucleotide Polymorphism Spectral Decomposition (SNPSpD)*. Dicho programa estima el número de *loci* polimórficos que se transmiten de forma independiente. En nuestro caso, el número de *loci* independientes estimado fue de 4.1, por lo que el valor p corregido se obtuvo de dividir 0.05 por 4.1 (0.012). En los análisis de haplotipos el método utilizado fue la corrección de *Bonferroni*, que consiste en dividir el valor de p (0.05) por el número de haplotipos que presentan una frecuencia de aparición mayor al 5%.



Cuando analizamos el efecto combinado de los marcadores del promotor se encontró que el haplotipo GA (*Cdx-G* y *A1012G-A*) presentaba una mayor frecuencia en los individuos ENI y por tanto se asociaba con un efecto de protección. Por otra parte, el análisis del efecto combinado de los marcadores de la región 3'UTR reveló que el haplotipo GL (*Bsm-I-G* y *polyA-L*) estaba también sobre-representado en los individuos ENI, asociándose asimismo con protección.

Finalmente, el análisis del efecto combinado de los cinco marcadores dio como resultado que el haplotipo GATGL (*Cdx-G*, *A1012G-A*, *Fok-I-T*, *Bsm-I-G* y *polyA-L*), presentaba una prevalencia mayor en los individuos de la cohorte ENI que en los pacientes VIH+ y en controles sanos. Por lo tanto, podemos definir al haplotipo GATGL como un haplotipo que confiere protección frente a la infección por VIH.

La protección del haplotipo GATGL sigue un modelo dominante, de tal forma que los individuos portadores de al menos una copia del haplotipo GATGL presentan un menor riesgo de ser infectados por el VIH que los portadores de cualquier otro diplotipo.

Cabe destacar que el haplotipo de protección GATGL incorpora los alelos *A1012G-A*, *Bsm-I-G* y *PolyA-L*, el haplotipo GA del promotor (*Cdx-G* y *A1012G-A*) y el haplotipo GL del extremo 3'UTR (*Bsm-I-G* y *polyA-L*), previamente asociados con protección. Podemos pues concluir que en el haplotipo GATGL incorpora, de forma directa o indirecta, las características más significativas del gen *VDR* asociadas con la protección a la infección por VIH-1.

Mediante el programa WebLogo se obtuvo una representación gráfica de la contribución ponderada de cada uno de los alelos en el haplotipo de protección (y riesgo) (Figura 31). El resultado obtenido muestra, de forma visual, la contribución significativa del haplotipo GATGL en la protección. Así mismo, puede observarse el mayor peso del alelo *A1012G-A* en el extremo 5'UTR, y del haplotipo GL en el extremo 3'UTR.



5.-Variabilidad en el ritmo de progresión a sida en función del genotipo de *VDR*.

Se ha estudiado la asociación de variantes del gen *VDR* con el ritmo de progresión a sida mediante el estudio de la distribución de cinco polimorfismos del gen en una población de 179 pacientes AVDP-VIH+ que constituyen la cohorte SERLAC.

El estudio se ha llevado a cabo mediante dos aproximaciones metodológicas: i) estudio caso-control anidado y ii) análisis de supervivencia.

En el estudio caso-control anidado, los 179 pacientes fueron agrupados según tres criterios de progresión: clínico (pacientes de los grupos A y B respecto a pacientes del grupo C), inmunológico-celular (pacientes con valores de $CD4 > 200/\mu L$ respecto a pacientes con valores de $CD4 < 200/\mu L$) y la combinación de ambos criterios incorporada en la consideración de sida según el CDC de 1993 (pacientes que no han desarrollado sida-93 respecto aquellos que si han desarrollado sida-93). Se comparó la distribución de alelos, genotipos y haplotipos de los cinco polimorfismos estudiados entre cada grupo para cada uno de los criterios considerados.

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de cada polimorfismo de forma independiente se encontró que asociación significativa con progresión para polimorfismo *polyA*, atendiendo a los criterios inmunológico-celular y sida-93. El alelo *polyA-S* y el genotipo *polyA-SS* fue más frecuente en los pacientes considerados progresores según dichos criterios. La distribución de genotipos para los cinco marcadores estudiados no presentó diferencias relevantes en función del criterio de progresión considerado. Por ello, y dado que el criterio de progresión de sida-93 incluye las características definitorias de progresión de los otros dos criterios, los posteriores análisis de haplotipos y el estudio de supervivencia se realizó considerando como criterio de progresión sida-93.

La distribución de haplotipos para los cinco marcadores analizados reveló diferencias significativas entre progresores y no progresores para los marcadores localizados en la región 3'UTR. El haplotipo GL (*Bsm-I-G*, *polyA-L*) fue más



frecuente en los pacientes que no habían progresado a sida-93, mientras que el haplotipo complementario AS (*Bsm-I-A*, *polyA-S*) lo fue en aquellos que progresaron a sida-93. La protección conferida por el haplotipo GL seguía un modelo dominante, mientras que el riesgo conferido por el haplotipo AS seguía un modelo recesivo. Se observó que el efecto de los haplotipos de protección y riesgo definidos en el extremo 3'UTR del gen se incrementaba al incorporar el polimorfismo *Cdx*, localizado en la región 5'UTR. La combinación haplotípica G++GL (*Cdx-G*, *Bsm-I-G*, *polyA-L*) confería protección siguiendo un modelo dominante, mientras que la combinación haplotípica G++AS (*Cdx-G*, *Bsm-I-A*, *polyA-S*) confería riesgo siguiendo un modelo recesivo.

Mediante el programa WebLogo se obtuvo una representación gráfica de la contribución ponderada de cada uno de los alelos en el haplotipo de protección y riesgo (Figura 31). El resultado obtenido muestra, de forma visual, la contribución significativa de los haplotipos GL en protección y AS en riesgo. Así mismo, puede observarse la contribución del alelo *Cdx-G*, del extremo 5'UTR, tanto en riesgo como en protección.

El estudio de supervivencia se llevó a cabo agrupando a los pacientes según su diplotipo, estimado mediante el software WHAP. En función de los resultados obtenidos en el estudio caso-control anidado, solo se consideraron los diplotipos definidos por el polimorfismos *Cdx* de la región 5'UTR y los polimorfismos *Bsm-I* y *polyA* del extremo 3'UTR. El alto desequilibrio de ligamiento observado en la región 3'UTR, permitió una predicción de diplotipos, correspondientes a los marcadores *Bsm-I* y *polyA*, con una de alta fiabilidad. Por ello la probabilidad de los diplotipos inferidos para cada individuo fue, en todos los casos, superior a 0.95. Sin embargo, la inclusión del marcador *Cdx*, que presenta un bajo desequilibrio de ligamiento con los marcadores del extremo 3'UTR, dio lugar a una predicción de diplotipos de una menor fiabilidad. Con el objeto de minimizar la distorsión en el estudio debida a los individuos con un diplotipo de baja probabilidad, sólo se consideraron en el estudio de supervivencia aquellos individuos con un diplotipo inferido con probabilidad > 0.95 (141 individuos).



Atendiendo a los diplotipos correspondientes a los marcadores de la región 3'UTR, los pacientes portadores de una o dos copias del haplotipo GL progresaron a sida-93, 46 meses después que aquellos que eran portadores del haplotipo AS en homocigosis. La incorporación del marcador *Cdx* del extremo 5'UTR incremento el efecto de protección para el haplotipo G++GL y el de riesgo para el haplotipo G++AS. El tiempo medio de progresión a sida-93 de los pacientes portadores de una o dos copias del haplotipo G++GL fue de 54 meses después que aquellos pacientes portadores del haplotipo G++AS en homocigosis.

6.-Valoración de los resultados sobre susceptibilidad a la infección y ritmo de progresión a sida

El papel de la vitamina D en procesos infecciosos es controvertido. Distintos trabajos sugieren que la vitamina D interviene de forma efectiva contra la infección de *Mycobacterium tuberculosis* induciendo la síntesis de péptidos con actividad antimicrobiana (Liu, Stenger et al. 2006) y favoreciendo la actividad fagocítica de macrófagos a partir de la producción de vitamina D a nivel local (Tokuda and Levy 1996). Dicha acción estaría mediada por la interacción de la bacteria con el macrófago a través del TLR2. Sin embargo, en el caso de infecciones víricas, el agente patógeno es reconocido por el TLR9 y se desconoce cual puede ser el efecto de la vitamina D en dicha ruta de activación. Sin embargo, otros autores han descrito que la supervivencia de ratones infectados por *Leshmania major* (Ehrchen, Helming et al. 2007), se ve drásticamente reducida después de un tratamiento con vitamina D, lo que sustenta un papel negativo de la hormona en el contexto de dicha infección.

El VDR juega un papel crítico en la respuesta mediada por vitamina D. Se ha descrito asociación de los polimorfismos del *VDR* con la evolución clínica de infecciones bacterianas: *M. tuberculosis* y *M. leprae* (Bellamy, Ruwende et al. 1999) y virales: HTLV-I (Saito, Eiraku et al. 2005), hepatitis B (Bellamy, Ruwende et



al. 1999; Suneetha, Sarin et al. 2006) y VIH (Barber, Rubio et al. 2001; Nieto, Barber et al. 2004).

Las variantes polimórficas analizadas en nuestro estudio presentan diversos efectos funcionales. El polimorfismo *Cdx*, localizado en la región promotora del gen, altera el lugar de reconocimiento del factor de transcripción CDX2, que se expresa de forma específica en células del epitelio intestinal. El alelo *Cdx-G* se ha asociado con una menor afinidad de CDX2, y por lo tanto con una menor expresión de VDR en dichas células. El efecto funcional de dicho polimorfismo estaría relacionado con la absorción intestinal de calcio mediada por la interacción vitamina D-VDR. No existen datos que apoyen la expresión del factor CDX2 en células de la estirpe inmune. En relación al polimorfismo *A1012G*, se ha descrito que el alelo A introduce un sitio de reconocimiento para factores de transcripción de la familia GATA. Dichos factores se expresan en distintos tipos celulares y entre ellos se encuentra el factor GATA-3 que participa en la polarización de los linfocitos Th2 (Boonstra, Barrat et al. 2001). Por otra parte el alelo G del polimorfismo *Bsm-I* y el alelo L del polimorfismo *polyA* han sido relacionados con una menor estabilidad (Morrison, Qi et al. 1994) y una mayor capacidad de translocación (Whitfield, Remus et al. 2001) del ARNm del *VDR*, respectivamente. Finalmente, se ha descrito que el alelo T del polimorfismo *Fok-I*, localizado en el exón 2, estaría relacionado con una baja capacidad de transactivación de la proteína VDR.

La estructura observada en el gen *VDR* indica que los marcadores localizados en la región 5'UTR (*Cdx* y *A1012G*) y 3'UTR (*Bsm-I* y *polyA*) están en desequilibrio de ligamiento. En un reciente trabajo publicado por Fang et al. (2005) se analizó de forma sistemática el efecto funcional de los haplotipos de dichas regiones (bl2 y bl5 de la Figura 45). Dichos autores transfectaron células embrionarias de riñón (HEK293) con secuencias específicas de los haplotipos del bloque 2, utilizando la *luciferasa* como gen reportero. En estos experimentos, el haplotipo 1 del bloque 2, que incorpora los alelos de baja afinidad *Cdx-G* y *A1012G-G*, mostró la actividad transcripcional más baja.



Sin embargo, los resultados funcionales obtenidos en células embrionarias de riñón podrían no ser extrapolables a los efectos de dicho haplotipo en células de la estirpe inmune.

Los estudios de susceptibilidad indican que el haplotipo GG (*Cdx-G*, *A1012G-G*), es más frecuente en los pacientes VIH+, aunque dicha diferencia no alcanzó significación estadística. Sin embargo, el haplotipo GA (*Cdx-G*, *A1012G-A*), fue significativamente más frecuente en los sujetos ENI. El efecto protector del alelo *A1012G-A* se puso de manifiesto tanto a nivel de *locus* como en el contexto del haplotipo GA (*Cdx-G*, *A1012G-A*). No se observó un efecto significativo sobre el ritmo de progresión a sida de los marcadores del extremo 5'UTR. Sin embargo, en el contexto del alelo *Cdx-G*, se observó un incremento en la significación del efecto protector del haplotipo GL y del efecto de riesgo del haplotipo AS.

Dada la implicación de las variantes de la región 5'UTR con la regulación de la expresión del *VDR*, cabría esperar asociación de dichas variantes tanto con susceptibilidad como con progresión. Los resultados obtenidos indican un posible efecto sobre la susceptibilidad a la infección, pero no parecen apoyar el papel de dichas variantes en la progresión a sida. Si bien ambos procesos presentan características comunes, existen suficientes diferencias entre los mismos que podrían justificar las diferencias observadas.

Fang y col también evaluaron la estabilidad del ARNm del *VDR* en función de los haplotipos de la región 3'UTR (b15 de la Figura 45). Sus resultados indican que el haplotipo *BAt* (*Bsm-I-B*, *Apa-I-A* y *Taq-I-t*, siendo *Bsm-I-B* el alelo *Bsm-I-A* según la nomenclatura utilizada en este trabajo) confiere una mayor estabilidad del ARNm, siendo esta un 15% superior a la correspondiente al haplotipo *baT* (siendo *Bsm-I-b* el alelo *Bsm-I-G* según la nomenclatura utilizada en este trabajo). El desequilibrio de ligamiento existente en dicha región incluye al polimorfismo *polyA*. Así, podemos considerar que el haplotipo definido por los marcadores *Bsm-I* y *polyA* se asoció también con la estabilidad del ARNm, siendo el haplotipo GL (*Bsm-I-G*, *polyA-L*) el que confiere una menor estabilidad. En nuestro análisis, dicho haplotipo fue más frecuente en los sujetos ENI, lo cual indica un papel protector contra la infección por VIH-1. Asimismo, dicho haplotipo se asocia con



una progresión lenta a sida. La asociación con protección a la infección y ritmo lento de progresión a sida sigue en ambos casos un modelo dominante. Según estos resultados el haplotipo GL, asociado con una menor funcionalidad del VDR, confiere tanto protección a la infección como una disminución en el riesgo de progresión a sida.

El estudio de los haplotipos de los cinco marcadores analizados indicó que el haplotipo GATGL se asociaba con protección frente la infección por VIH-1. No se ha identificado un haplotipo que incluya a los cinco marcadores, que presente asociación significativa con el ritmo de progresión a sida. Sin embargo, es destacable la coincidencia en los patrones de WebLogo asociados con protección a la infección y progresión lenta y los asociados con riesgo de infección y progresión rápida.

Con la excepción del alelo *A1012G-A*, el haplotipo GATGL incorpora las variantes asociadas con una menor expresión (*Cdx-G*), menor capacidad transactivadora (*Fok-I-T*) y menor estabilidad del ARNm (haplotipo GL), que pueden dar lugar a una baja eficiencia en la ruta mediada por el VDR. El efecto del alelo *A1012G-A* sobre la expresión del VDR podría no ser relevante en el contexto del haplotipo GATGL, o bien dicho alelo podría estar en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo no considerado en este estudio que estuviera relacionado con una baja expresión del receptor. Lo anteriormente expuesto sugiere que en el contexto de la infección por VIH una menor eficiencia de la acción de la vitamina D podría ser considerada beneficiosa.

Se ha descrito que en la generación de la respuesta inmune contra al ataque de un virus la respuesta celular de tipo Th1 es predominante (Galli, Annunziato et al. 2001). Asimismo, el mantenimiento sostenido de dicha respuesta juega un papel crítico en el control de la infección por VIH tanto en las primeras etapas de la infección (Norris and Rosenberg 2001) como a lo larga de la enfermedad. Uno de las funciones más significativas de la vitamina D en la modulación de la respuesta inmune consiste en favorecer el desplazando del balance Th1/Th2 hacia una



respuesta Th2. En los sujetos portadores del haplotipo GATGL la acción de la vitamina D podría verse limitada, haciendo posible el mantenimiento de una respuesta de tipo Th1 mucho más eficaz frente a la infección por VIH.

El papel del CCR5 en el proceso de infección por VIH es ampliamente conocido y su presencia es necesaria para que se lleve a cabo una infección productiva. La disponibilidad de CCR5 libre varía según sea la respuesta inmune de tipo Th1 o de tipo Th2. Así, la expresión de *CCR5* es ocho veces superior en las células Th1 que en las células Th2 (Moonis, Lee et al. 2001). Según esto, la infección por VIH sería mucho más productiva en un entorno Th1. Sin embargo, también se ha descrito que los niveles de expresión de los ligandos naturales de CCR5 es mayor en células Th1. Diversos estudios indican que para que tenga lugar una infección productiva debe superarse un umbral mínimo de expresión de CCR5 libre en membrana. Dicho umbral ha sido establecido entorno a unas 10.000 moléculas de CCR5 libre por célula. En el contexto Th1, dicho umbral sería fácilmente superado como respuesta a una infección. Sin embargo, la activación concomitante de los ligandos naturales de CCR5 podría dar lugar a una saturación de los receptores por lo que el umbral de expresión de CCR5 libre necesario para una infección productiva podría no alcanzarse (Annunziato, Galli et al. 2000). Por el contrario, en un contexto Th2, los bajos niveles de expresión de los ligandos naturales de CCR5 darían lugar a una mayor disponibilidad de CCR5 libre que permitiría alcanzar el umbral de infección (Figura 46). Por lo tanto, un desplazamiento a Th2 mediado por la vitamina D sería contraproducente en las primeras fases de la infección, ya que este proporcionaría al virus un entorno favorable para llevar a cabo una infección productiva. Asimismo, en el transcurso de la enfermedad una densidad elevada de CCR5 libre favorecería una progresión más rápida de la enfermedad.

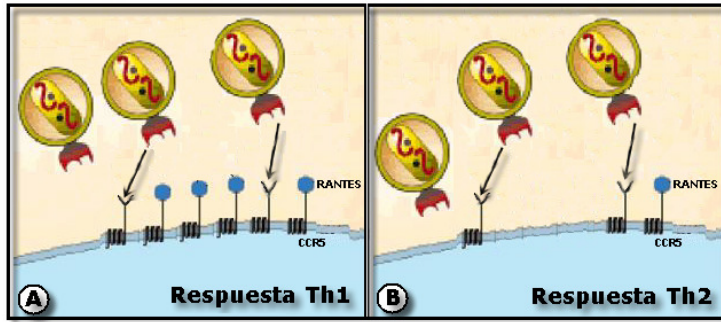


Figura 46. A; En un entorno Th1 se producen niveles altos de CCR5 y de sus ligandos naturales. B; En un entorno Th2 se expresan bajos niveles de CCR5 y sus ligandos naturales. Los niveles de CCR5 en Th1 podrían ser insuficientes para una infección productiva según el modelo de umbral de expresión de CCR5 libre.

No podemos descartar un efecto directo de la vitamina D sobre la replicación del VIH-1. Recientemente se ha descrito mediante ensayos *in vitro* que el VDR actúa como un potente transactivador de la LTR viral (Nevado, Tenbaum et al. 2007). Según ello, la vitamina D a través de su receptor podría intervenir de forma negativa en las primeras fase de la infección, promoviendo la replicación del virus. Cabría esperar un efecto similar sobre el ritmo de progresión de la enfermedad, al favorecerse una mayor replicación del virus en los sucesivos episodios de reinfección.

Todo ello sugiere que el fomento de la ruta metabólica de la vitamina D a través de su receptor sería contraproducente en el contexto de la infección por VIH. Así pues, la protección conferida por el haplotipo GATGL podría explicarse por la menor eficiencia del VDR en dicha ruta metabólica.

7.-Variabilidad en el ritmo de progresión a sida en función del genotipo de *CCR5*.

Numerosos estudios han estudiado la asociación de variantes del gen *CCR5* con la susceptibilidad a la infección por VIH-1 (Samson, Libert et al. 1996) y con el ritmo de progresión a sida (Michael, Louie et al. 1997; Stewart, Ashton et al. 1997; Visco-Comandini, Hultgren et al. 1998; An, Martin et al. 2000). Si bien los estudios de asociación con la susceptibilidad a la infección son concluyentes en cuanto a la vinculación de la homocigosis del alelo $\Delta 32$ (rs333) con protección a la infección



por cepas R5 del virus, la relación de esta y otras variantes del gen con el ritmo de progresión a sida no lo es. Una fuente de variabilidad en los resultados obtenidos procede de la heterogeneidad de los pacientes estudiados, en especial el grupo de riesgo al que estos pertenecen. Si bien los resultados obtenidos con cohortes de pacientes infectados por la vía de transmisión sexual, vía sanguínea como consecuencia de transfusiones de sangre contaminada o por transmisión vertical madre-hijo, son contradictorios (Huang, Paxton et al. 1996; Lockett, Alonso et al. 1999), en general apoyan un papel significativo de las variantes de *CCR5* en la progresión de la infección. Sin embargo, los estudios realizados en cohortes de pacientes infectados por vía sanguínea, como consecuencia del intercambio de jeringas en el consumo de drogas por vía parenteral, no detectan asociación significativa de las variantes de *CCR5* con el ritmo de progresión (Schinkel, Langendam et al. 1999).

Dada la disponibilidad de una cohorte de pacientes AVDP específicamente seleccionada para estudios de progresión, se consideró oportuno evaluar la asociación de variantes de *CCR5* con el ritmo de progresión a sida. Para ello se seleccionaron dos regiones polimórficas del gen *CCR5*, la variante $\Delta 32$ localizada en el exón 3, y tres variantes polimórficas, localizadas en el promotor del gen, que definen cuatro haplotipos.

Siguiendo un esquema similar al desarrollado en el estudio del gen *VDR* y progresión a sida, los 179 pacientes de la cohorte SERLAC se agruparon según su status de progresión, atendiendo a los tres criterios anteriormente descritos.

Un primer análisis se llevo a cabo determinando la distribución de frecuencias de las variantes de cada una de las regiones estudiadas en los grupos de progresión considerados. En ninguno de los análisis realizados se detectó asociación significativa con progresión, ni para las variantes del promotor ni para la variante $\Delta 32$ del exón 3.

Los pacientes heterocigotos para el alelo $\Delta 32$, presentan un solo alelo funcional del gen *CCR5*. Ello determina que los niveles de *CCR5* en membrana sean inferiores a los observados en los pacientes homocigotos para el alelo silvestre (*wt*, *wild type*). Tal y como ha sido comentado anteriormente, la densidad



de CCR5 en membrana es un factor determinante para el establecimiento de una infección productiva, tanto en el inicio de la infección como en el mantenimiento de la misma. La disponibilidad limitada de CCR5 en membrana, como consecuencia de la heterocigosis para el alelo $\Delta 32$, dificultaría la propagación viral provocando una disminución en el ritmo de progresión a sida. Este es el argumento que sustenta las asociaciones descritas entre la variante $\Delta 32$ y el ritmo de progresión a sida. Un argumento similar ha sido propuesto para justificar las asociaciones descritas con progresión de variantes del promotor de *CCR5* que confieren un menor nivel de expresión del gen.

Los pacientes ADVP infectados por el VIH+ presentan frecuentemente enfermedades concurrentes de tipo infeccioso que producen una hiperactivación mantenida del sistema inmune. Dicha hiperactivación provocaría, además de otras manifestaciones, la sobreexpresión de *CCR5*, incluso en los pacientes heterocigotos *CCR5-wt $\Delta 32$* . Esta condición facilitaría que en los pacientes AVDP se pudiera superar con frecuencia el umbral de CCR5 en membrana necesario para el mantenimiento de la infección. Dicho umbral se superaría independientemente del genotipo para *CCR5*. El efecto de otros polimorfismos sobre la expresión de *CCR5* podría seguir un modelo similar. Sin embargo, el efecto aditivo de variantes de *CCR5* que comprometan seriamente su capacidad de síntesis o la combinación de haplotipos que determinen una baja producción del receptor, podrían disminuir la densidad de CCR5 en membrana, incluso en los pacientes AVDP con una hiperactivación inmune sostenida, evitando que se alcance el umbral de infección. En estos pacientes sería posible detectar asociación de dichas variantes con progresión lenta de la enfermedad (Figura 47).

Siguiendo este razonamiento, evaluamos el ritmo de progresión a sida en los pacientes agrupados según el haplotipo combinado para las variantes del promotor y del exón 3.

Se identificaron tres haplotipos distintos (A, B y C) al considerar las variantes del promotor, agrupadas en los haplotipos P1 y Px y la variante $\Delta 32$ del exón 3 (Tabla 17). Debido a la existencia de un desequilibrio total ($D' > 0.99$) entre el alelo P1 del



haplotipo del promotor y el alelo $\Delta 32$ del polimorfismo del exón 3, el haplotipo D (Px- $\Delta 32$) no se observó en la población estudiada (Tabla 17).

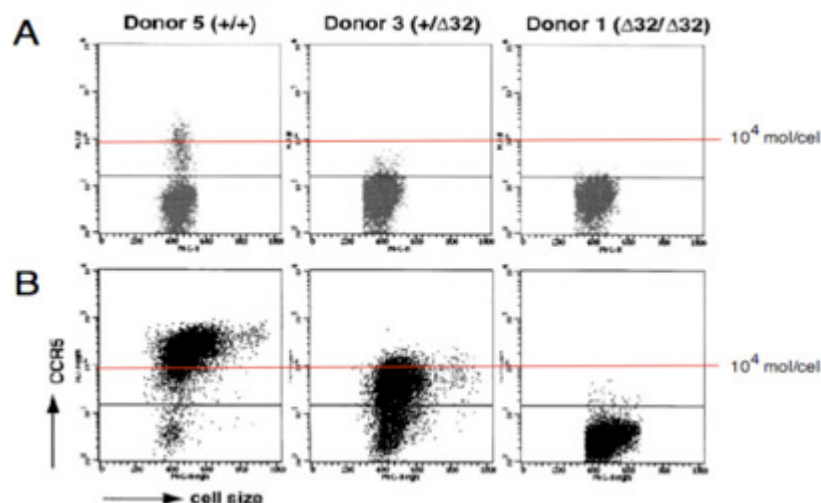


Figura 47. Niveles de expresión de CCR5 en linfocitos en cultivo procedentes de individuos con distintos genotipos para la variante $\Delta 32$, no estimulados (A) o estimulados con fitohemaglutinina (B). La línea roja representa el umbral de expresión de CCR5 (10^4 mol/cel) necesario para el establecimiento de una infección productiva. En las células activadas el umbral de infección se alcanza tanto en los homocigotos wt como en los heterocigotos $\Delta 32$. Adaptado de Wu et al. 1997 (Wu, Paxton et al. 1997)

Una vez asignados los diplotipos correspondientes a cada individuo se analizó su distribución en los pacientes de la cohorte SERLAC clasificados según los criterios considerados. Se observó que el 16% de los pacientes que no habían progresado a sida-93 eran portadores del diplotipo AB, mientras que dicho diplotipo representaba tan solo el 2% de los que si habían desarrollado sida-93. La asociación con no progresión a sida-93 del diplotipo AB alcanzó significación estadística, incluso después de una corrección para *múltiple-testing*.

La asociación del diplotipo AB con progresión se vio confirmada a partir del análisis de supervivencia, según el cual, los pacientes portadores de dicho diplotipo presentaron el ritmo de progresión a sida más lento comparado con el resto de los diplotipos analizados.

Estos resultados confirmaban un claro papel protector del diplotipo AB frente a la progresión a sida, en pacientes AVDP.



A nivel funcional el diplotipo AB está constituido por los haplotipos A (P1 Δ 32) y B (Pxwt). El haplotipo A induce la síntesis de una proteína truncada no funcional que no se expresa en membrana. Por ello el haplotipo A a nivel funcional es una haplotipo de nula producción de CCR5. El haplotipo B, dentro del grupo de haplotipo funcionales, es el que produce niveles más bajos de CCR5, ya que dicho haplotipo incorpora un promotor de baja actividad. Del total de diplotipos posibles, el diplotipo AB estaría relacionado el nivel más bajo de producción de CCR5 en membrana (Tabla 16).

La disminución en la producción de CCR5 en membrana en un paciente portador del diplotipo de protección AB, dificultaría la entrada del virus en la célula y por tanto interferiría en el establecimiento de nuevos eventos de infección, que tendrían como consecuencia una disminución en el ritmo de progresión de la enfermedad. En la Figura 48 se muestra la producción teórica estimada de receptor CCR5 en función de los diplotipos posibles del gen *CCR5*. Se esperaría un descenso gradual en la capacidad de expresar CCR5 de la siguiente manera: CC>CB>BB>CA>AB. Como consecuencia esperaríamos que dicha gradación se reflejara en el ritmo de progresión a sida de los pacientes portadores de cada diplotipo.

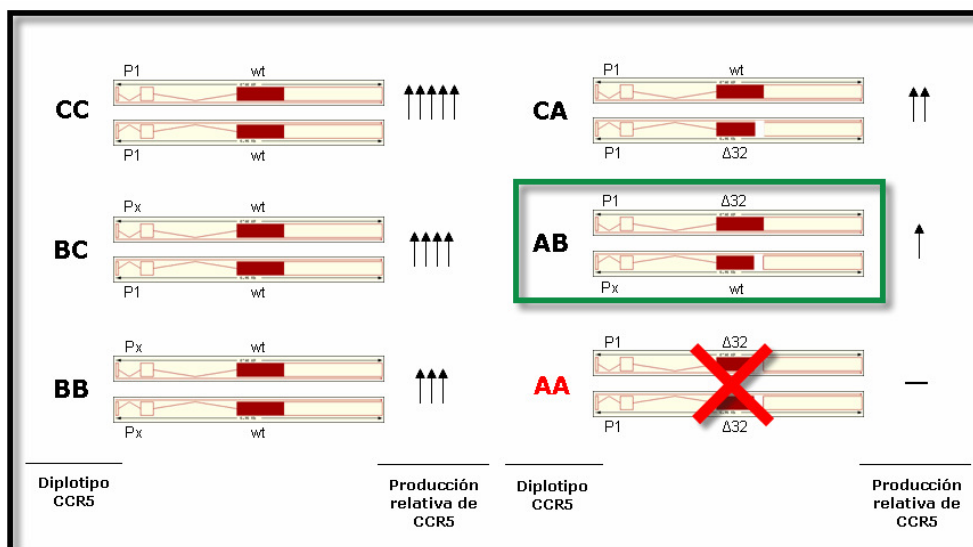


Figura 48- Diplotipos del gen *CCR5* y estima de la producción relativa de receptor CCR5 funcional para cada diplotipo. El diplotipo AB está costituido por los haplotipos que inducen una menor producción de CCR5. El diplotipo AA, no presente en la población SERLAC, está constituido por dos haplotipos que inducen la síntesis de CCR5 no funcional.



Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran dicha gradación, observándose que los pacientes con diplotipo CA son los que progresan más rápido a sida. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que la presencia de al menos un promotor activo de *CCR5* o dos promotores débiles capaces de producir *CCR5* funcional, podrían ser suficientes para permitir la síntesis de niveles de *CCR5* que permitieran el establecimiento de nuevos episodios de infección. Dicho efecto podría verse reforzado en los pacientes AVDP sometidos a una hiperactivación de su sistema inmune por la aparición de enfermedades concurrentes. Por ello, todos los diplotipos con capacidad de producir niveles suficientes de *CCR5* se comportarían de manera similar, por lo que las diferencias en el ritmo de progresión en los pacientes con diplotipos distintos al AB no se pondrían poner de manifiesto.

En los pacientes portadores del diplotipo AB, que presentan un alelo funcional asociado a un promotor de baja actividad, a pesar de presentar hiperactivación inmune no se podrían sintetizar niveles suficientes de *CCR5* para permitir el avance de la infección, posibilitando que en estos sea posible observar una disminución en el ritmo de progresión a sida.

8.-Variabilidad en el ritmo de progresión a sida en función del genotipo combinado para los genes *VDR* y *CCR5*.-

Una vez determinados los genotipos de riesgo y protección para los genes estudiados, llevamos a cabo un estudio de supervivencia de los pacientes SERLAC según el genotipo combinado para los genes *CCR5* y *VDR*.

Se observó que los pacientes con un genotipo de riesgo para *VDR* (*G++AS/G++AS*) y *CCR5* (noAB) progresaban a sida 80 meses antes que los portadores del genotipo de protección para *VDR* (*G++GL/-*) y *CCR5* (AB).

El genotipo de riesgo combinado está constituido por un diplotipo del gen *VDR*, asociado con una mayor funcionalidad de la ruta metabólica de la vitamina D y con un diplotipo del gen *CCR5* con capacidad para producir niveles suficientes del coreceptor.



El genotipo del *VDR* favorecería un desplazamiento en el balance Th1/Th2 hacia una respuesta Th2, que sería contraproducente para el control efectivo de la infección (Kidd 2003). Se ha descrito que los pacientes LTNP, que después de más de 15 años de seguimiento no presentan síntomas de la enfermedad, presentan una importante respuesta inmune específica Th1. En estos pacientes, la respuesta continuada de tipo Th1 es capaz de controlar la diseminación del virus y por tanto disminuir el ritmo de progresión a sida (Harrer, Harrer et al. 1996). Por otra parte el descenso en la síntesis de CCR5, característica de las células Th2, podría verse compensada por el diplotipo del gen *CCR5*, así como por el descenso en la síntesis de los ligandos naturales del coreceptor, característica también de dichas células. Según ello, esta combinación genotípica estaría asociada con un ritmo de progresión rápido de la infección.

Podemos concluir por tanto que en el contexto de la infección por VIH y progresión a sida la acción de la vitamina D ejercería un papel negativo en el control de la infección viral.

La caracterización de la constitución genética de los genes *VDR* y *CCR5* podría ser de utilidad como factor de predicción de la progresión del enfermo VIH+.

Además del fondo genético, distintos factores ambientales así como los hábitos de conducta también podrían ser considerados ya que la disponibilidad de vitamina D es dependiente de la dieta y de la radiación solar disponible para la síntesis de vitamina D, la cual varía a lo largo del gradiente latitudinal norte-sur, así como en función de los hábitos sociales. El conocimiento de la disponibilidad de vitamina D podría ser de interés en el contexto de la infección por VIH. Aquellos pacientes con una disponibilidad limitada de radiación solar y por ende de unos bajos niveles de vitamina D, que presentaran un genotipo de protección, podrían ser menos susceptibles a la infección por VIH o progresión a sida.

Las conclusiones anteriormente expuestas deben ser tomadas con cautela ya que para entender el impacto de la vitamina D en la infección por VIH y progresión a sida es necesario considerar una compleja ecuación que incluya factores ambientales, genéticos y de hábitos de conducta. Además, estas conclusiones deben ser consideradas como resultado del análisis en un grupo limitado de



sujetos pertenecientes al grupo de riesgo de adictos a droga por vía parenteral por lo que estos resultados pueden requerir futuras réplicas en otros grupos de riesgo.

9.-Valoración de los resultados en los estudios funcionales

En el estudio de la relación genotipo-fenotipo no se han obtenido resultados concluyentes.

Se determinó la concentración plasmática de citoquinas Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), en pacientes y controles sanos agrupados según su genotipo para el gen *VDR*, con el objeto de evaluar el balance Th1/Th2.

No se observó un efecto significativo del genotipo *VDR* en el balance Th1/Th2 ni en los pacientes ni en los controles.

No podemos descartar limitaciones metodológicas de las determinaciones plasmáticas de citoquinas (Evans, Fitzgerald et al. 1998). La desviación en los valores obtenidos no nos ha permitido obtener resultados fiables.

La muestra analizada está constituida por un grupo de pacientes que presentan una gran heterogeneidad clínica. El estado inmunológico de los mismos está sometido a un estrés continuo como resultado de la propia infección por VIH así como por la frecuente aparición de enfermedades oportunistas.

Está ampliamente documentada la condición de malnutrición que presentan los usuarios de droga por vía intravenosa, debido a las deficiencias nutricionales que soportan frecuentemente este grupo de pacientes (Gambera and Clarke 1976). Como consecuencia de esta deficiencia nutricional, estos individuos presentan frecuentes episodios de anemia (Semba, Shah et al. 2001) además de unos niveles deficientes de vitaminas y oligoelementos (Forrester, Tucker et al. 2004) que además disminuyen conforme aumenta el stress oxidativo que tiene lugar durante la progresión a sida. Por ello, algunos autores recomiendan la administración de suplementos nutritivos que mejoren el estatus nutricional del paciente y faciliten el mantenimiento adecuado del sistema inmune y un control de la respuesta inmunitaria (Suttajit 2007).



Esta condición de malnutrición puede afectar de forma directa la capacidad del individuo de generar una respuesta inmune adecuada, por lo que en dichos pacientes pueden presentarse alteraciones en el balance Th1/Th2 que podrían enmascarar el efecto fisiológico debido al genotipo que pretendemos evaluar.

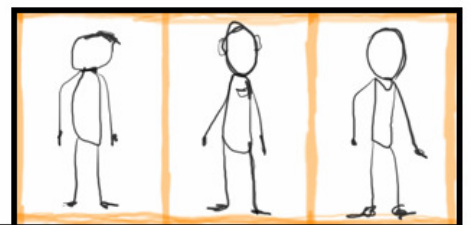
Los resultados obtenidos en la cuantificación de CCR5 y su ligando natural RANTES, fueron similares en cuanto a su heterogeneidad.

Los niveles plasmáticos de RANTES no mostraron diferencias significativas entre los genotipos del *VDR*.

Todos los pacientes y controles seleccionados eran homocigotos para el alelo *wt* del polimorfismo $\Delta 32$, lo que permitió evitar posibles efectos del genotipo de *CCR5* sobre la expresión del correceptor. La intensidad de fluorescencia media para CCR5 en los pacientes agrupados según el genotipo de *VDR* no mostró diferencias significativas, ni en linfocitos totales ni en células CD4+.

Sin embargo en los controles se encontró que los portadores del genotipo de riesgo AS/AS presentaban una mayor densidad de CCR5 en membrana que aquellos que eran portadores del genotipo de protección. La mayor densidad de CCR5 en membrana de los individuos con genotipo AS/AS explicaría la asociación de dicho diplotipo con susceptibilidad a la infección y progresión a sida.

La no detección de dichas diferencias en los pacientes podría explicarse por la mayor activación del sistema inmune en los mismos, la cual podría enmascarar las diferencias en la expresión de CCR5 atribuibles al genotipo *VDR*.



CONCLUSIONES



- 1.- El patrón de desequilibrio de ligamiento y bloques observado indica que la asociación descrita con variantes del gen *VDR* no está relacionado con variantes de los genes *HDAC7* y *COL2A1*.
- 2.- El haplotipo GATGL del gen *VDR*, relacionado con una menor funcionalidad de la ruta metabólica de la vitamina D, confiere protección frente a la infección por VIH siguiendo un modelo dominante.
- 3.- El diplotipo G++GL/- del gen *VDR*, relacionado con una menor funcionalidad de la ruta metabólica de la vitamina D, confiere protección frente a la progresión a sida siguiendo un modelo dominante. El diplotipo G++AS/G++AS confiere riesgo de progresión a sida siguiendo un modelo recesivo.
- 4.- El diplotipo AB del gen *CCR5*, relacionado con una menor síntesis del receptor *CCR5* confiere protección frente a la progresión a sida.
- 5.- Los pacientes que presentan el genotipo combinado G++AS/G++AS (gen *VDR*) y noAB (gen *CCR5*) presentan el ritmo más rápido de progresión a sida. Los pacientes portadores de dicho genotipo progresan a sida 7 años antes que los portadores del genotipo de protección G++GL/- (gen *VDR*) y AB (gen *CCR5*).
- 6.- No se detectan variaciones en la síntesis del receptor *CCR5* en función del genotipo para *VDR* en los pacientes VIH+ ADVP.
- 7.- La síntesis del receptor *CCR5* varía en función del genotipo para *VDR* en los controles sanos, siendo menor en los portadores del diplotipo de protección GL/- del gen *VDR*. Estos resultados indicarían que la protección conferida por el genotipo GL/- podría estar relacionada con la menor densidad de *CCR5* en membrana observada en estos individuos.



8.- No se detectan variaciones en la síntesis RANTES, ligando natural de CCR5, en función del genotipo para *VDR* en ninguno de los grupos considerados; pacientes VIH+ ADVP y controles sanos.

9.- No se detectan variaciones en el balance Th1/Th2 en función del genotipo para *VDR* en pacientes VIH+ ADVP.

10.- En función de los resultados obtenidos, la acción mediada por la vitamina D tendría efectos adversos en el contexto de la infección por VIH y ritmo de progresión a sida. Dichos efectos adversos se pondrían de manifiesto de forma más significativa en los pacientes portadores de los genotipos que favorecen una mayor funcionalidad metabólica de la vitamina D.

11.- Para comprender el efecto de la vitamina D en la infección por VIH y ritmo de progresión a sida deberían tenerse en consideración además de los aspectos relacionados con el genotipo, analizados en el presente estudio, aquellos aspectos relacionados con el aporte de la vitamina D a través de la dieta y aspectos sociales que puedan influir en la síntesis endógena de la hormona en función del grado de exposición solar.



BIBLIOGRAFÍA



- A**bramson, J. H. (2004). "WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists." *Epidemiol Perspect Innov* 1(1): 6.
- Adams, J. S. and M. A. Gacad (1985). "Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis." *J Exp Med* 161(4): 755-65.
- Alroy, I., T. L. Towers, et al. (1995). "Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor." *Mol Cell Biol* 15(10): 5789-99.
- An, P., G. Bleiber, et al. (2004). "APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS." *J Virol* 78(20): 11070-6.
- An, P., M. P. Martin, et al. (2000). "Influence of CCR5 promoter haplotypes on AIDS progression in African-Americans." *Aids* 14(14): 2117-22.
- Annunziato, F., G. Galli, et al. (2000). "Limited expression of R5-tropic HIV-1 in CCR5-positive type 1-polarized T cells explained by their ability to produce RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta." *Blood* 95(4): 1167-74.
- Anzala, O. A., N. J. Nagelkerke, et al. (1995). "Rapid progression to disease in African sex workers with human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Infect Dis* 171(3): 686-9.
- Arai, H., K. I. Miyamoto, 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(7): 1256-64.
- Arai, J., M. Yasukawa, et al. (2000). "Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of stromal cell-derived factor-1." *Eur J Haematol* 64(5): 323-32.

- B**an, Y., Y. Ban, et al. (2000). "Vitamin D receptor initiation codon polymorphism in Japanese patients with Graves' disease." *Thyroid* 10(6): 475-80.
- Barber, Y., C. Rubio, 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(10): 1279-88.
- Barrett, J. C., B. Fry, et al. (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." *Bioinformatics* 21(2): 263-5.
- Barsony, J. and W. McKoy (1992). "Molybdate increases intracellular 3',5'-guanosine cyclic monophosphate and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing filaments." *J Biol Chem* 267(34): 24457-65.



- Bartnof, H. S. (1995). "Long-term non-progressors, survivors and HIV positives." *Beta*: 29-32.
- Bellamy, R., C. Ruwende, et al. (1999). "Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene." *J Infect Dis* 179(3): 721-4.
- Berger, E. A., P. M. Murphy, et al. (1999). "Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease." *Annu Rev Immunol* 17: 657-700.
- Bhalla, A. K., E. P. Amento, et al. (1984). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation." *J Immunol* 133(4): 1748-54.
- Blanco, J. C., I. M. Wang, et al. (1995). "Transcription factor TFIIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1535-9.
- Boonstra, A., F. J. Barrat, 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(9): 4974-80.
- Brown, A. J., A. Dusso, et al. (1999). "Vitamin D." *Am J Physiol* 277(2 Pt 2): F157-75.
- Brumbaugh, P. F. and M. R. Haussler (1974). "1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin." *J Biol Chem* 249(4): 1251-7.
- Byrne, I. M., L. Flanagan, et al. (2000). "Identification of a hormone-responsive promoter immediately upstream of exon 1c in the human vitamin D receptor gene." *Endocrinology* 141(8): 2829-36.

Caldwell, C. W. and H. M. Taylor (1986). "A rapid, no-wash technic for immunophenotypic analysis by flow cytometry." *Am J Clin Pathol* 86(5): 600-7.

- Clark, A. G. (1990). "Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations." *Mol Biol Evol* 7(2): 111-22.
- Clerici, M., J. M. Levin, et al. (1994). "HIV-specific T-helper activity in seronegative health care workers exposed to contaminated blood." *Jama* 271(1): 42-6.
- CNE (2005). "Vigilancia epidemiológica del sida en España. Registro Nacional de casos de sida."
- Collins, J. E., J. M. Heward, et al. (2004). "Lack of association of the vitamin D receptor gene with Graves' disease in UK Caucasians." *Clin Endocrinol (Oxf)* 60(5): 618-24.
- Crofts, L. A., M. S. Hancock, et al. (1998). "Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10529-34.



- Crooks, G. E., G. Hon, et al. (2004). "WebLogo: a sequence logo generator." *Genome Res* 14(6): 1188-90.
- Cross, H. S., P. Bareis, 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(3-5): 287-92.
- Chang, T. J., H. H. Lei, et al. (2000). "Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population." *Clin Endocrinol (Oxf)* 52(5): 575-80.
- Choe, H., M. Farzan, et al. (1996). "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates." *Cell* 85(7): 1135-48.

- D**aar, E. S., S. Little, et al. (2001). "Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network." *Ann Intern Med* 134(1): 25-9.
- De Clercq, E. and D. Schols (2001). "Inhibition of HIV infection by CXCR4 and CCR5 chemokine receptor antagonists." *Antivir Chem Chemother* 12 Suppl 1: 19-31.
- Delgado, J. C., A. Baena, et al. (2002). "Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis." *J Infect Dis* 186(10): 1463-8.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." *Nature* 381(6584): 661-6.
- Dunlop, T. W., S. Vaisanen, et al. (2005). "The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor." *J Mol Biol* 349(2): 248-60.
- Durrin, L. K., R. W. Haile, et al. (1999). "Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability." *Biochim Biophys Acta* 1453(3): 311-20.
- Dusso, A. S., A. J. Brown, et al. (2005). "Vitamin D." *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1): F8-28.

- E**hrchen, J., L. Helming, et al. (2007). "Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*." *Faseb J*.
- Evans, T. G., T. Fitzgerald, et al. (1998). "Th1/Th2 cytokine responses following HIV-1 immunization in seronegative volunteers. The AIDS Vaccine Evaluation Group." *Clin Exp Immunol* 111(2): 243-50.

- F**agan, D. L., J. L. Prehn, et al. (1991). "The human myelomonocytic cell line U-937 as a model for studying alterations in steroid-induced monokine gene



- expression: marked enhancement of lipopolysaccharide-stimulated interleukin-1 beta messenger RNA levels by 1,25-dihydroxyvitamin D3." *Mol Endocrinol* 5(2): 179-86.
- Fang, Y., J. B. van Meurs, 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(5): 807-23.
- Faraco, J. H., N. A. Morrison, et al. (1989). "Apol dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus." *Nucleic Acids Res* 17(5): 2150.
- Fauci, A. S. (1988). "The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis." *Science* 239(4840): 617-22.
- Forrester, J. E., K. L. Tucker, et al. (2004). "Dietary intake and body mass index in HIV-positive and HIV-negative drug abusers of Hispanic ethnicity." *Public Health Nutr* 7(7): 863-70.
- Freund, J. N., C. Domon-Dell, et al. (1998). "The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine." *Biochem Cell Biol* 76(6): 957-69.
- Fritsche, J., K. Mondal, et al. (2003). "Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells." *Blood* 102(9): 3314-6.
- Fukazawa, T., I. Yabe, et al. (1999). "Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese." *J Neurol Sci* 166(1): 47-52.

G

- alli, G., F. Annunziato, et al. (2001). "Th1 and th2 responses, HIV-1 coreceptors, and HIV-1 infection." *J Biol Regul Homeost Agents* 15(3): 308-13.
- Gambera, S. E. and J. A. Clarke (1976). "Comments on dietary intake of drug-dependent persons." *J Am Diet Assoc* 68(2): 155-7.
- Ghanekar, S. A., S. A. Stranford, et al. (2001). "Decreased HIV-specific CD4 T cell proliferation in long-term HIV-infected individuals on antiretroviral therapy." *Aids* 15(14): 1885-7.
- Gross, C., A. V. Krishnan, et al. (1998). "The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of Fok-I variants." *J Bone Miner Res* 13(11): 1691-9.

H

- Liu, E. E. N., I. Theodorou, Y. Nagai, S. Likanonsakul, C. Wasi, P. Debre, and A. I. T. Shioda (2007). "Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan."
- Halsall, J. A., J. E. Osborne, et al. (2005). "Vitamin D receptor gene polymorphisms, particularly the novel A-1012G promoter polymorphism,



- are associated with vitamin D3 responsiveness and non-familial susceptibility in psoriasis." *Pharmacogenet Genomics* 15(5): 349-55.
- Harouse, J. M., A. Gettie, et al. (1999). "Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs." *Science* 284(5415): 816-9.
- Harrer, T., E. Harrer, et al. (1996). "Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load." *J Immunol* 156(7): 2616-23.
- Hausler, M. R., G. K. Whitfield, et al. (1998). "The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed." *J Bone Miner Res* 13(3): 325-49.
- Hendel, H., S. Caillat-Zucman, et al. (1999). "New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS." *J Immunol* 162(11): 6942-6.
- Henrard, D. R., E. Daar, et al. (1995). "Virologic and immunologic characterization of symptomatic and asymptomatic primary HIV-1 infection." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 9(3): 305-10.
- Hewison, M., D. Zehnder, et al. (2004). "Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase." *Mol Cell Endocrinol* 215(1-2): 31-8.
- Hill, A. V. (1996). "HIV and HLA: confusion or complexity?" *Nat Med* 2(4): 395-6.
- Holick, M. F. (1981). "The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system." *J Invest Dermatol* 77(1): 51-8.
- Huang, C. M., M. C. Wu, et al. (2002). "Association of vitamin D receptor gene Bsm-I polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus." *Lupus* 11(1): 31-4.
- Huang, C. M., M. C. Wu, et al. (2002). "No association of vitamin D receptor gene start codon fok 1 polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus." *J Rheumatol* 29(6): 1211-3.
- Huang, D. C., V. Papavasiliou, 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(1): 56-67.
- Huang, Y., W. A. Paxton, et al. (1996). "The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression." *Nat Med* 2(11): 1240-3.
- Ingles, S. A., R. W. Haile, et al. (1997). "Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6(2): 93-8.



Jeffreys, A. J., L. Kauppi, et al. (2001). "Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex." *Nat Genet* 29(2): 217-22.

Jin, X., H. Wu, et al. (2007). "APOBEC3G levels predict rates of progression to AIDS." *Retrovirology* 4: 20.

Karin, M., T. Lawrence, et al. (2006). "Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer." *Cell* 124(4): 823-35.

Kidd, P. (2003). "Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease." *Altern Med Rev* 8(3): 223-46.

Klotman, M. E. and T. L. Chang (2006). "Defensins in innate antiviral immunity." *Nat Rev Immunol* 6(6): 447-56.

Koup, R. A., J. T. Safrit, et al. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." *J Virol* 68(7): 4650-5.

Lewontin, R. C. (1964). "The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models." *Genetics* 49(1): 49-67.

Li, J. H., H. Q. Li, et al. (2006). "[Association of Taq I T/C and Fok I C/T polymorphisms of vitamin D receptor gene with outcome of hepatitis B virus infection]." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 86(28): 1952-6.

Liu, H., D. Chao, et al. (1999). "Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4581-5.

Liu, P. T., S. Stenger, et al. (2006). "Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response." *Science* 311(5768): 1770-3.

Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." *Cell* 86(3): 367-77.

Liu, R., X. Zhao, et al. (1998). "Functional analysis of the proximal CCR5 promoter." *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(17): 1509-19.

Liu, W., C. Y. Zhang, et al. (2003). "[A case-control study on the vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis]." *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 24(5): 389-92.

Liu, X. L., F. S. Wang, et al. (2003). "[Preliminary study on the association of chemokine RANTES gene polymorphisms with HIV-1 infection in Chinese Han population]." *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 24(11): 971-5.



- Lockett, S. F., A. Alonso, et al. (1999). "Effect of chemokine receptor mutations on heterosexual human immunodeficiency virus transmission." *J Infect Dis* 180(3): 614-21.
- Lombard, Z., D. L. Dalton, et al. (2006). "Association of HLA-DR, -DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa." *Hum Immunol* 67(8): 643-54.

- M**angus, D. A., M. C. Evans, et al. (2003). "Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression." *Genome Biol* 4(7): 223.
- Mariani, R., D. Chen, et al. (2003). "Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif." *Cell* 114(1): 21-31.
- Martinson, J. J., N. H. Chapman, et al. (1997). "Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion." *Nat Genet* 16(1): 100-3.
- Mattapallil, J. J., D. C. Douek, et al. (2005). "Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection." *Nature* 434(7037): 1093-7.
- McDermott, M. F., A. Ramachandran, et al. (1997). "Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians." *Diabetologia* 40(8): 971-5.
- McMichael, A. J. and S. L. Rowland-Jones (2001). "Cellular immune responses to HIV." *Nature* 410(6831): 980-7.
- Meissner, E. G., K. M. Duus, et al. (2004). "Characterization of a thymus-tropic HIV-1 isolate from a rapid progressor: role of the envelope." *Virology* 328(1): 74-88.
- Mellon, W. S. and H. F. DeLuca (1979). "An equilibrium and kinetic study of 1,25-dihydroxyvitamin D3 binding to chicken intestinal cytosol employing high specific activity 1,25-dehydroxy[3H-26, 27] vitamin D3." *Arch Biochem Biophys* 197(1): 90-5.
- Mellors, J. W., C. R. Rinaldo, Jr., et al. (1996). "Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma." *Science* 272(5265): 1167-70.
- Michael, N. L., L. G. Louie, et al. (1997). "The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression." *Nat Med* 3(10): 1160-2.
- Miyamoto, K., R. A. Kesterson, et al. (1997). "Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter." *Mol Endocrinol* 11(8): 1165-79.
- Mocharla, H., A. W. Butch, et al. (1997). "Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: lack of correspondence with common allelic variants." *J Bone Miner Res* 12(5): 726-33.



- Moonis, M., B. Lee, et al. (2001). "CCR5 and CXCR4 expression correlated with X4 and R5 HIV-1 infection yet not sustained replication in Th1 and Th2 cells." *Aids* 15(15): 1941-9.
- Morimoto, C., N. L. Letvin, et al. (1985). "The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset." *J Immunol* 134(3): 1508-15.
- Morimoto, C., N. L. Letvin, et al. (1986). "The cellular basis for the induction of antigen-specific T8 suppressor cells." *Eur J Immunol* 16(2): 198-204.
- Morrison, N. A., J. C. Qi, et al. (1994). "Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles." *Nature* 367(6460): 284-7.
- Morrison, N. A., R. Yeoman, et al. (1992). "Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15): 6665-9.
- Motohashi, Y., S. Yamada, et al. (2003). "Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* 88(7): 3137-40.
- Muller, K., N. Odum, et al. (1993). "1,25-dihydroxyvitamin D3 selectively reduces interleukin-2 levels and proliferation of human T cell lines in vitro." *Immunol Lett* 35(2): 177-82.
- Munch, J., L. Standker, et al. (2007). "Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide." *Cell* 129(2): 263-75.

- N**ejentsev, S., L. Godfrey, 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(15): 1633-9.
- Nelson, G. W., R. Kaslow, et al. (1997). "Frequency of HLA allele-specific peptide motifs in HIV-1 proteins correlates with the allele's association with relative rates of disease progression after HIV-1 infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(18): 9802-7.
- Nevado, J., S. P. Tenbaum, et al. (2007). "Activation of the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3." *J Mol Endocrinol* 38(6): 587-601.
- Nieto, G., Y. Barber, 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(1-5): 199-207.
- Norris, P. J. and E. S. Rosenberg (2001). "Cellular immune response to human immunodeficiency virus." *Aids* 15 Suppl 2: S16-21.



Omdahl, J. L., R. W. Gray, et al. (1972). "Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium." *Nat New Biol* 237(71): 63-4.

Ortlepp, J. R., J. Lauscher, et al. (2001). "The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease." *Diabet Med* 18(10): 842-5.

Ozaki, Y., S. Nomura, et al. (2000). "Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus." *Nephron* 85(1): 86-91.

Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1993). "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease." *Nature* 362(6418): 355-8.

Park, B. S., J. S. Park, et al. (1999). "Vitamin D receptor polymorphism is associated with psoriasis." *J Invest Dermatol* 112(1): 113-6.

Partridge, J. M., S. J. Weatherby, et al. (2004). "Susceptibility and outcome in MS: associations with polymorphisms in pigmentation-related genes." *Neurology* 62(12): 2323-5.

Patterson, B. K., M. Czerniewski, et al. (1999). "Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes." *Clin Immunol* 91(3): 254-62.

Penna, G. and L. Adorini (2000). "1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation." *J Immunol* 164(5): 2405-11.

Petersen-Mahrt, S. K. and M. S. Neuberger (2003). "In vitro deamination of cytosine to uracil in single-stranded DNA by apolipoprotein B editing complex catalytic subunit 1 (APOBEC1)." *J Biol Chem* 278(22): 19583-6.

Piatak, M., Jr., M. S. Saag, et al. (1993). "High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR." *Science* 259(5102): 1749-54.

Prehn, J. L., D. L. Fagan, et al. (1992). "Potentiation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3." *Blood* 80(11): 2811-6.

Premack, B. A. and T. J. Schall (1996). "Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection." *Nat Med* 2(11): 1174-8.



- R**acz, A. and J. Barsony (1999). "Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation." *J Biol Chem* 274(27): 19352-60.
- Ranjbar, S., N. Ly, et al. (2004). "Mycobacterium tuberculosis recall antigens suppress HIV-1 replication in anergic donor cells via CD8+ T cell expansion and increased IL-10 levels." *J Immunol* 172(3): 1953-9.
- Raport, C. J., J. Gosling, et al. (1996). "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." *J Biol Chem* 271(29): 17161-6.
- Rengarajan, J., S. J. Szabo, et al. (2000). "Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization." *Immunol Today* 21(10): 479-83.
- Richards, B., J. Skoletsky, et al. (1993). "Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs." *Hum Mol Genet* 2(2): 159-63.
- Rigby, W. F., L. Shen, et al. (1984). "Differentiation of a human monocytic cell line by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol): a morphologic, phenotypic, and functional analysis." *Blood* 64(5): 1110-5.
- Rothman KJ, G. S. (1998). "Case-Control studies." *Modern Epidemiology*. 2^a Ed. Philadelphia; Lippincott-Raven Publishers.
- Rowe, P. M. (1996). "A cofactor for HIV-1 entry into cells is identified." *Lancet* 347(9012): 1395.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods Mol Biol* 132: 365-86.

- S**adeghi, K., B. Wessner, et al. (2006). "Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns." *Eur J Immunol* 36(2): 361-70.
- Saeki, H., N. Asano, et al. (2002). "Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Japanese patients with psoriasis vulgaris." *J Dermatol Sci* 30(2): 167-71.
- Saito, M., N. Eiraku, et al. (2005). "Apol polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in HTLV-1 infected individuals." *J Neurol Sci* 232(1-2): 29-35.
- Samson, M., F. Libert, et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." *Nature* 382(6593): 722-5.
- Schinkel, J., M. W. Langendam, et al. (1999). "No evidence for an effect of the CCR5 delta32/+ and CCR2b 64I/+ mutations on human



- immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users." *J Infect Dis* 179(4): 825-31.
- Semba, R. D., N. Shah, et al. (2001). "Improvement of anemia among HIV-infected injection drug users receiving highly active antiretroviral therapy." *J Acquir Immune Defic Syndr* 26(4): 315-9.
- Shalekoff, S. and C. T. Tiemessen (2001). "Duration of sample storage dramatically alters expression of the human immunodeficiency virus coreceptors CXCR4 and CCR5." *Clin Diagn Lab Immunol* 8(2): 432-6.
- Shin, H. D., C. Winkler, et al. (2000). "Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14467-72.
- Simmons, J. D., C. Mullighan, et al. (2000). "Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility." *Gut* 47(2): 211-4.
- Singh, V. K., S. Mehrotra, et al. (1999). "The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy." *Immunol Res* 20(2): 147-61.
- Skrabic, V., T. Zemunik, et al. (2003). "Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population." *Diabetes Res Clin Pract* 59(1): 31-5.
- Sole, X., E. Guino, et al. (2006). "SNPStats: a web tool for the analysis of association studies." *Bioinformatics* 22(15): 1928-9.
- Steckley, J. L., D. A. Dyment, et al. (2000). "Genetic analysis of vitamin D related genes in Canadian multiple sclerosis patients. Canadian Collaborative Study Group." *Neurology* 54(3): 729-32.
- Stephens, M. and P. Scheet (2005). "Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation." *Am J Hum Genet* 76(3): 449-62.
- Stephens, M., N. J. Smith, et al. (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." *Am J Hum Genet* 68(4): 978-89.
- Stevens, S. W. and J. D. Griffith (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5557-61.
- Stewart, C. C. and S. J. Stewart (1994). "Cell preparation for the identification of leukocytes." *Methods Cell Biol* 41: 39-60.
- Stewart, G. J., L. J. Ashton, et al. (1997). "Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group." *Aids* 11(15): 1833-8.
- Suneetha, P. V., S. K. Sarin, et al. (2006). "Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease." *J Hepatol* 44(5): 856-63.
- Suttajit, M. (2007). "Advances in nutrition support for quality of life in HIV+/AIDS." *Asia Pac J Clin Nutr* 16 Suppl 1: 318-22.



Tachibana, K., S. Hirota, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." *Nature* 393(6685): 591-4.

Tamalet, C., A. Lafeuillade, et al. (1997). "Quantification of HIV-1 viral load in lymphoid and blood cells: assessment during four-drug combination therapy." *Aids* 11(7): 895-901.

Tokuda, N. and R. B. Levy (1996). "1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes." *Proc Soc Exp Biol Med* 211(3): 244-50.

Uitterlinden, A. G., Y. Fang, et al. (2004). "Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms." *Gene* 338(2): 143-56.

Vaickus, L., E. D. Ball, et al. (1991). "Immune markers in hematologic malignancies." *Crit Rev Oncol Hematol* 11(4): 267-97.

Valcke, H. S., N. F. Bernard, et al. (2006). "APOBEC3G genetic variants and their association with risk of HIV infection in highly exposed Caucasians." *Aids* 20(15): 1984-6.

Vilaseca, J., J. M. Arnau, et al. (1982). "Kaposi's sarcoma and toxoplasma gondii brain abscess in a Spanish homosexual." *Lancet* 1(8271): 572.

Visco-Comandini, U., C. Hultgren, et al. (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 disease progression, CCR5 genotype, and specific immune responses." *Clin Diagn Lab Immunol* 5(4): 463-6.

Whitfield, G. K., L. S. Remus, et al. (2001). "Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene." *Mol Cell Endocrinol* 177(1-2): 145-59.

Wu, L., W. A. Paxton, et al. (1997). "CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro." *J Exp Med* 185(9): 1681-91.



- Y** amamoto, H., K. Miyamoto, 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(2): 240-7.
- Ye, W. Z., A. F. Reis, et al. (2000). "Identification of a novel Tru9 I polymorphism in the human vitamin D receptor gene." *J Hum Genet* 45(1): 56-7.
- Yu, L., J. Cecil, et al. (2006). "Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1." *Gene* 374: 174-9.

- Z** ehnder, D., R. Bland, 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(3): 621-9.
- Zemunik, T., V. Skrabic, et al. (2005). "Fok-I polymorphism, vitamin D receptor, and interleukin-1 receptor haplotypes are associated with type 1 diabetes in the Dalmatian population." *J Mol Diagn* 7(5): 600-4.
-

