



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

**INFLUENCIA DE LOS ALELOS HLA CLASE I, CLASE II Y EL  
POLIMORFISMO DEL PROMOTOR DEL TNF- $\alpha$  EN LA LONGEVIDAD  
DE MESTIZOS MEXICANOS.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**ELENA SOTO VEGA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS**

**MÉXICO, D.F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la dirección del Dr. Luis Guillermo Llorente Peters.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado (No. de Becario142551)

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutorial:

Dr. Julio Granados Arriola.

Dr. Moisés Selman.

Dr. Luis Guillermo Llorente Peters.

## **INDICE**

<b>1. RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
2.1 CONSIDERACIONES GENERALES DEL ENVEJECIMIENTO	7
2.2 CAMBIOS EN EL SISTEMA INMUNE POR EL ENVEJECIMIENTO	9
2.2.1 Linfocitos T	10
2.2.2 Linfocitos B	13
2.2.3 Células accesorias	14
2.2.4 Inmunidad innata	15
2.2.5 Reorganización del sistema inmune como promotor de longevidad	17
2.3 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	21
2.3.1 Función de las moléculas HLA	24
2.3.2 Moléculas de HLA clase I	26
2.3.3 Moléculas HLA de clase II	27
2.3.4 Moléculas HLA de clase III	29
2.4 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ )	30
2.4.1 POLIMORFISMOS DEL TNF- $\alpha$	30
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>34</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>35</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>9. DISCUSION</b>	<b>56</b>
ANEXO 1. Indices	59
ANEXO 2. Forma de autorización	65
ANEXO 3. Métodos	66
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>73</b>
<b>11. ARTICULOS PUBLICADOS</b>	<b>83</b>

## 1. RESUMEN

**Antecedentes.** Existe evidencia de que el fondo genético de los individuos es un factor muy importante en el envejecimiento exitoso y como consecuencia en la longevidad. En este estudio analizamos la frecuencia de alelos del complejo principal de histocompatibilidad clase I, clase II así como del polimorfismo -308 del promotor del TNF- $\alpha$  (TNF2), y su posible asociación con la expectativa de vida en los ancianos mestizos mexicanos.

**Métodos.** Se estudiaron 72 ancianos sanos mestizos mexicanos mayores de 80 años de edad y como controles, se estudiaron 99 individuos jóvenes mestizos mexicanos no relacionados cosanguíneamente con el grupo de estudio. La tipificación de los alelos del CPH se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos secuencia específicos (PCR SSO). El estudio del polimorfismo del promotor del TNF- $\alpha$  se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos específicos para la sustitución de los nucleótidos.

**Resultados.** Se observó un incremento significativo en la frecuencia del alelo HLA-DRB1\*11 en las ancianas, mientras que este alelo no se encontró presente en ningún anciano hombre. El alelo TNF2 fue más frecuente en el grupo de ancianos cuando se comparó contra los jóvenes. El resto de los alelos probados no mostró diferencias significativas entre ambos grupos.

**Conclusiones.** Los datos sugieren que el alelo HLA-DRB1\*11 tiene un papel importante en las ancianas, que se asocia con una mayor expectativa de vida independiente de la etnia, así como una posible participación del alelo TNF2 en el

envejecimiento exitoso debido a un remodelamiento del sistema inmune en la senescencia.

## ABSTRACT

**Background.** There is strong evidence that an individual's genetic background is an important predisposing factor to longevity. In the present study we analysed the frequency of class I, class II, MHC alleles as well as the TNF- $\alpha$  -308 polymorphism that may be related to an increased life span in Mexican Mestizo healthy elders.

**Results.** HLA typing was performed by polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotide (PCR SSO) reverse dot blot. The TNF- $\alpha$  -308 polymorphism (TNF2 alleles) was assessed by PCR restriction fragment length polymorphism. A significant increased frequency of HLA-DRB1\*11 was found in elderly women whereas this allele was not present in elderly males. The TNF2 allele was also increased in the elder group when compared to young controls. The frequencies of the remaining alleles tested were not statistically different among groups.

**Conclusions.** These data suggest an ethnicity independent tendency of HLA-DRB1\*11 in elder females to increase life span and a possible role of the TNF2 allele with the successful remodelling of senescent immune system.

Los hombres son como los vinos:

La edad agría los malos y mejora los buenos

**Cicerón**

## **2. INTRODUCCIÓN.**

### **2.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL ENVEJECIMIENTO.**

Durante el último siglo se han propuesto un gran número de teorías para explicar la naturaleza del envejecimiento. Estas teorías van desde la teoría del daño simple por desgaste o deterioro hasta la teoría llamada del error catástrofe. Por la naturaleza multicausal del envejecimiento, resulta improbable que una única teoría pueda explicarlo. Hay que tomar en cuenta que los estudios sobre el envejecimiento han señalado que se encuentran implicados en este proceso más de 100 genes, así como un gran número de mutaciones en otros genes que se han relacionado con el envejecimiento. Además, tenemos que tener claro que el envejecimiento ocurre a todos los niveles: en el ámbito molecular, nivel celular e incluso al nivel de los órganos.

A continuación se enumeran las principales teorías que a la fecha existen para explicar el envejecimiento:

**Teoría estocástica**, Considera al genoma como el principal protagonista del fenómeno de envejecimiento y por otro lado, incluyen un conjunto de fenómenos ambientalistas que consideran al entorno celular como el responsable del deterioro de la homeostasis celular



**Teoría genética**, confiere un papel principal a los daños provocados al azar en el genoma.

**Teoría de los radicales libres**, postula que el envejecimiento resulta de los efectos perjudiciales causados a los tejidos por reacciones de los radicales libres.

**Teoría de error-catástrofe**, postula que con la edad surgen errores en los mecanismos de síntesis de proteínas, que causan la producción de proteínas anormales.

**Teoría Inmunológica**, esta teoría genética del envejecimiento propone que el genoma nuclear, actúa como un reloj celular o molecular, dentro de estos cambios presentados con el tiempo se ha observado una disminución en la capacidad del sistema inmune para defenderse de las agresiones del medio.

Debido a que este trabajo esta enfocado a los polimorfismos del Complejo principal de histocompatibilidad y este tiene un papel fundamental en la respuesta inmune a continuación se desarrolla mas ampliamente la teoría inmunológica del envejecimiento.

## **2.2 CAMBIOS EN EL SISTEMA INMUNE POR EL ENVEJECIMIENTO.**

El envejecimiento se caracteriza por una disminución gradual en la capacidad del individuo para adaptarse y/o responder a los estímulos externos que lo rodean. Fisiológicamente, el envejecimiento se traduce en la dificultad para mantener la homeostasis, intervienen un sinnúmero de factores, tanto aquellos inherentes al proceso de envejecimiento, como los que provienen de su medio ambiente, la variabilidad genética de cada individuo, de ahí que no todos los individuos envejezcan de igual manera (1).

Uno de los sistemas afectados durante el envejecimiento es el sistema inmune, ya que en el envejecimiento, el sistema inmune experimenta eventos complejos de reorganización, como la emergencia de mecanismos homeostáticos de compensación, así como alteraciones funcionales, lo que constituye un *continuum* en el proceso de desarrollo del individuo. Al conjunto de dichos cambios se le denomina “inmunosenescencia” (2).

La integridad del organismo se conserva en gran parte por las respuestas innata (o natural) y adaptativa del sistema inmune. La respuesta inmune innata posee una estructura altamente conservada a través de la evolución y confiere una rápida, aunque incompleta, defensa contra agentes extraños hasta que la respuesta adquirida se desarrolla. En ésta última, los linfocitos T y B son los protagonistas celulares, lo que provee una gran variabilidad y versatilidad orientadas a elaborar respuestas efectivas y altamente específicas. Aunque ambas se ven alteradas con el envejecimiento, la inmunidad adquirida es más susceptible a los efectos deletéreos de la edad, puesto que al nacer es inmadura, alcanza su máximo funcionamiento durante la pubertad y declina progresivamente

en la etapa adulta. Por el contrario, la inmunidad innata varía muy poco en el transcurso de la vida (3, 4).

El espectro de las modificaciones del sistema inmune en la vejez abarca desde las células hematopoyéticas pluripotenciales, los progenitores linfoides en el timo y médula ósea, hasta los linfocitos maduros en órganos linfoides secundarios (5).

### **2.2.1 Linfocitos T.**

Los cambios en el sistema inmune inherentes a la edad, comienzan en la pubertad o una vez que se alcanza la madurez sexual al iniciarse la involución del timo, suceso fisiológico que se manifiesta con la disminución en el tamaño del órgano y el reemplazo del tejido linfoide por grasa y tejido fibrótico. Este proceso ocurre de manera distinta entre sexos, i.e., en el hombre la involución del timo es progresiva, mientras que en la mujer se interrumpe en el periodo pre-menopáusico alrededor de los 42 años y, posteriormente, continúa su reducción de manera uniforme. Hacia la sexta década de la vida, la diferencia entre géneros es ya muy pequeña. Sin embargo, en algunos casos el timo conserva la capacidad de producir pequeñas cantidades de hormonas que favorecen la diferenciación de las células T vírgenes, o por otra parte, los órganos linfoides periféricos sustituyen la función del timo, lo que podría ser un factor que contribuye a la longevidad (6, 7).

El paradigma actual de la inmunosenescencia coloca a los linfocitos T y sus interacciones con otras células (*vide infra*) como los más afectados por la decadencia del sistema inmune en el envejecimiento. Los cambios funcionales más notorios en los linfocitos T incluyen respuestas de inmunidad retardada de baja intensidad, disminución en las respuestas proliferativas ante mitógenos,

alteraciones en su capacidad tanto inmunorreguladora como citotóxica y diferencias numéricas en ciertas subpoblaciones celulares (8).

La pérdida en la capacidad proliferativa de los linfocitos T puede estar relacionada con los bajos niveles de algunas citocinas como la interleucina (IL)-2, y la disminución en la expresión de algunos genes (c-myc, c-myb) que intervienen en la progresión del ciclo celular, por lo que el proceso de expansión clonal en estas células se ve limitado (9, 10).

Durante el proceso de envejecimiento la proporción y el número total de linfocitos T CD4+ y CD8+ no se modifica significativamente, sin embargo, predominan las células de memoria (CD45Ro+ CD29+) y el número de linfocitos T vírgenes (CD45Ra+) disminuye. El fenotipo de algunas subpoblaciones de linfocitos T cambia y se ve reflejado en la pérdida o disminución de la expresión de ciertas moléculas de superficie como consecuencia de cambios en la estructura del citoesqueleto que impiden el movimiento de las vesículas que transportan dichos receptores hacia la membrana celular (8). Uno de los ejemplos más claros es la presencia de un grupo de linfocitos T caracterizados por la ausencia de la molécula CD28. Esta es una de las principales moléculas de co-estimulación. Los linfocitos T CD4+ (cooperadores) con fenotipo CD28- reaccionan con auto-antígenos *in vitro* y son detectados frecuentemente en ancianos. Por otra parte, la ausencia del CD28 se relaciona a su vez con la falta de expresión de otra molécula co-estimuladora, el CD40, que interviene en la activación de células presentadoras de antígeno y en la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad y el cambio de isotipo. Así, la incapacidad de los linfocitos T CD4+CD28-CD40- para interactuar con otras

células puede explicar parcialmente algunas de las alteraciones inmunológicas que se presentan con la edad (11). Por otra parte, el fenotipo celular CD28- en linfocitos T CD8+ se ha asociado con una mayor función supresora (12).

Aunado a lo anterior, la hiporreactividad de las células T de los ancianos se relaciona con modificaciones en las vías de transducción. Se han observado defectos tanto en la movilización de calcio intracelular, como en la fosforilación de proteínas de señalización intracelular. Una de las vías que se encuentran alteradas durante el envejecimiento es la vía de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Por otra parte, algunas isoformas de la proteína cinasa C ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\xi$ ) pierden su capacidad para translocarse hacia el núcleo celular. El estudio de factores de transcripción en las células T de ancianos ha permitido demostrar que factores como AP-1, NF-AT y NF- $\kappa$ B presentan una menor actividad. Estas moléculas participan en la proliferación, diferenciación y activación de las células T, por lo que su ineficiencia afecta una muy diversa gama de procesos celulares (13).

Como consecuencia de los defectos en la activación, proliferación, diferenciación, capacidad co-estimuladora y señalización intracelular de los linfocitos T, el perfil de citocinas en el anciano es predominantemente promotor de respuestas inmunes humorales inespecíficas, i.e., deficiencia de IL-2 y aumento de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  (14), aunque la suma algebraica de los efectos de estas citocinas tiene un resultado netamente pro-inflamatorio que, aparentemente, es el responsable de las patologías relacionadas a la edad avanzada, e.g., aterosclerosis, diabetes, sarcopenia.

### **2.2.2 Linfocitos B.**

En el anciano la inmunidad humoral se encuentra alterada, cualitativa y cuantitativamente. En general, los niveles séricos de IgM disminuyen, en tanto que los de IgG e IgA aumentan, como consecuencia de respuesta secundarias y la memoria inmunológica, lo que sugiere un aumento en la producción de anticuerpos en respuesta a antígenos propios o una activación policlonal de linfocitos B por endotoxinas bacterianas. Más aun, cerca del 15% de los ancianos sanos mayores de 85 años, tienen gamopatía monoclonal benigna (15).

La producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos exógenos conocidos, (con los que ya se ha tenido contacto previo) se encuentra disminuida y un claro ejemplo es la baja efectividad de los anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación. A pesar de que el número de linfocitos B que responden a antígenos exógenos disminuye con la edad, la cantidad de anticuerpos producidos por cada célula no se modifica. Al parecer, la mayoría de las deficiencias observadas en estas células son el resultado de la incapacidad de las células T de proveer una activación adecuada a través de moléculas co-estimuladoras como el CD154 o algunas citocinas (16).

En contraste, en el envejecimiento existe un aumento en la producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos propios, tanto órgano-específicos (anti-tiroperoxidasa y anti-tiroglobulina) como inespecíficos (anti-DNA, anti-histonas, factor reumatoide, anti-fosfolípidos). Estos autoanticuerpos pueden ser producidos en respuesta a la alteración que sufren los autoantígenos por oxidación o glicosilación, o bien, por reactividad cruzada con antígenos exógenos, e.g., las proteínas de choque térmico (17).

La deficiencia en la producción de anticuerpos específicos de alta afinidad, puede deberse, en parte, a que los centros germinales se encuentran en menor número y tamaño, ya que es aquí donde los antígenos son presentados a las células B y donde ocurre el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas(18). Adicionalmente, la capacidad para llevar a cabo la hipermutación somática se encuentra, en general, disminuida en sujetos de edad avanzada (4). A diferencia de lo que ocurre con las células T, no existe una acumulación de células B de memoria en los individuos de edad avanzada (19), pero sí un aumento en la proporción de linfocitos B-1 (CD5+), responsables de la producción de auto-anticuerpos naturales (20).

### **2.2.3 Células accesorias.**

Las células presentadoras profesionales de antígeno (células dendríticas y macrófagos) son esenciales para la inducción de una respuesta inmune T-dependiente. Aparentemente, en el anciano, el número total de células dendríticas es menor, sin embargo, la capacidad funcional *in vitro* de éstas células es igual o incluso más efectiva que en individuos jóvenes, lo que indica que al menos una subpoblación de células dendríticas conserva su función en óptimas condiciones. A su vez, los monocitos presentan una disminución en la producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (IL-1, G-CSF, GM-CSF, IL-8, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ) en respuesta a lipopolisacárido *in vitro*. Aunque la expresión de moléculas de superficie en los monocitos no se modifica, la velocidad de depuración de antígenos y la respuesta anti-tumoral por estas células disminuye notablemente (21).

#### **2.2.4 Inmunidad innata.**

La primera línea de defensa para mantener al organismo libre de patógenos, células neoplásicas y otros agentes dañinos residen en la respuesta inmune innata. Los elementos de esta respuesta incluyen proteínas del complemento, granulocitos y particularmente células asesinas naturales (NK), sus funciones efectoras tales como quimiotaxis, fagocitosis, citotoxicidad natural y producción de mediadores solubles e.g., citocinas y quimiocinas. Estos mecanismos primarios de defensa inmunológica se han conservado a través de la evolución y son los que muestran mayor estabilidad a lo largo de la vida del individuo (22). Sin embargo, en ancianos sanos, se han observado ciertas alteraciones en varios de estos mecanismos. Así, en las bacteremias agudas del anciano las proteínas del complemento se encuentran ligeramente disminuidas, al contrario de lo que ocurre en sujetos jóvenes. Se han descrito deficiencias en las respuestas quimiotácticas, así como en la fagocitosis, que se correlacionan con una baja producción del anión superóxido por los monocitos (23). A su vez, en los neutrófilos sólo se han observado ciertos defectos en la activación, proliferación y degranulación durante las infecciones crónicas (24). Los neutrófilos están reducidos en número aunque ésta disminución no implica necesariamente una deficiencia funcional. Sin embargo, el reclutamiento de neutrófilos hacia sitios de infección ocurre por la acción de varias moléculas, como las proteínas del complemento, quimiocinas, productos derivados de bacterias y la interacción con moléculas de adhesión. Estas son proteínas que se expresan en las membranas endoteliales y a través de la unión con sus respectivos ligandos expresados en los leucocitos, promueven la extravasación de las células hacia el sitio de infección o daño tisular. En el



envejecimiento la expresión de moléculas de adhesión por lo regular no se ve alterada, aunque puede haber un aumento en la expresión de CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD15, LFA-1, entre otras (25). Este aumento puede atribuirse a una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias como mecanismo de compensación para la resolución de infecciones.

Uno de los procesos de inmunidad innata mejor conservados en el anciano es la citotoxicidad mediada por células NK (26). De hecho, se ha observado que las células NK de ancianos, pueden destruir células blanco eficazmente y responder a estímulos quimiotácticos con la misma eficiencia que las de individuos jóvenes. En algunos estudios se ha reportado un aumento en el número absoluto de la población NK en el envejecimiento (27).

Recientemente, se ha descrito un grupo de moléculas altamente conservadas en la evolución llamadas receptores tipo toll (*toll like receptors* [TLR]), y que se expresan principalmente en las células presentadoras de antígeno. La función de los TLR es reconocer patrones moleculares en los patógenos. La interacción entre estos receptores y sus ligandos tiene como resultado la síntesis de péptidos antibacterianos como defensinas y la producción de citocinas como el TNF- $\alpha$  y la IL-6 con las que se desencadena la respuesta inflamatoria. Algunos estudios en ancianos han mostrado menor expresión y función de varios TLR, asociada con una mayor susceptibilidad de estos individuos a infecciones por levaduras y bacterias (28).

Las alteraciones del sistema inmunitario descrita, ciertamente podrían contribuir en la morbilidad y mortalidad en la vejez al incrementar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y a otras patologías relacionadas con la edad avanzada

como son la aterosclerosis y el cáncer. Todas ellas, por lo demás, tienen un componente inmunológico importante en su fisiopatogenia.

### **2.2.5 Reorganización del sistema inmune como promotor de longevidad.**

Un aspecto que suele pasar inadvertido en el estudio de la inmunosenescencia es el caso de los centenarios, i.e., el de todas aquellas personas que han alcanzado los 100 ó más años de edad en condiciones óptimas de salud física y mental. Hasta hace poco tiempo a este grupo de individuos se les consideraba como una mera curiosidad biológica, sin embargo, hoy por hoy esto ya no es del todo cierto, sobre todo en países económicamente desarrollados. De hecho, el número de ancianos que alcanzan los 100 años se ha incrementado dramáticamente y, de acuerdo a predicciones recientes, la población de longevos entre 95 y 100 años de edad representará en poco tiempo, un grupo etario a considerar en todos los aspectos desde lo biológico a lo social y aún en lo político (29). Más aun, los centenarios son el más claro ejemplo del envejecimiento exitoso ya que han logrado evadir las enfermedades comunes del “anciano joven” y han alcanzado el límite superior de la duración de la vida humana (100-120 años). Generalmente la historia clínica de estos individuos –hasta hoy excepcionales– muestra una clara ausencia de enfermedades como el cáncer, demencia, diabetes, enfermedades cardiovasculares e incluso cataratas (30). Luego, se puede deducir que en los centenarios el remodelamiento del sistema inmune es óptimo y muchos de los mecanismos de defensa se encuentran extraordinariamente conservados. Los estudios más recientes han demostrado que, en efecto, este es el caso (31).

Así, en la hematopoyesis se ha observado que los centenarios presentan números absolutos normales de eritrocitos y contenido de hemoglobina, así como de granulocitos, monocitos y plaquetas. En cuanto a la inmunidad celular, el repertorio de receptores de linfocitos es completamente funcional, i.e., que sus células T proliferan adecuadamente ante estímulos policlonales y tras el contacto con superantígenos. En el aspecto de la inmunidad humoral no producen auto-anticuerpos órgano-específicos como los ancianos menores a 85 años pero sí auto-anticuerpos órgano inespecíficos, e.g., anti-DNA, factor reumatoide. Se ha propuesto que estos auto-anticuerpos no tienen nada que ver con fenómenos autoinmunes, sino más bien podrían ser la consecuencia de la exposición a antígenos por un extenso número de años, o bien actuar como moléculas fisiológicas de regulación al transportar productos metabólicos o catabólicos, funcionar como opsoninas o formar parte de la red de idiotipos.

Las células citotóxicas (células NK y linfocitos T citotóxicos) provenientes de centenarios característicamente no presentan alteraciones funcionales y se ha llegado a postular que son las mejores predictoras de longevidad.

Por último, los leucocitos de estos individuos tienen una locomoción normal ante estímulos quimiotácticos y sobreexpresan moléculas de adhesión como CD11a, CD18 y algunas isoformas de CD49. Sus linfocitos circulantes son resistentes al estrés oxidativo y presentan una gran estabilidad genómica, e.g., escasos rompimientos espontáneos de cromátides.

Todos estos hallazgos sugieren que además del remodelamiento inmunológico adecuado, el fondo genético y el estilo de vida son, sin duda, factores determinantes para un envejecimiento exitoso y más aun, una vida longeva (32).

En la Tabla 1 se muestran los principales cambios del sistema inmune en la vejez y sus diferencias con los del envejecimiento exitoso.

La definición de envejecimiento exitoso fue acuñado por primera vez por John Rowe en 1987, para definir a aquellos individuos que han escapado de la mayoría de las enfermedades asociadas con la edad, además de encontrarse en un buena condición física y mental.

**Tabla 1.** Cambios del sistema inmune en la vejez y sus diferencias con los del envejecimiento exitoso.

<b>COMPARTIMIENTO INMUNE</b>	<b>INMUNOSENESCENCIA</b>	<b>ENVEJECIMIENTO EXITOSO</b>
<b>Hematopoyesis</b>	Número reducido de células progenitoras hematopoyéticas. Disminución en la capacidad proliferativa de células pluripotenciales. Baja producción de factores estimuladores de colonias.	Números absolutos normales de eritrocitos circulantes, contenido de hemoglobina, granulocitos, monocitos y plaquetas.
<b>Timo</b>	Involución del timo. Pérdida total de la capacidad de producción de hormonas tímicas.	Involución del timo. Producción de pequeñas cantidades de hormonas tímicas.
<b>Linfocitos T</b>	Disminución en la capacidad proliferativa ante mitógenos. Defectos en las respuestas de hipersensibilidad retardada. Baja producción de IL-2. Mayor proporción de linfocitos T de memoria vs. linfocitos T vírgenes. Disminución en la expresión de moléculas de superficie co-estimuladoras.	Capacidad proliferativa conservada ante estímulos policlonales o superantígenos. Proporción normal de linfocitos T de memoria y vírgenes. Repertorio TV $\beta$ conservado.
<b>Linfocitos B</b>	Aumento en la producción de IgA e IgG, disminución de los niveles circulantes de IgM. Número reducido de linfocitos B que responden a antígenos exógenos. Producción de autoanticuerpos, órgano-específicos y órgano inespecíficos.	Aumento en la producción de IgA e IgG, disminución de los niveles circulantes de IgM. Ausencia de autoanticuerpos órgano-específicos y producción de autoanticuerpos órgano inespecíficos.
<b>Células accesorias</b>	Menor número de células dendríticas, pero funcionalmente normales. Depuración de antígenos y capacidad anti-tumoral deficiente por parte de los monocitos.	Menor número de células dendríticas, pero funcionalmente normales. Respuestas quimiotácticas normales.
<b>Células NK</b>	Incremento en el número de células circulantes. Capacidad funcional conservada.	Incremento en el número de células circulantes. Capacidad funcional conservada.
<b>Citocinas</b>	Aumento en la producción de IL-1, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ , disminución en la producción de IL-2.	Aumento en la producción de IL-1, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ , disminución en la producción de IL-2.

### **2.3 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

El complejo principal de histocompatibilidad (CPH) fue descrito por primera vez en 1936 por Gorer, en la superficie de los leucocitos de ratón, y en 1950 por Jean Dausset en los leucocitos de los humanos. (33, 34), por lo que los productos génicos de este complejo fueron conocidos como antígenos leucocitarios, por esta razón, en los humanos es también conocido como antígenos leucocitarios humanos o sus siglas en inglés HLA (Human Leukocyte antigen). Las moléculas del HLA fueron estudiadas originalmente por su capacidad para conferir tolerancia después de un injerto o bien un trasplante de órgano, pero actualmente se sabe que su función primaria es proteger contra patógenos, mediante la presentación de antígenos a las células T.

En el año 2003 se completó la secuencia de la región HLA como parte del proyecto en el que se mapea por completo el cromosoma 6, ahora se sabe que el HLA ocupa un total de 7.6 Mb del brazo corto de este cromosoma (35).

El 5 % del genoma humano puede atribuirse a duplicaciones segmentales, estas duplicaciones a mayor o menor escala pueden explicar la distribución de las familias de genes en el humano (35). Estos grupos de genes duplicados son distintivos del HLA, y pueden deberse a que los productos de algunos genes están físicamente asociados como el HLA-DQA y el HLA-DQB, esta unión debe asegurarse ya que los componentes de la proteína deben ser coexpresados en cantidades apropiadas para la formación de heterodímeros.

La región del HLA actualmente se clasifica en 6 grupos (definidos como 3 o más genes parálogos o pseudogenes localizados dentro de una región de 1 Mb) y 6

supergrupos (definido como un grupo con genes adicionales relacionados localizados fuera del corazón del grupo pero dentro del HLA).

A continuación se presenta la última clasificación aceptada para el HLA, publicada en el 2005 en la revista Nature reviews GENETICS. Los grupos y supergrupos de acuerdo con su posición en el cromosoma 6 del centrómero al telómero son:

**Supergrupo de Histonas.** Proteínas involucradas en la formación del nucleosoma (36).

**Grupo acarreador de solutos.** Es una familia diversa de genes pobremente apreciados, con un papel fisiológico crucial en el transporte de solutos y nutrientes (37).

**Supergrupo de genes HLA clase I.** Contiene los genes del HLA clásicos (HLA-A, -B, -C), los genes no clásicos (HLA-E, -F, -G, HFE y 12 pseudogenes) y las moléculas similares a la clase I (MIC-A, MIC-B y 5 pseudogenes). En conjunto con la  $\beta$ -2-microglobulina, los genes clase I clásicos presentan antígenos a las células T CD8+, además de estas, las moléculas no clásicas (HLA-E y -G) también se encuentran involucrados en la respuesta inmune mediada por células asesinas naturales (38).

**Supergrupo del tRNA.** Los genes del tRNA son genes de tamaño pequeño, tan solo 75 a 90 pb y son cruciales en la síntesis de proteínas, ya que funcionan como moléculas adaptadoras (39).

**Supergrupo de la butirofilina.** Son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y su función se desconoce (40).

**Grupo del receptor vomeronasal.** Son miembros de la familia de receptores de feromonas, moléculas involucradas en la percepción subconsciente de sustancias

volátiles. En los humanos parece haberse perdido evolutivamente la funcionalidad de estos receptores (41).

**Supergrupo del receptor olfatorio.** Con alrededor de 400 miembros funcionales, la familia de los receptores olfatorios parece proveer las bases de la percepción del olor (42).

**Supergrupo de los dedos de zinc.** Aquí se localizan genes que codifican las proteínas conocidas como dedos de zinc y se encuentran agrupadas de acuerdo a la presencia de dominios particulares de dedos de zinc, más que a similitudes en las secuencias (43).

**Grupo del Factor de necrosis tumoral.** Este grupo contiene genes de tres citocinas diferentes (TNF, LTA y LTB), involucrados en procesos inflamatorios (44).

**Grupo de antígenos de linfocitos.** Genes que codifican proteínas que se anclan a la membrana celular a través del glicosil fosfatidilinositol tienen una función inmune aparente (45).

**Grupo de las proteínas de choque térmico.** Son proteínas reguladas por estrés celular como calor, estas proteínas actúan como chaperonas en la síntesis, doblamiento y ensamblaje, transporte y degradación de proteínas (46).

**Grupo de moléculas clase II.** Este grupo de genes comprende los genes clásicos clase II (HLA-DP, -DQ, -DR y pseudogenes) y las moléculas no clásicas clase II (HLA-DM y -DO). Las moléculas clásicas clase II son expresadas en la superficie celular como heterodímeros formados por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Estas moléculas presentan antígenos a las células T CD4+. Los genes no clásicos no se expresan en la superficie celular, pero forman complejos heterotetraméricos



involucrados en el intercambio y carga del péptido en las moléculas clase II clásicas (47).

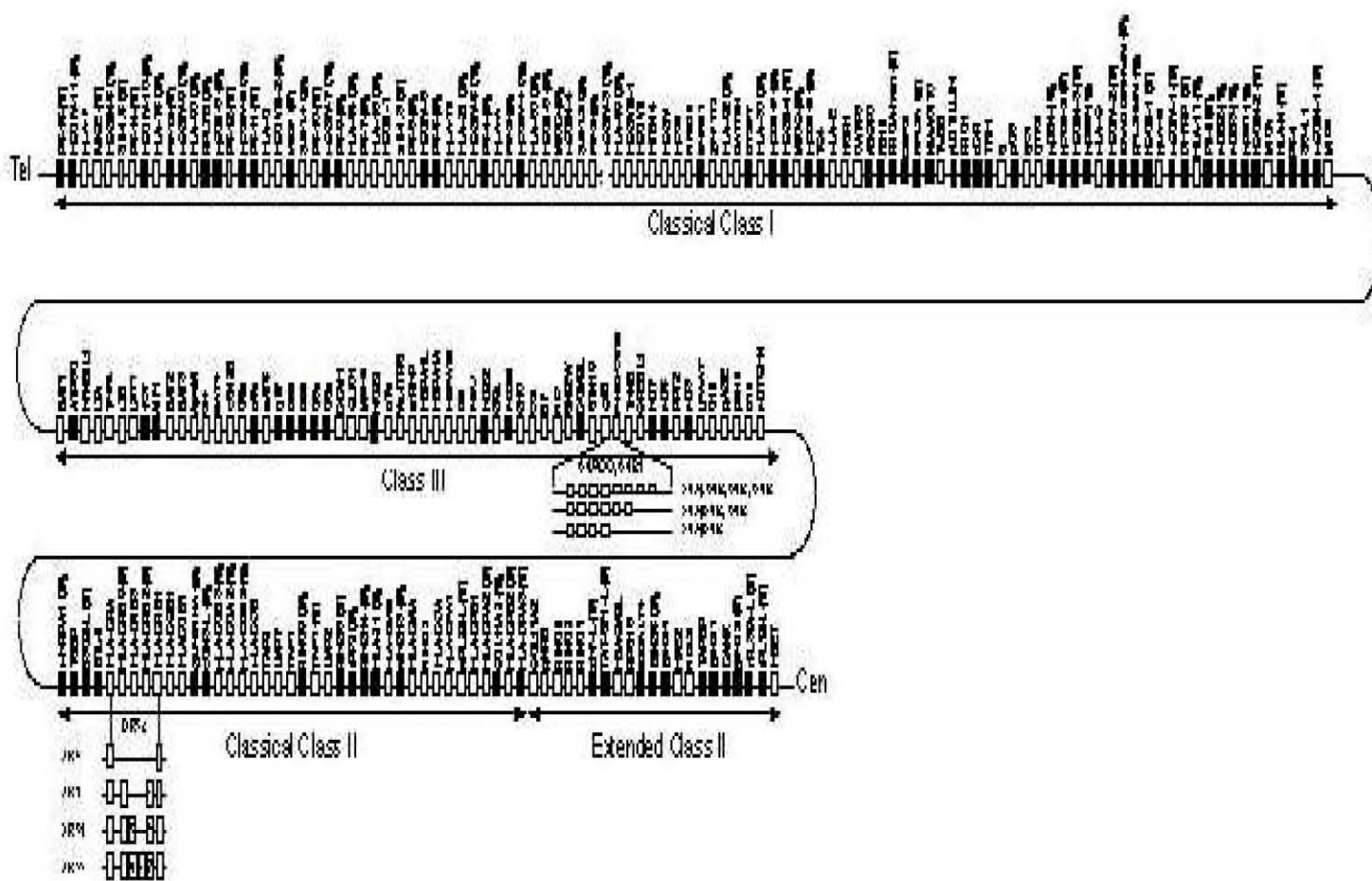
### **2.3.1 Función de las moléculas HLA.**

Los antígenos HLA permiten al sistema inmune distinguir entre componentes propios y no propios, proceso vital para la sobrevivencia, puesto que garantiza que los mecanismos de defensa basados en la identificación de lo propio por las células del sistema inmune, sean capaces de eliminar selectivamente microorganismos invasores, sustancias tóxicas o células tumorales que expresan antígenos exógenos ó extraños.

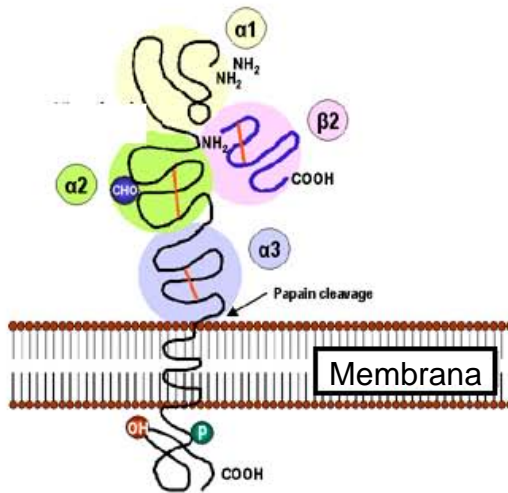
En condiciones fisiológicas, las moléculas del HLA se expresan en la superficie celular y se unen a antígenos completos o a fragmentos de ellos, como los presentes en las membranas bacterianas o de virus que penetran al organismo durante una infección. De este modo, los antígenos exógenos son presentados por las moléculas del HLA a los linfocitos T y así, el organismo puede desencadenar una respuesta inmunitaria específica destinada a eliminarlos.

Las moléculas del HLA se subdividen en tres categorías distintas con base a su estructura química, distribución tisular y función (Figura 1). Las de clase I y clase II se encuentran en superficies celulares y participan en la presentación antigénica; las moléculas clase III son proteínas que se encuentran en la sangre y que están involucradas principalmente en la inmunidad natural (48).

Figura 1. Mapa genético del cromosoma 6, sitio de localización del Complejo Principal de Histocompatibilidad.



### 2.2.2 Moléculas HLA clase I.



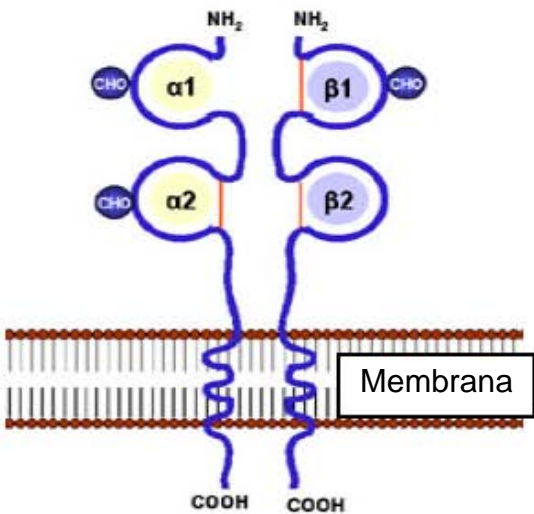
**Figura 2.-** Esquema de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase I

Las moléculas clase I del HLA son aquellas cuyos genes se encuentran localizados hacia la región telómerica del cromosoma 6 y se encuentran expresadas en todas las células del organismo que contienen núcleo. A medida que se sintetizan y transportan a la superficie celular, estas moléculas se enlazan a antígenos extraños provenientes de virus u otros microorganismos que hayan invadido la célula y se encuentren en proceso de división y síntesis de nuevas proteínas en el citoplasma de la célula huésped. Así el complejo HLA-antígeno, emerge hacia la superficie celular, donde se expresa y es identificado por el linfocito T citotóxico. Tras esta interacción, el linfocito se activa y comienzan diversos procesos como la liberación de enzimas citotóxicas que finalmente, destruyen a la célula infectada o maligna.

Hay tres locus principales relacionados con la síntesis de las moléculas clase I, el HLA-A, HLA-B y HLA-C. Los locus HLA-A y HLA-B tienen más de 30 genes distintos y de acuerdo a los genes que se hayan heredado, es posible tipificar

histológicamente las células del cuerpo en función de los antígenos del HLA expresados. Generalmente se asignan números a éstos genes, de modo que se dice, por ejemplo, que un individuo tiene tejidos del genotipo HLA-A\*24 (49) (Figura 2).

### 2.2.3 Moléculas HLA de clase II.



**Figura 3.-** Esquema de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase II

Las moléculas del HLA de clase II están codificadas por una región del cromosoma 6 llamada HLA-D, formada por las tres subregiones principales: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Las moléculas clase II tienen una distribución tisular restringida y se encuentran expresadas principalmente en las células del sistema inmune, como por ejemplo en los macrófagos, que fagocitan bacterias y complejos inmunes.

Las moléculas HLA de clase II desempeñan básicamente la misma función que las de clase I. Intervienen en la presentación de antígenos extraños a los linfocitos T, sin embargo, en este caso, el microorganismo englobado queda atrapado dentro de vesículas membranosas citoplásmicas de la célula huésped, donde es degradado. Algunas de estas proteínas microbianas se combinan con las moléculas de clase II y son transportadas a la superficie celular, donde presentan el antígeno a los linfocitos T cooperadores o de ayuda (Figura 3).

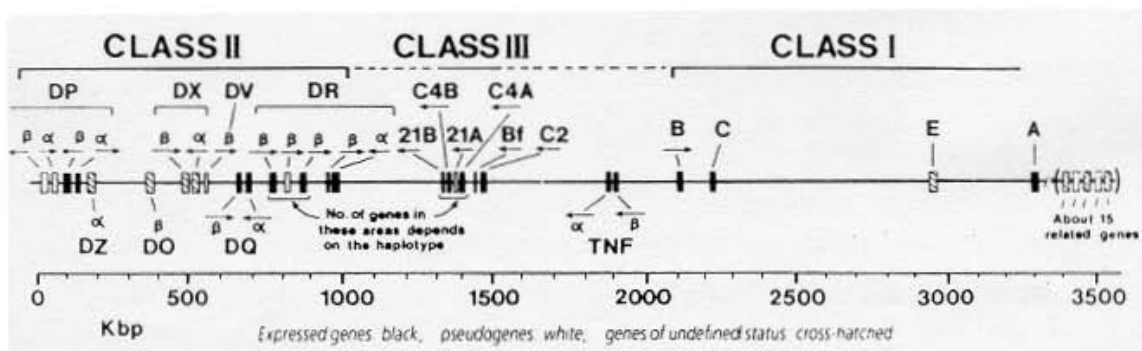
Estas subpoblaciones de linfocitos T desempeñan funciones muy distintas. Se diferencian fenotípicamente por la expresión del antígeno CD4 en el caso de los T cooperadores y el CD8 en los citotóxicos. El CD4 se enlaza con las moléculas HLA de clase II y el CD8 con las de clase I. Esto indica cómo contribuyen estas moléculas a la ejecución de una respuesta inmune en particular, desencadenada con la presentación del antígeno en el contexto de las moléculas del HLA clase I o clase II a los linfocitos T, ya sean CD4+ o CD8+. Una vez activado, el linfocito T se comunica químicamente con la célula huésped por medio de co-estimulación y/o citocinas y le envía instrucciones para que fusione sus lisosomas (sacos de enzimas destructivas) con las vesículas que contienen los antígenos exógenos para de este modo destruirlos (50).

Los linfocitos B (CD19+) también expresan moléculas del HLA clase II . Al ser activados se encargan principalmente de la síntesis de anticuerpos específicos. Cada tipo de linfocito B tiene en su superficie anticuerpos que reconoce sólo un antígeno exógeno o un reducido número de ellos. Cuando encuentra alguno, es capaz de absorberlo, degradarlo, reciclarlo y unirlo a moléculas HLA de clase II para ser presentado en la superficie celular. A continuación los linfocitos T de

ayuda identifican estos complejos en la superficie de los linfocitos B y los activan para que proliferen, se diferencien y liberen grandes cantidades del anticuerpo contra el antígeno exógeno (51).

### 2.3.4 Moléculas HLA de clase III .

A diferencia de las moléculas clase I y II, las de clase III son proteínas que se encuentran en la sangre, no en la superficie celular. Los genes de clase III codifican proteínas que están principalmente involucradas en la inmunidad natural, como los genes que codifican para los componentes iniciales de la cascada del complemento (C4, el C2 y el factor B), así como los genes del factor de necrosis tumoral alfa y la linfoxina. Además existen otros genes como los de las proteínas de choque térmico, la 21-hidroxilasa y la sintetasa valil-tRNA entre otros (49) (Figura 4).



**Figura 4.-** Localización de los genes del complejo principal de Histocompatibilidad clase III

## **2.4 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ).**

El TNF- $\alpha$ , es una citocina proinflamatoria secretada por macrófagos, monocitos, neutrófilos y células asesinas naturales en respuesta a un estímulo. Algunas de sus principales funciones son la citólisis, la citostasis, la inducción de fagocitosis y citotoxicidad. Posee propiedades quimiotácticas sobre neutrófilos, promueve la angiogénesis y contribuye a aumentar la proliferación de linfocitos T.

El TNF- $\alpha$  es sintetizado como una proteína transmembranal no glicosilada de aproximadamente 25 kD. La orientación del TNF de membrana es la siguiente: el extremo amino terminal es intracelular, el segmento transmembranal se encuentra próximo al extremo amino terminal y el segmento carboxi-terminal es extracelular. El TNF de membrana se ensambla como un homotrímero. Es escindido proteolíticamente de la membrana plasmática con lo que resulta la forma soluble del TNF, la cual circula como un homotrímero estable de 51 kD.

Las acciones del TNF se ponen en marcha tras la unión de la citocina a los receptores específicos para esta, expresados en la superficie celular. Se han descrito dos receptores distintos para el TNF que son el TNF-RI (p55) y TNF-RII (p75). Estos receptores se componen de 4 regiones extracelulares ricas en cisteína (CRDs) (52).

### **2.4.1 POLIMORFISMOS DEL TNF- $\alpha$ .**

Los genes del TNF- $\alpha$  se encuentran en la región central del HLA entre el locus HLA-B y HLA-D, aproximadamente a 150 kilobases en posición centromérica al locus del HLA-B y a 850 kilobases en posición telomérica al HLA-DR. Se ha

observado que muchas de las diferencias en la producción del TNF- $\alpha$  se encuentran ligadas a diferentes alelos del HLA clase II, así como a otros marcadores polimórficos que se encuentran en esta región.

El TNF determina la fuerza, efectividad y la duración de la respuesta inmune local e inflamatoria, e interviene en la recuperación de una infección o un agente tóxico (53).

La existencia de diferentes genotipos de TNF- $\alpha$  sugiere -al menos en los modelos murinos-, que la expresión diferencial del TNF- $\alpha$  de diferentes alelos puede afectar la naturaleza de la respuesta inmune (54).

El TNF- $\alpha$  tiene una potente acción biológica, por lo que su producción se encuentra altamente regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional. Una secuencia dentro de la región 5' del DNA controla la tasa de transcripción.

Se han descrito 9 polimorfismos diferentes presentes en el promotor del TNF- $\alpha$  (Tabla 2). Uno de los más estudiados y que además ha mostrado tener un efecto en los niveles de transcripción de la citocina es el -308. Este polimorfismo se define como la sustitución de una guanina (TNF1) por una adenosina (TNF2). El alelo más frecuente en la población general es el TNF1. El alelo TNF2 se ha asociado con el haplotipo HLA-A1-B8-DR3-DQ2. Por otra parte, se ha postulado que la presencia del alelo TNF2 promueve una mayor producción de TNF- $\alpha$ .

Wilson y colaboradores demostraron que el polimorfismo en la posición -308 tiene un efecto significativo sobre la actividad transcripcional de un gen reportero (55).

Se ha descrito por la asociación de los haplotipos específicos del HLA con los diferentes genotipos de TNF- $\alpha$  que los alelos DR3 y DR4 están asociados con



niveles altos de TNF- $\alpha$ , mientras que el DR2 se ha asociado con una baja producción de esta citocina. Esto sugiere que los polimorfismos funcionales deben existir dentro de ciertas regiones que regulan la expresión del gen del TNF- $\alpha$ . (56). Estudios recientes muestran dos tipos diferentes de RNA mensajero (RNAm) para el TNF- $\alpha$ , lo que sugiere que cada uno inicia su transcripción en un sitio diferente o bien, que estas dos especies de RNAm son el producto de “empalme” (*splicing*) alternativo de un transcrito primario del TNF, lo que además deja abierta la posibilidad de la existencia de diferentes productos proteicos. Por último, una región 3' no traducida y conservada en genes de diferentes citocinas juega un papel muy importante en la inestabilidad de los mensajeros. (57).

Los polimorfismos del promotor del TNF- $\alpha$  se han relacionado con diferentes enfermedades, e.g., el lupus eritematoso generalizado (58,59), esquizofrenia (60), lepra (61), miastenia gravis (62), hepatitis C (63), hepatitis B (64), bronquitis crónica (65), psoriasis (66).

Además, el alelo TNF2 se ha asociado con una velocidad de transcripción dos veces mayor que la del alelo TNF1 en modelos experimentales en los que se han utilizado “genes reporteros”. También se ha observado que el polimorfismo TNF2 está asociado con alteraciones en la expresión del gen del TNF- $\alpha$  y con el haplotipo extendido HLA-A1, B8, DR3 en individuos caucásicos (55).

Tabla 2.- Polimorfismos del promotor del Factor de Necrosis Tumoral.

Posición del polimorfismo	Sustitución
+ 70	G / A
- 163	G / A
- 238	G / A
- 308	G / A
- 376	G / A
- 574	G / A
- 856	C / T
- 862	C / A
- 1031	T / C

### **3. ANTECEDENTES.**

En México no existen estudios que nos permitan saber si la población mestiza mexicana tiene genes que les permitan ser longevos. Existen muchos estudios principalmente en poblaciones caucásicas y asiáticas en las cuales se ha demostrado que algunos genes involucrados en la regulación de la respuesta inmune como los localizados dentro del MHC se encuentran asociados con la longevidad. Tal es el caso del haplotipo ancestral HLA-A1,B8,Cw7,DR3 en poblaciones de ancianos centenarios caucásicos.

Los mestizos mexicanos se consideran una mezcla génica, resultado de la conquista española, su composición es diferente a cualquier otra población. Los estudios realizados en mestizos mexicanos muestran que tienen una composición genética que comprende un 56% de genes amerindios, 46% de genes caucásicos y 4 % de genes afro-americanos. Dadas las condiciones de nuestro país y la composición de nuestra población, la participación del MHC en el envejecimiento no puede compararse con la de las poblaciones estudiadas en otros países. A la fecha, no existen estudios que hayan evaluado la asociación de los genes del MHC con la longevidad en la población mestiza mexicana sana mayor de 80 años (67-69).

Existen trabajos que han reportado un incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias en centenarios caucásicos sanos, en los mestizos mexicanos no se han reportado los niveles de estas citocinas durante el proceso de envejecimiento, así como la frecuencia del polimorfismo del promotor del TNF- $\alpha$  en el sitio -308.

#### **4. HIPÓTESIS.**

En México no existen estudios genéticos que determinen que los mestizos mexicanos sean o no proclives a la longevidad. En éste estudio se propone como hipótesis que la longevidad en mestizos mexicanos se relaciona con alelos del HLA clase I (HLA-B), clase II (HLA-DRB1, HLA-DQB1) o bien, con el polimorfismo del promotor -308 del TNF- $\alpha$ .

## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1 Objetivo general.**

Determinar la posible asociación entre genes clase I y clase II del MHC así como del polimorfismo del promotor del TNF- $\alpha$  en la posición -308 con el envejecimiento exitoso en Mestizos Mexicanos.

### **5.2 Objetivos particulares.**

- 1) Investigar si el polimorfismo del promotor del TNF- $\alpha$  (-308) está presente en ancianos sanos mestizos mexicanos.
- 2) Investigar los genotipos del HLA clase II (DRB1, DQB1) y clase I (B) en ancianos mestizos mexicanos.
- 3) Establecer la relación del polimorfismo del TNF- $\alpha$  (-308) con los haplotipos de las moléculas clase II (DRB1, DQB1) y clase I (B) del MHC, como factores que favorecen el envejecimiento exitoso.
- 4) Investigar la relación del polimorfismo del TNF- $\alpha$  (-308) presente en los ancianos longevos con la concentración de proteína presente en el suero.
- 5) Determinar los niveles séricos del TNF- $\alpha$  en la población de estudio.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS.**

Todos los métodos se encuentran descritos en el anexo 3

**6.1 Sujetos:** Se estudiaron 72 ancianos sanos mestizos mexicanos mayores de 80 años de edad. Como controles, se estudiaron 99 individuos jóvenes sanos mestizos mexicanos no relacionados consanguíneamente con el grupo de estudio (52 mujeres, 47 hombres la edad promedio fue la misma en ambos grupos). De los 72 ancianos 38 (53.5 %) fueron mujeres y 34 (46.5 %) fueron hombres.

La población mestiza mexicana comprende a aquellos individuos nacidos en México y descendientes de padres y abuelos mexicanos. A todos los individuos se les realizó historia clínica así como exploración física para excluir alguna enfermedad, además a los ancianos se les realizaron análisis de laboratorio como biometría hemática, examen general de orina y química sanguínea. A todos los ancianos se les realizó una serie de cuestionarios para evaluar su actividad física, su dependencia social y estado mental (Anexo 1).

El protocolo fue aprobado por el comité institucional de investigación biomédica en humanos y se obtuvo consentimiento escrito de todos los participantes de acuerdo al formato mostrado en el anexo 2.

**6.2 Material Biológico:** Se obtuvo una muestra de sangre periférica de 15 mL. Tres mL se utilizaron para la extracción del DNA genómico, el resto se utilizó para la posterior determinación de los niveles de TNF mediante ELISA y las pruebas de

laboratorio (biometría hemática, química sanguínea, niveles de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM) y colesterol.

**6.3 Extracción de DNA:** El DNA genómico fue extraído de acuerdo con el procedimiento descrito por Davis (Wizard Genomic DNA purification kit, PROMEGA Madison USA) (70).

**6.4 Cuantificación del DNA y determinación de pureza:** El DNA en su forma hidratada fue cuantificado por espectrofotometría. Se leyó una dilución de DNA:H<sub>2</sub>O 1:50 a 260 nm (DNA) y a 280 nm (proteína) en una cubeta de cuarzo.

**6.5 Tipificación del HLA:** La tipificación genérica del HLA-DRB1, HLA-DQB1 y del HLA-B se realizó utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos para cada secuencia y su posterior hibridación con sondas específicas utilizando el equipo comercial Dynal RELI PCR-SSO HLA. (Hoffman-La Roche LTD.  $\alpha$  Roche Molecular system, Inc., Alameda CA, USA)(71).

**6.6 Polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$ :** Este polimorfismo se evaluó mediante el sistema conocido como ARMS (Amplification refractory mutation system) y PCR, en la cual se amplificó un segmento del gen de TNF- $\alpha$ , que incluyó el sitio -308 (72).

**6.7 Cuantificación de los niveles séricos de TNF- $\alpha$ :** La determinación de los niveles circulantes de TNF- $\alpha$  se realizó mediante un ensayo comercial de ELISA (Medgenis Diagnostics SA, Fleurus, Bélgica).

**6.8 Análisis estadístico:** Las frecuencias alélicas se compararon usando una tabla de contingencia de 2 x 2. Posteriormente, se realizó un análisis de  $\chi^2$  con corrección de Yate's para determinar la diferencia estadística entre grupos. La razón de momios se calculó para aquellos ancianos que mostraron una diferencia significativa entre alelos específicos. La comparación de las frecuencias alélicas entre los grupos se determinó con el paquete estadístico EPIINFO (Versión 5.0; USD Inc., Stone Mountain, GA). La diferencia se consideró significativa con un valor de  $p < 0.05$ .

Para aquellas muestras que fueron significativas se realizó además la corrección de Bonferroni, que consiste en multiplicar el valor de la p por el número de alelos obtenidos (73).



## **7. RESULTADOS.**

Los resultados de las pruebas de laboratorio mostraron valores dentro de los límites normales (EGO, BH, QS) a excepción de un individuo que presentó anemia (10 g/L), 3 individuos con hipergamaglobulinemia, uno de ellos presentó leucopenia (4000 cel/mm<sup>3</sup>), el resto se encontró normal.

El análisis de la frecuencia observada y la esperada para los locus HLA-B, HLA-DRB1 y el HLA-DQB1, así como para el polimorfismo -308 del TNF, no mostraron diferencias significativas y fueron consistentes con lo predicho por el equilibrio Hardy-Weinberg. Es importante mencionar que las frecuencias obtenidas en la población de controles jóvenes en este estudio son similares a aquellas reportadas en estudios previos realizados en población de mestizos mexicanos (58, 67-69).

### **Análisis del locus HLA-B.**

La tipificación genérica del locus HLA-B mostró la presencia en el grupo de ancianos de 27 antígenos diferentes pertenecientes a éste locus, en la tabla 3 se muestran los resultados de las frecuencias génicas correspondientes al grupo control y al grupo de ancianos. Los alelos más frecuentes en el grupo de ancianos fueron HLA-B\*35 (20 %), HLA-B\*15 (10.5 %) y HLA-B\*40 (9.7 %), en tanto que en el grupo control se encontraron los alelos HLA-B\*35 (26.7 %), HLA-B\*39 (10.6 %) y HLA-B\*40 (7.5 %). Es importante recalcar que aun cuando el antígeno HLA-B\*14 no se encuentra estadísticamente disminuido en el grupo de los ancianos sanos

con respecto al grupo control, si se observa una diferencia importante entre las frecuencias alélicas de ambos grupos siendo en el grupo de ancianos de 0.028 (4 individuos) y en el grupo control 0.062 (12 individuos). Otros alelos que también mostraron una diferencia importante entre ambos grupos pero no alcanzaron la significancia estadística fueron los alelos HLA-B\*15, HLA-B\*40, HLA-B\*37, HLA-B\*38, HLA-B\*57 y HLA-B\*45.

### **Análisis del locus HLA-DRB1.**

Una vez que se realizó el análisis del locus HLA-DRB1, se encontró que los alelos más frecuentes en ambos grupos fueron el HLA-DRB1\*4 y el HLA-DRB1\*8, encontrándose con un porcentaje del 30 % para el HLA-DRB1\*4 y del 16 % para el HLA-DRB1\*8 en el grupo de ancianos, así como, del 24 % y 16 % en el grupo de controles respectivamente. El análisis estadístico no mostró diferencias entre ninguno de los alelos de este locus entre ambos grupos. (Tabla 4).

Posteriormente, se realizó el análisis de las frecuencias génicas comparando los grupos por edad y sexo. El análisis entre el grupo de ancianos contra las ancianas, mostró una disminución en la frecuencia del HLA-DRB1\*11 en el grupo de hombres, de hecho ninguno de los individuos pertenecientes a este grupo presentó dicho alelo. El análisis estadístico mostró  $\chi^2 = 9.50$ ,  $p = 0.0021$ , a este resultado se le aplicó la corrección de Bonferroni, cuando la  $p$  se corrigió mediante esta prueba se obtuvo  $p = 0.023$  con un IC 95% de 0.06 - 0.53. La fracción etiológica fue de  $-0.233$  y la fracción preventiva de 0.0830. Con una  $p = 0.009$  al analizarse con la prueba de Fisher (Tabla 5).

El análisis comparativo de los grupos de mujeres ancianas contra mujeres jóvenes no mostró ninguna diferencia significativa. (Tabla 6)

Cuando los grupos de hombres se compararon entre sí (ancianos vs jóvenes) se observó una diferencia significativa para el alelo HLA-DRB1\*11 entre ambos grupos. El análisis estadístico mostró una  $\chi^2 = 6.56$ , con una  $p = 0.01$ , cuando se realizó la corrección de Bonferroni se obtiene una  $p = 0.12$  con un IC 95 % de 0.03 - 0.64. Con la prueba exacta de Fisher se obtuvo una  $p = 0.0072$ . La fracción etiológica es de  $-0.4351$  y la fracción preventiva de  $0.3032$  (tabla 7).

La presencia del alelo HLA-DRB1\*11 en mujeres longevas se ha reportado en otras poblaciones, lo que indica que la contribución de este alelo a la longevidad dicho genero es independiente de la etnicidad. Además, éste alelo se ha encontrado en mayor frecuencia en pacientes Mestizos mexicanos con miastenia gravis y timoma (74). En otras poblaciones el alelo se ha asociado con enfermedades autoinmunes o bien, con un efecto protector contra infecciones virales. Todo esto indica que éste alelo puede tener efectos opuestos a través de la vida. La teoría evolucionista del envejecimiento, propone que un gen (o alelo) puede tener papeles pleiotrópicos o antagónicos durante diferentes etapas de la vida (75), por ejemplo, en caucásicos el haplotipo ancestral A1 B8 Cw7 confiere susceptibilidad a autoinmunidad en mujeres jóvenes, en tanto que en hombres se ha asociado a longevidad (76).

### **Análisis del locus HLA-DQB1.**

El análisis del locus HLA-DQB1 mostró que los alelos más frecuentes fueron HLA-DQB1\*3 (41 %) y HLA-DQB1\*4 (17 %) en ambos grupos. El análisis del locus HLA-DQB1 no mostró ninguna diferencia significativa cuando se comparó el grupo de ancianos con el grupo de individuos jóvenes, ni cuando se comparó por sexos (Tabla 8 - 11). El alelo más frecuente en ambos grupos fue el HLA-DQB1\*3 (40 % en los ancianos y 41 % en los jóvenes).

### **Análisis del polimorfismo del promotor del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .**

El análisis del polimorfismo del promotor del TNF- $\alpha$  en la posición -308 mostró un incremento significativo de la frecuencia del alelo TNF2 en la población de ancianos ( $p = 0.02$ , OR = 0.33, 95 % IC = 0.14 - 0.73 (Tabla 12).

Interesantemente, la tabla 13 muestra los alelos HLA-B y HLA DR de aquellos individuos que presentan el polimorfismo TNF2, en la que se observa una heterogeneidad en el grupo de ancianos con genotipo TNF2, pero aun así podemos observar una tendencia del alelo TNF2 que se correlaciona con la presencia de los alelos HLA-DRB1\*4 y HLA-DRB1\*3. El polimorfismo -308A del TNF- $\alpha$  afecta la producción de esta citocina entre individuos, además de que estos polimorfismos se han asociado con algunos alelos del HLA como el HLA-DRB1\*2, los individuos portadores de este alelo son considerados como bajo

productores de TNF- $\alpha$ , mientras que aquellos que contienen los alelos HLA-DRB1\*3 ó HLA-DRB1\*4 se han correlacionado con la producción de niveles elevados de la citocina (55, 77-80).

Los niveles séricos del TNF- $\alpha$  resultaron ser mayores en el grupo de ancianos comparado con el de los jóvenes con un promedio de  $14.92 \pm 3.4$  pg/mL en tanto que fue de  $11.28 \pm 1.19$  pg/mL en el grupo control y en aquellos ancianos que presentaban el alelo TNF2 los niveles séricos fueron de  $15.30 \pm 6.88$  pg/mL, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos.

El análisis por haplotipos no mostró diferencia entre el grupo de ancianos y el grupo control. En ambos grupos el haplotipo más común fue el HLA-B35, DR4, DQ3, el cual ha sido clasificado como un haplotipo autóctono mexicano. En la tabla 14 se muestran los haplotipos más frecuentes encontrados en el grupo de ancianos.

A continuación se muestran todas las tablas de los resultados.

Tabla 3.- Frecuencias alélicas del HLA-B en ancianos longevos sanos y controles sanos.

HLA-B	Ancianos n = 142	Frecuencias alélicas	Controles n = 198	Frecuencias alélicas
B*7	6	0.042	5	0.026
B*8	3	0.211	5	0.026
B*13	1	0.005	1	0.007
B*14	4	0.028	12	0.062
B*15	15	0.105	10	0.052
B*18	6	0.042	13	0.067
B*27	1	0.007	2	0.010
B*35	29	0.204	53	0.276
B*37	3	0.021	2	0.010
B*38	3	0.021	5	0.026
B*39	12	0.084	21	0.109
B*40	14	0.098	15	0.078
B*41	2	0.014	4	0.020
B*42	0	0	1	0.005
B*44	11	0.077	11	0.072
B*45	2	0.014	1	0.005
B*48	4	0.028	5	0.026
B*49	4	0.028	9	0.046
B*50	2	0.014	2	0.010
B*51	9	0.063	10	0.052
B*52	2	0.014	3	0.015
B*55	2	0.014	0	0
B*56	2	0.014	0	0
B*57	2	0.014	1	0.005
B*58	2	0.014	0	0
B*78	1	0.007	1	0.005

Tabla 4.- Frecuencias alélicas del HLA-DRB1 en ancianos longevos sanos y controles sanos.

HLA-DRB1	Ancianos N = 142	Frecuencia alélica	Controles n = 198	Frecuencia alélica
DR*1	7	0.049	10	0.050
DR*2	14	0.098	18	0.090
DR*3	11	0.077	11	0.055
DR*4	43	0.302	48	0.240
DR*7	13	0.091	22	0.110
DR*8	23	0.169	33	0.111
DR*9	0	0	3	0.015
DR*10	3	0.021	1	0.005
DR*11	8	0.056	20	0.100
DR*12	3	0.021	3	0.015
DR*13	10	0.070	10	0.050
DR*14	7	0.049	21	0.105

Tabla 5.- Frecuencias alélicas del HLA-DRB1 en el grupo de ancianos separados por genero.

HLA-DRB1	Ancianos n = 66	Frecuencia alélica	Ancianas n = 76	Frecuencia Alélica
DRB1*1	4	0.060	4	0.052
DRB1*2	5	0.075	9	0.118
DRB1*3	3	0.045	7	0.092
DRB1*4	27	0.409	16	0.210
DRB1*7	7	0.106	6	0.078
DRB1*8	11	0.166	12	0.157
DRB1*9	0	0	0	0
DRB1*10	2	0.030	1	0.013
<b>DRB1*11</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>0.092</b>
DRB1*12	0	0	3	0.039
DRB1*13	4	0.060	5	0.065
DRB1*14	3	0.045	6	0.078



Tabla 6.- Frecuencias alélicas del HLA-DRB1 del grupo de ancianas mujeres y del grupo de controles mujeres.

HLA-DRB1	Ancianas n = 76	Frecuencia Alélica	Controles mujeres n = 104	Frecuencia Alélica
DRB1*1	4	0.052	7	0.066
DRB1*2	9	0.118	12	0.113
DRB1*3	7	0.092	7	0.066
DRB1*4	16	0.210	24	0.226
DRB1*7	6	0.078	11	0.103
DRB1*8	12	0.157	21	0.198
DRB1*9	0	0	2	0.018
DRB1*10	1	0.013	1	0.009
DRB1*11	8	0.092	9	0.084
DRB1*12	3	0.039	1	0.009
DRB1*13	5	0.065	3	0.028
DRB1*14	6	0.078	8	0.075

Tabla 7.- Frecuencias alélicas del HLA-DRB1 del grupo de hombres ancianos y del grupo de hombres jóvenes.

HLA-DRB1	Ancianos n = 66	Frecuencia alélica	Controles n = 94	Frecuencia Alélica
DRB1*1	4	0.060	3	0.031
DRB1*2	5	0.075	6	0.063
DRB1*3	3	0.045	4	0.042
DRB1*4	27	0.409	24	0.250
DRB1*7	7	0.106	11	0.117
DRB1*8	11	0.166	12	0.125
DRB1*9	0	0	1	0.010
DRB1*10	2	0.030	0	0
<b>DRB1*11</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>0.117</b>
DRB1*12	0	0	0	0.021
DRB1*13	4	0.060	7	0.074
DRB1*14	3	0.045	13	0.013

Tabla 8.- Frecuencias alélicas del HLA-DQB1 del grupo de ancianos y del grupo de jóvenes.

HLA-DQB1	Ancianos n = 142	Frecuencia alélica	Controles n = 198	Frecuencia alélica
HLA-DQB1*2	20	0.140	33	0.166
HLA-DQB1*3	58	0.408	83	0.419
HLA-DQB1*4	24	0.169	33	0.166
HLA-DQB1*5	22	0.154	27	0.136
HLA-DQB1*6	18	0.126	22	0.111

Tabla 9.- Frecuencias alélicas del HLA-DQB1 del grupo de ancianos y del grupo de ancianas.

HLA-DQB1	Ancianos n = 66	Frecuencia alélica	Ancianas n = 76	Frecuencia alélica
HLA-DQB1*2	9	0.136	11	0.144
HLA-DQB1*3	27	0.409	31	0.407
HLA-DQB1*4	9	0.136	15	0.197
HLA-DQB1*5	12	0.181	10	0.131
HLA-DQB1*6	9	0.136	9	0.118

Tabla 10.- Frecuencias alélicas del HLA-DQB1 del grupo de ancianas y del grupo de mujeres jóvenes.

HLA-DQB1	Ancianas n = 76	Frecuencia alélica	Controles mujeres n = 104	Frecuencia alélica
HLA-DQB1*2	11	0.144	18	0.173
HLA-DQB1*3	31	0.407	38	0.365
HLA-DQB1*4	15	0.197	21	0.201
HLA-DQB1*5	10	0.131	17	0.163
HLA-DQB1*6	9	0.118	10	0.096

Tabla 11.- Frecuencias alélicas del HLA-DQB1 del grupo de ancianos y del grupo de jóvenes.

HLA-DQB1	Ancianos n = 66	Frecuencia alélica	Controles Hombres n = 94	Frecuencia alélica
HLA-DQB1*2	9	0.136	15	0.159
HLA-DQB1*3	27	0.409	45	0.478
HLA-DQB1*4	9	0.136	12	0.127
HLA-DQB1*5	12	0.181	10	0.106
HLA-DQB1*6	9	0.136	12	0.127

Tabla 12.- Frecuencias alélicas del TNF- $\alpha$  comparando el grupo de ancianos con el grupo de controles sanos.

	Ancianos (n=72)		Controles (n=55)		Estadística		
	Alelos (n =144)	fg	Alelos (n =110)	fg	P	OR	CI 95%
TNF1	131	0.909	107	0.972	>0.05	-	-
TNF2	13	0.090	3	0.027	0.021	0.33	0.14 - 0.73

Tabla 13.- Correlación del alelo TNF2 con los alelos del locus HLA-DRB1 y HLA-B en los ancianos sanos.

	HLA-B	HLA-DR	TNF
1	15	4	TNF2
	58	13	TNF1
2	40	4	TNF2
	07	4	TNF1
3	40	4	TNF2
	44	13	TNF1
4	35	4	TNF2
	35	11	TNF1
5	08	3	TNF2
	35	4	TNF1
6	08	3	TNF2
	35	14	TNF1
7	08	3	TNF2
	07	8	TNF1
8	52	2	TNF2
	15	14	TNF1
9	35	2	TNF2
	50	7	TNF1
10	18	2	TNF2
	14	11	TNF1
11	40	13	TNF2
	35	8	TNF1
12	44	13	TNF2
	38	7	TNF2

Tabla 14.- Frecuencia de los haplotipos presentes en los ancianos sanos.

Haplotipo	Frecuencia
B35 DR4 DQ3	0.0774
B15 DR4 DQ3	0.0663
B39 DR4 DQ3	0.0422
B40 DR8 DQ4	0.0352

## 8. CONCLUSIONES

- 1) No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los alelos HLA-DRB1, HLA-DQB1 y HLA-B entre el grupo de ancianos y el grupo control.
- 2) Cuando se compararon las frecuencias alélicas por sexos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los loci HLA-B y HLA-DQB1, mientras que en el locus HLA-DRB1 se encontró que el alelo HLA-DR11 es un factor de riesgo en hombres.
- 3) Se comparó la presencia del alelo HLA-DR11 en el grupo de hombres ancianos contra el de las mujeres ancianas y se encontró una diferencia estadísticamente significativa.
- 4) El análisis del polimorfismo del promotor del TNF- $\alpha$  -308 mostró una diferencia estadísticamente significativa en la presencia de una A en este sitio entre el grupo de ancianos contra el grupo control.
- 5) La concentración en plasma del TNF- $\alpha$  es mayor en los ancianos que en los controles pero la diferencia no es estadísticamente significativa.
- 6) El análisis por haplotipos no mostró diferencia entre el grupo de ancianos y el grupo control, siendo el haplotipo más común en ambos grupos el haplotipo autóctono HLA-B35 DR4 DQ3.



## 9. DISCUSIÓN

Los cambios que sufre el sistema inmune asociados al envejecimiento se definen como inmunosenescencia, caracterizado por una disminución en la respuesta inmune celular y humoral. Debido a la complejidad del sistema inmune es difícil definir las causas que determinan el deterioro de su actividad.

El progreso en las condiciones sanitarias y de salud pública de los países desarrollados así como aquellos países en desarrollo, ha permitido que la expectativa de vida al nacer se vaya incrementando. Aunado a esto, se ha incrementado la presencia de enfermedades que no eran comunes en años anteriores, e.g., enfermedades neurodegenerativas, cáncer; al mismo tiempo, se ha observado la presencia de un grupo de ancianos sanos, que, por sus condiciones físicas y mentales, se les ha agrupado en lo que ahora se conoce como envejecimiento exitoso. El envejecimiento exitoso es debido a múltiples factores sociales, ambientales, genéticos e inmunológicos por lo que la caracterización de este grupo de individuos es muy importante para poder determinar qué es lo que los hace llegar a envejecer exitosamente.

En los países desarrollados los estudios sobre longevidad se han llevado a cabo en centenarios, en los países en desarrollo este grupo de ancianos es muy reducido o prácticamente inexistente, por lo que se utilizan grupo de ancianos sanos que han rebasado la expectativa de vida de sus países.

Además de las condiciones de sanidad de las poblaciones, se debe tener en cuenta que existen otros factores que pueden influir en la historia de los diferentes

grupos étnicos y que han permitido la selección natural de ciertos genes, así como el establecimiento de haplotipos ancestrales que se han relacionado ya con la longevidad como por ejemplo el haplotipo A1 B8 Cw7 DR3 en los caucásicos. En contraste, el grupo étnico conocido como mestizo mexicano, desde el punto de vista de la evolución, tiene poco más de 500 años. Las enfermedades infecciosas importadas por los conquistadores, influyeron sin lugar a duda la selección en el repertorio genético de nuestra región. Las condiciones culturales y socio-económicas de nuestra zona geográfica (México y centro América) han contribuido a incrementar la expectativa de vida en los últimos 50 años, aún así esta expectativa de vida se encuentra lejana de aquella presente en los países desarrollados. Es importante mencionar que la edad media de nuestro grupo de estudio fue al menos 10 años mayor que la expectativa de vida actual en México, por lo que representan los individuos más ancianos que han tenido un envejecimiento exitoso en nuestra población.

Los resultados de este estudio muestran que si hay una asociación del alelo HLA-DRB1\*11 con el envejecimiento, y aparentemente la presencia de este alelo en hombres es un factor de riesgo durante el proceso de envejecimiento. Aunado a esto, existen reportes previos que relacionan este alelo (HLA-DRB1\*11) con el envejecimiento de mujeres (80).

Ciertamente, una gran cantidad de genes y factores participan en el envejecimiento exitoso, sin embargo, los polimorfismos de un solo nucleótido localizados en los promotores de las citocinas, han demostrado afectar la unión de

los factores de transcripción y de esta manera la expresión de las citocinas. Debido a los papeles tan importantes que juega el TNF- $\alpha$  en el sistema inmune, el estudio del polimorfismo en el sitio -308, involucrado con la tasa de transcripción y ligado al MHC nos parecía relevante. Al encontrar que el genotipo TNF2 se encontraba con una frecuencia mayor en el grupo de ancianos sanos y que, además, estos polimorfismos se han correlacionado con un incremento en el índice de transcripción de la citocina (81-84), nos hace pensar que la presencia de estos polimorfismos sea un mecanismo compensatorio de la respuesta inmune. Además se ha propuesto que los individuos que son heterocigotos para este polimorfismo poseen una respuesta inflamatoria óptima que los protege contra la neurodegeneración relacionada con la edad (85). Si bien la inflamación se ha relacionado con enfermedades crónicas, incapacidad y muerte, es muy interesante que en los ancianos sanos este fenotipo proinflamatorio pueda estar involucrado con un remodelamiento compensatorio de la red de citocinas, la cual contribuye al envejecimiento exitoso (86). Aunque también debemos mencionar que algunos autores no encuentran esta

## ANEXO 1.

Nombre \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_

Sexo: M F

Se excluirán aquellos pacientes que presenten alteraciones en cualquiera de las pruebas de Lawton, Katz, Minimental, actividad física, o bien alteración en el estado nutricional.

Indice tabáquico # de cigarrillos	0	1-9	10-19	20 ó más
Número de medicamentos	0-1	2-3	>3	
Comorbilidad	0	1-2	3 ó más	

Velocidad de Marcha	Normal	Anormal
Indice Katz	1	2-8
Indice Lawton	Normal	Anormal

### VELOCIDAD DE MARCHA:

Se debe pedir al individuo que camina 5 metros.

Se considera anormal cuando:

Hombre 173 cm o menos en 8 seg. o más.

Mujeres 159 cm o menos en 8 seg. o más.

### INDICE KATZ

Este índice nos permite medir independencia en las actividades de la vida diaria, se basa en la evaluación de la dependencia funcional o dependencia de otro para bañarse, vestirse, usar el inodoro, trasladarse, mantener la continencia y alimentarse.

Al Individuo se le realiza la siguiente serie de preguntas:

1.- Baño, definir esponja, regadera o tina

Independiente: sólo necesita ayuda para lavar una sola región de su cuerpo (como la espalda o una extremidad) o se baña solo por completo.

Dependiente: Necesita ayuda para lavar más de una parte del cuerpo, así como para entrar o salir de la tina, o bien, no se baña solo.

2.- Vestido

Independiente: saca su propia ropa del armario y cajones; se pone la ropa, prendas exteriores y tirantes; maneja broches (se excluye el atado de las agujetas de los zapatos).

Dependiente: no se viste a sí mismo.

3.- Uso del inodoro

Independiente: acude al inodoro, se sienta y se levanta de él; se arregla la ropa, se limpia los órganos de excreción.

Dependiente: usa cómodo o recibe ayuda para ir y usar el inodoro.

4.- Traslado

Independiente: Se acuesta y levanta de la cama de manera independiente y se sienta o levanta por sí solo de una silla.

Dependiente: Asistencia para acostarse o levantarse de la cama o para sentarse o levantarse de una silla.

5.- Continencia

Independiente: Autocontrol completo de la micción y defecación.

Dependiente: Incontinencia parcial o completa (urinaria o fecal), control parcial o total por enemas, catéteres o uso regulado de cómodos u orinales.

## 6.- Alimentación

Independiente: Obtiene el alimento de un plato o su equivalente y se lo lleva a la boca (se excluye de la evaluación el corte previo de la carne y la preparación de los alimentos, como untar mantequilla a un pan).

Dependiente: necesita ayuda para alimentarse, no come en absoluto o tiene alimentación parenteral.

## CALIFICACIÓN

- 1) Independencia en alimentación, continencia, traslado, ir al baño, bañarse, vestirse.
- 2) Independencia en todas las funciones menos una.
- 3) Independencia en todo menos en bañarse y otra función adicional.
- 4) Independencia en todo menos bañarse, vestirse y otra función adicional.
- 5) Dependencia en el baño, vestirse y otra función adicional.
- 6) Dependencia en el baño, vestirse, ir al baño, traslado y otra función adicional.
- 7) Dependiente en las 6 funciones.
- 8) Dependencia en 2 funciones pero que no se clasifican en 3 a 6.

Interpretación: se considerará al individuo como independiente solo cuando cumpla con el apartado 1, en los demás casos 2 a 8 se considera como dependiente.

## ÍNDICE LAWTON

Escala de actividades instrumentales.

### A.- Capacidad para usar el teléfono

- |   |   |
|---|---|
| 1.- Lo opera por iniciativa propia, marca sin problemas | 1 |
| 2.- Marca solo unos cuantos números bien conocidos      | 1 |
| 3.- Contesta el teléfono pero no llama                  | 1 |
| 4.- No usa el teléfono                                  | 0 |

### B.- Compras

- |   |   |
|---|---|
| 1.- Vigila sus necesidades independientes         | 1 |
| 2.- Hace independientemente sólo pequeñas compras | 0 |
| 3.- Necesita compañía para cualquier compra       | 0 |
| 4.- Incapaz de cualquier compra                   | 0 |

### C.- Cocina

- |  |   |
|--|---|
| 1.- Planea, prepara y sirve los alimentos correctamente        | 1 |
| 2.- Prepara los alimentos, sólo si se le provee lo necesario   | 0 |
| 3.- Calienta, sirve y prepara pero no lleva una dieta adecuada | 0 |
| 4.- Necesita que le preparen los alimentos                     | 0 |

### D.- Cuidado del hogar

- |   |   |
|---|---|
| 1.- Mantiene la casa solo o con ayuda mínima          | 1 |
| 2.- Efectúa diariamente trabajo ligero eficientemente | 1 |
| 3.- Efectúa diariamente trabajo ligero sin eficacia   | 1 |
| 4.- Necesita ayuda en todas las actividades           | 1 |
| 5.- No participa                                      | 0 |

#### E.- Lavandería

- |  |   |
|--|---|
| 1.- Se ocupa de sus ropas independientemente | 1 |
| 2.- Lava solo pequeñas cosas                 | 1 |
| 3.- Todo se lo tienen que lavar              | 0 |

#### F.- Transporte

- |  |   |
|--|---|
| 1.- Se transporta solo   | 1 |
| 2.- Se transporta solo, únicamente en taxi pero no puede usar otros recursos | 1 |
| 3.- Viaja en transporte colectivo acompañado                                 | 1 |
| 4.- Viaja en taxi o en auto acompañado                                       | 0 |
| 5.- No sale  | 0 |

#### G.- Medicación

- |  |   |
|--|---|
| 1.- Es capaz de tomarla a su hora y dosis correctas          | 1 |
| 2.- Se hace responsable solo si se le prepara por adelantado | 0 |
| 3.- Es incapaz de hacerlo                                    | 0 |

#### H.- Finanzas

- |   |   |
|---|---|
| 1.- Maneja sus asuntos independientemente                 | 1 |
| 2.- Sólo puede manejar lo necesario para pequeñas compras | 0 |
| 3.- Es incapaz de manejar dinero                          | 0 |

#### Interpretación.

Se deben sumar los puntos de todas las respuestas y para considerar a un individuo como capaz de actividades instrumentales, se espera que el puntaje obtenido en mujeres sea mayor a 8 y en hombres mayor a 5.



## ÍNDICE DE ACTIVIDAD FÍSICA

Se preguntan dos frases específicas

- a) Siento que todo lo que hago es un esfuerzo
- b) Siento que no puedo seguir adelante

Para cada frase se debe preguntar ¿Que tan seguido se ha sentido usted de esta forma en la última semana?

- Muy raramente o ninguna vez = 0 (< 1 día)
- Alguna vez o un poco = 1 (1-2 días)
- Una cantidad moderada del tiempo = 2 (3-4 días)
- La mayor parte del tiempo = 3 (> 4 días)

La calificación anormal se otorga cuando se tiene una calificación de 2 ó 3 en cualquiera de las preguntas.

Frase a	Normal	Anormal
Frase b	Normal	Anormal

## MINIMENTAL (FOLSTEIN)

Escolaridad 6 ó más años                      Normal 24-30/Leve 18-23/Severa 10 ó menos

Escolaridad < 6 años                            Normal 22-30/Leve 16-21/Severa 15 ó menos

## ESTADO NUTRICIONAL

El estado nutricional se considera anormal cuando:

- Pérdida no intencional de peso mayor o igual a 5 Kg en un año.
- Pérdida no intencional de peso mayor o igual al 5 % en seguimiento a un año.

## ANEXO 2

### **FORMA DE AUTORIZACIÓN DEL PACIENTE INFLUENCIA DE LOS ALELOS HLA CLASE I, CLASE II Y EL POLIMORFISMO DEL PROMOTOR DEL TNF- $\alpha$ EN LA LONGEVIDAD DE MESTIZOS MEXICANOS**

He sido informado(a) por el investigador abajo firmante sobre el tipo, finalidad y curso del estudio diseñado para determinar los polimorfismos del TNF- $\alpha$  y el Complejo Principal de Histocompatibilidad en mi sangre. Se me ha explicado cuál es la importancia de llevar a cabo dicho estudio.

Acepto participar en forma voluntaria en este estudio y donar 15 mL de mi sangre, la cual será tomada sólo con material nuevo, estéril y desechable. Asimismo, proporcionaré los datos que se me soliciten acerca de mi estado de salud y medicamentos que actualmente he tomado.

Estoy de acuerdo en que los resultados obtenidos de mi sangre puedan ser examinados por los investigadores del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, quienes mantendrán la información en forma confidencial. Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria, y no existe presión alguna para que yo acceda a firmar este documento. Cualquier duda que surja, en cualquier momento sobre el estudio la podré aclarar personalmente con los investigadores responsables: Dr. Luis Llorente y M. en C. Elena Soto del Departamento de Inmunología y Reumatología, a quienes podré localizar en los siguientes teléfonos: 54-87-09-00 ext 2600 y 2601.

Nombre y firma del Paciente\_\_\_\_\_

Nombre y firma del investigador\_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo\_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo\_\_\_\_\_

## **ANEXO 3**

### **MÉTODOS**

#### **Extracción de DNA**

Al tubo con 3 mL de sangre se le agregaron 9 mL de solución de lisis celular, se incubó durante 10 min, posteriormente se centrifugó a 2 000 x g durante 10 min. El sobrenadante se descartó, el botón se colocó en el vórtex para resuspenderlo.

Se adicionaron 3 mL de solución de lisis nuclear, se mezcló por inversión y posteriormente se adicionó 1 mL de la solución de precipitación de proteínas, la mezcla se colocó en el vórtex durante 20 seg. Al terminar de mezclar la muestra se centrifugó a 2 000 x g durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

El siguiente paso fue la precipitación y rehidratación del DNA. Para esto se agregaron 3 mL de isopropanol al sobrenadante obtenido en el paso anterior. Se mezcló perfectamente, en este paso debe observarse la aparición en el tubo de una hebra de DNA. El tubo con el DNA se centrifugó y el sobrenadante fue descartado. Se adicionaron 3 mL de etanol al 70 % para lavar. Las muestras se centrifugaron a 2000 X g durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y posteriormente se rehidrató el DNA con 250 µl de solución de rehidratación. El DNA se almacenó a – 70 °C hasta su empleo.

## **Cuantificación del DNA y determinación de pureza**

Se leyó una dilución de DNA:H<sub>2</sub>O 1:50 a 260 nm (DNA) y a 280 nm (proteína) en una cubeta de cuarzo. Se realizó la lectura a ambas longitudes de onda en un espectrofotómetro de luz UV.

La concentración final estuvo dada por la D.O. de la muestra a 260 nm multiplicada por el factor de dilución (50) multiplicada por 50 (50µg de DNA dan una lectura de 1 D.O. a 260 nm). Para determinar la pureza del DNA se obtuvo el cociente de la lectura a 260 nm/lectura a 280 nm. Este debió ser mayor o igual a 1.8 para considerar a la muestra suficientemente libre de proteínas.

Una vez que se cuantificó el DNA de las muestras, se ajustaron a una concentración final de 100 ng/µl.

## **Tipificación del HLA**

Esta técnica consiste en la amplificación de una secuencia, en este caso se amplificaron los exones polimórficos de los genes HLA-DRB1, HLA-DQB1 Y HLA-B con oligonucleótidos marcados con biotina. Posteriormente, el producto amplificado, se desnaturalizó por alcalinidad y se realizó el proceso de hibridación con las sondas específicas para cada secuencia que se encuentran inmóviles en una membrana de nitrocelulosa. Finalmente, se llevó a cabo el proceso de revelado colorimétrico con la adición de un complejo de estreptavidina-peroxidasa y posteriormente peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina para generar una reacción enzimática con la biotina.

La amplificación mediante la PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95° C	15 seg	35
60° C	45 seg	
72° C	15 seg	
70° C	5 min	1
4° C	∞	1

La mezcla que se preparó para la amplificación fue en las siguientes proporciones:

10.0 µl master MIX (dNTP's + oligos + solución amortiguadora)

5.0 µl MgCl<sub>2</sub>

8.0 µl H<sub>2</sub>O

0.125 µl *Taq* DNA polimerasa (5 U/µl)

100.0 ng DNA

Para obtener un volumen final de 25.0 µl

2 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación.

Una vez obtenido el producto amplificado se llevó a cabo el proceso de hibridación, en un horno de hibridación precalentado a 50° C.

Se agregaron 25µL de solución desnaturalizante (especial para el equipo empleado), al tubo que contiene el producto amplificado, se mezcló bien y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.

Se colocó una membrana de nitrocelulosa del equipo comercial, específica para HLA-DRB, HLA-DQB o HLA-B en el contenedor para la reacción y se agregaron 2 mL de solución de hibridación precalentado a 50° C.

Posteriormente, se agregó el producto amplificado ya desnaturalizado. La cámara de hibridación se colocó en el horno de hibridación a 50°C en movimiento durante 30 min.

Se descartó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de solución de lavado a temperatura ambiente, se agitó durante 1 minuto y se eliminó la solución de lavado.

Se añadieron 2 mL de solución de lavado precalentado a 50°C seguido de una incubación de 15 min en el horno de hibridación a 50° C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se agregó 1.1 mL de una mezcla preparada de la siguiente manera:

1.1 mL de solución de lavado + 3.3 µL del complejo estreptavidina-peroxidasa, por cada una de las muestras.

Se incubó en agitación durante 15 min a temperatura ambiente en movimiento. Se descartó esta solución y se realizaron 2 lavados en agitación durante 5 min. Posteriormente, se incubó con 1 mL de una solución de citratos durante 5 min en agitación y, finalmente el revelado se realizó con el sustrato incluido en el equipo comercial que se prepara mezclando 933 µl de la solución A y 233 µl de la solución de tetrametilbencidina, esto se incubó durante 10 min en movimiento, protegiendo la placa de la luz con papel aluminio.

Para la interpretación de cada una de las membranas de nitrocelulosa se utilizó un programa de cómputo llamado Dynal Pattern Matching Program (Hoffman-La Roche LTD. α Roche Molecular system, Inc., Alameda CA, USA). Se debe indicar

en el programa cada una de las bandas positivas en la membrana de nitrocelulosa y el programa realiza la interpretación automática.

### **Polimorfismo –308 del TNF- $\alpha$**

Se utilizaron los iniciadores 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' y 3'-AAA CAG ACC ACA GAC CTG GTC-5'. En esta metodología el oligonucleótido contiene un nucleótido substituido intencionalmente (subrayado) para generar el sitio de restricción para la enzima *NcoI*. En caso de que el gen contuviera la sustitución de A por G en la posición –308 (alelo TNF2) probaría un error (mismatch) en el alineamiento del oligonucleótido y por lo tanto no se generaría el sitio de corte de la enzima. Si el gen contiene el nucleótido G en la posición –308 (gen silvestre), la enzima de restricción produciría dos fragmentos, uno de 20 pares de bases (pb) y otro de 87 pb (59).

La mezcla de reacción para la amplificación por PCR fue la siguiente:

(dATP, dGTP, dCTP, dTTP) [1.25 $\mu$ M]	4.0 $\mu$ l
Solución PCR 10X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1.5 $\mu$ l
Oligonucleótido 5' [10 $\mu$ M]	2.5 $\mu$ l
Oligonucleótido 3' [10 $\mu$ M]	2.5 $\mu$ l
Agua dd	10.5 $\mu$ l
<i>Taq</i> DNA polimerasa [5 U/ $\mu$ l]	0.125 $\mu$ l
DNA genómico [100 ng/ $\mu$ l]	2.0 $\mu$ l
Volumen final	25 $\mu$ l

Las condiciones de la amplificación en el termociclador fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94° C	5 min	1
94° C 60° C 72° C	40 seg 40 seg 40 seg	35
70° C	10 min	1
4° C	∞	1

Una vez obtenido el producto amplificado, se utilizaron 10µl para electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se empleo un marcador de peso molecular de DNA (ϕ174 RF DNA Hae III Gibco BRL) que contenía fragmentos que van desde los 72 pb hasta los 1353 pb. El tamaño del producto amplificado para la identificación del polimorfismo –308 fue de 120 pb. El producto amplificado fue digerido durante 12 horas a 37°C en baño María con 10 unidades de la enzima *NcoI* a 37° C. La digestión se llevó a cabo de la siguiente manera:

1 unidad de *NcoI* (Gibco BRL, Life Technologies) + 2.0 µl de solución amortiguadora para la enzima + 0.5 µl de H<sub>2</sub>O + 15 µl del producto amplificado.

Los fragmentos de la digestión se analizarón por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (Agarosa 1000, Gibco, Life-Technologies), y se tiño con bromuro de etidio.

### **Cuantificación de los niveles séricos de TNF-α**

Se reconstituyó el frasco de los estandares con el diluyente indicado proveído por el equipo. Se hizo la curva estandar, la cual se utilizó para la calibración de las concentraciones del TNF-α.



En cada pozo de la placa de ELISA se colocaron 50  $\mu\text{L}$  del diluyente ELISA, se agregaron 100.0  $\mu\text{L}$  de muestra en cada pozo, se mezclaron durante 5 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. El sobrenadante se aspiró y se lavó 5 veces con el amortiguador de lavado.

Posteriormente se agregaron 100.0  $\mu\text{L}$  de la solución detectora a cada pozo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante y se lavó 7 veces con el buffer de lavado. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  a cada pozo del reactivo TMB y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución de paro a cada pozo.

Se incubó durante 30 min y se leyó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 450 nm . Los datos obtenidos se extrapolaron en la gráfica que se realizó de los estándares para conocer las concentraciones finales de TNF- $\alpha$  en el suero.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Weinert BT, Timiras, PS. Invited Review: Theories of aging. *J Appl Physiol.* 2003; 95:1706-1716.
2. Pawelec G, Adibzadeh M, Pohla H, et al. Immunosenescence: ageing of the immune system. *Immunol Today.* 1995; 16:420-422.
3. Ginaldi L, Martinis M, D'Ostilo A, et al. The immune system in the elderly: III. Innate immunity. *Immunol Res.* 1999; 20:117-126.
4. Eun SY, Vogel LA. T cell-dependent immune responses: Impact of aging on B lymphocytes and antigen-presenting cells. *Mod Asp Immunobiol.* 2002; 2:232-235.
5. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004; 5:133-139.
6. Lewis VM, Twomey JJ, Bealmear P, et al. Age, thymic involution, and circulating thymic hormone activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978; 47:145-0.
7. Hodes RJ. Aging and the immune system. *Immunol Rev.* 1997; 160:5-8.
8. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, et al. T cells and aging, *Front Biosci.* 2002; 1:7:D1056-1183.
9. Campisi J. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture?. *Exp Gerontol.* 2001; 36:607-618.
10. Haynes L, Eaton SM, Swain SL. The defects in effector generation associated with aging can be reversed by addition of IL-2 but not other related gamma (c) receptor binding cytokines. *Vaccine.* 2000;18:1649-1653.

11. Engwerda CR, Handwerker BS, Fox BS. Aged T cells are hyporesponsive to co-stimulation mediated by CD28. *J Immunol.* 1994; 52:3740-3747.
12. Tortorella C, Pisconti A, Piazzolla G, et al. APC-dependent impairment of T cell proliferation in aging: role of CD28- and IL-12/IL-15 mediated signaling. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123:1389-1402.
13. Miller RA, Garcia GC, Kirk CJ, et al. Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunol Rev.* 1997; 160:79-90.
14. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol.* 2001; 8:131-136.
15. Fillit H. Clinical immunology of aging. *Rev Clin Gerontol.* 1994; 4:187-197.
16. Stephan RP, Sanders YM, Witte, PL. Stage specific alterations in murine B-lymphopoiesis with age. *Int Immunol.* 1996; 8:509-518.
17. Richaud-Patin Y, Cabiedes J, Jakez-Ocampo J, et al. High prevalence of protein-dependent and protein-independent antiphospholipid and other autoantibodies in healthy elders. *Thrombosis Res.* 2000; 99:129-133.
18. Banerjee M, Mehr R, Belevsky A, et al. Age and tissue specific differences in human germinal center B cell selection revealed by analysis of Ig<sub>VH</sub> gene hypermutation and lineage trees. *Eur J Immunol.* 2002; 32:1947-1957.
19. Stacy S, Krolick KA, Infante AJ, et al. Immunological memory and late onset autoimmunity. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123:975-985.
20. Hayakawa K, Hardy RR. Normal, autoimmune, and malignant CD5+ B cells: the Ly-1 B lineage? *Ann Rev Immunol.* 1988; 6:197-218.

21. Yung RL. Changes in immune function with age. *Rheum Dis Clin North Am.* 2000; 26:1-14.
22. Cooper EL, Zhang Z, Raftos DA, et al. When did communication in the immune system begin? *Int J Immunopathol Pharmacol.* 1994; 7:203-217.
23. Malaguarnera L, Ferlito L, Imbes RM, et al. Immunosenescence: a review. *Arch Gerontol Geriat.* 2001; 32:1-14.
24. Lord JM, Butcher S, Killampali V, et al. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122:1521-1535.
25. Mollinedo F, Borregaard N, Boxer LA. Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunol Today.* 1999; 20:535-537.
26. Solana R, Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine.* 2000; 25:1613-1620.
27. Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, et al. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood.* 1993; 80:2767-2773.
28. Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, et al. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol.* 2002; 169:4697-4701.
29. Mariani L, Turchetti G, Franceschi C. Chronic antigenic stress, immunosenescence and human survivorship over the 3 last centuries: heuristic value of a mathematical model. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124:453-8.
30. Franceschi C, Monti D, Sansoni P, et al. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today.* 1995; 16:12-16.

31. Franceschi C, Bonafe M. Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:457-461.
32. Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, et al. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol.* 2000; 35:879-896.
33. Gorer PA. The detection of a hereditary antigenic difference in the blood of mice by means of human group A serum. *J Genet.* 1936; 32:17-31.
34. Dausset J. Iso- leucoantibodies. *Acta Haematol.* 1958; 20:156-166.
35. Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature.* 2003; 425:805-811.
36. Gu X, Wang Y, Gu J. Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small-scale duplications in vertebrate evolution. *Nature Genet.* 2002; 31:205-209.
37. Marziuff WF, Gongidi P, Woods KR, et al. The human and mouse replication dependent histone genes. *Genomics.* 2002; 80:487-498
38. Zhang EY, Knipp GT, Ekins S, et al. Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates. *Drug Metab Rev.* 2002; 34:709-750.
39. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol.* 2000; 76:1-60.
40. Hopper AK, Phzicky EM. tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev.* 2003; 17:1-60.

41. Rhodes DA, Stammers M, Malcherek G, et al. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. *Genomics*.2001; 71:351-362.
42. Giorgi D, Friedman C, Trask BJ, et al. Characterization of nonfunctional V1R-like pheromone receptor sequences in human. *Genome Res.* 2000; 10:1979-1985.
43. Volz A, Ehlers A, Younger R, et al. Complex transcription and splicing of odorant receptor genes. *J Biol Chem.* 2003; 278:19691-19701.
44. Coleman JE. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins. *Annu Rev Biochem.* 1992; 61:4-42.
45. Gruss HJ, Dower SK. The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol Ther.* 1995; 1:75-105.
46. Mallya M, Campbell RD, Aguado B. Transcriptional analysis of a novel cluster of LY-6 family members in the human and mouse major histocompatibility complex: five genes with many splice forms. *Genomics.* 2002; 80:113-123.
47. Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics.* 1990; 32:242-251.
48. Hauptmann G, Bahram S. Genetics of the central MHC. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16; 668-672.
49. Paulsson KM. Evolutionary and functional perspectives of the major histocompatibility complex class I antigen-processing machinery. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61; 2446-2460.

50. Bottomly K. Subsets of CD4 T cells and B cell activation. *Semin Immunol.* 1989; 1:21-31.
51. Clark MR, Massenbarg D, Siemasko K, et al. B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16:382-387.
52. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, et al. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science.* 2000; 235:1-4.
53. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immunity.* 1999; 1:3-19.
54. Muller KM, Lisby S, Arrighi JF, et al. H-2D haplotype-linked expression and involvement of TNF- $\alpha$  in Th2 cell-mediated tissue inflammation. *J Immunol.* 1994; 153:316-324.
55. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:3195-3199.
56. Jongeneel CV, Acha-Orbea H, Blankestijn T. A polymorphic microsatellite in the tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter identifies an allele unique to the NZW mouse strain. *J Exp Med.* 1990; 171:2141-2146.
57. Descoteaux A, Matlashewski G. Regulation of tumor necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990; 145:846-853.

58. Zuñiga J, Vargas-Alarcon G, Hernández-Pacheco G, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Genes and Immunity*. 2001; 2:363-366.
59. Rudwaleit M, Tikly M, Khamashta M, et al. Interethnic differences in the association of tumor necrosis factor promoter polymorphism with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1996; 23:1725-1728.
60. Boin F, Zanardini R, Pioli R, et al. Association between –G 308 A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2001; 6:79-82.
61. Sarno EN, Santos AR, Jardim MR, et al. Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF alpha. *Lepr Rev*. 2000; 71:154-160.
62. Hjelmstrom P, Peacock CS, Giscombe R, et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 1998; 1:137-143.
63. Hohler T, Kruger A, Gerken G, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position –238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J Med Virol*. 1998; 54:173.177.
64. Hohler T, Kruger A, Gerken G, et al. A Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol*. 1998; 111:579-582.
65. Huang SL, Su CH, Chang SC, Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Resp Crit Care Med*. 2001; 156:1436-1439.



66. Arias AI, Giles B, Eiermann TH. Et al. Tumor necrosis factor-alpha polymorphism in psoriasis. *Exp Clin Immunogenet.* 1997; 14:118-122.
67. Lisker R, Perez-Briceño R, Granado J, et al. Gene frequencies and admixture estimates in Mexican city population. *Am J Physical Anthropol.* 1986; 71:203-207.
68. Lisker R, Perez-Briceño R, Granado J, et al. Gene frequencies and admixture estimates in the state of Puebla, México. *Am J Physical Anthropol.* 1988; 76:331-335.
69. Lisker R, Ramirez E, Briceño RP, et al. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centers. *Human Biology.* 1990; 62:791-801.
70. Davis RW, Thomas M, Cameron J, et al., Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol.* 1980; 65:404-411.
71. Bignon JD, Fernandez-Viña MA. Protocols of the 12<sup>th</sup> International histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In: Charon D (ed): *Genetic Diversity of HLA, Functional and Medical Implications, Volume I.* Paris: EDK, 1997.
72. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl Acids Res.* 1989; 17:2503-2517.
73. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in diploid population. *Mol Biol Evol.* 1995; 12:921-7.

74. García-Ramos G, Tellez-Zenteno JF, Zapata-Zúñiga M, et al. HLA class II genotypes in Mexican Mestizo patients with myasthenia gravis. *Eur J Neurol.* 2003; 10:707-710.
75. Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, et al. Biomarkers of immunosenescence within evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol.* 1999;34:911-921.
76. Franceschi C, Bonafé M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspectiva on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 908:244-254.
77. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. *Hum Immunol* 2001; 62:1191-1199.
78. Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, et al. Heritable major histocompatibility complex class II associated differences in production of tumor necrosis factor- $\alpha$ : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:1233-1237.
79. Bouma G, Crusius JBA, Poo MO, et al. Secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  and lymphotoxin  $\alpha$  in the relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996; 43:456-463.
80. Ivanova R, Hénon N, Lepage V, Charron D, Vicaut E, Schater F. HLA-DR alleles display sex-dependent effects on survival and discriminate between individual and familial longevity. *Hum Mol Genet*;1998:187-194.
81. Lio D, Scola L, Crivello A, et al. Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 -1082 promoter SNP

- and its interaction with TNF- $\alpha$  -308 promoter SNP. *J Med Genet.* 2003; 40:296-299.
82. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol.* 1997; 34:391-9.
  83. Abraham LJ, French NAH, Dawkins RL. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Clin Exp Immunol.* 1993;92:14-18.
  84. Fargion S, Valenti L, Dongiovanni P, et al. TNF  $\alpha$  promoter polymorphisms. *Methods Mol Med.* 2004; 98:47-58.
  85. McCusker SM, Curran MD, Dynan KB, et al. Association between polymorphism in regulatory region of gene encoding tumor necrosis factor  $\alpha$  and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia: a case-control study. *Lancet.* 2001; 357:436-439.
  86. Franceschi C, Ottaviani E. Stress, inflammation and natural immunity in the aging process: a new theory. *Aging (Milano).* 1997; 9:30-31.
  87. Ross OA, Curran MD, Rea IM, et al. HLA haplotypes and TNF polymorphism do not associated with longevity in the Irish. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124: 563-567.
  88. Wang XY, Hurme M, Jylha M, et al. Lack of association between human longevity and polymorphisms of IL-1 cluster, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  genes in Finnish nonagenarians. *Mech Ageing Dev.* 2001; 123:29-38.

# **ARTICULOS PUBLICADOS**

Research

Open Access

## Human leukocyte antigen class I, class II, and tumor necrosis factor- $\alpha$ polymorphisms in a healthy elder Mexican Mestizo population

Elena Soto-Vega, Yvonne Richaud-Patin and Luis Llorente\*

Address: Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Mexico City, Mexico

Email: Elena Soto-Vega - elenasoto\_74@yahoo.com; Yvonne Richaud-Patin - yrichaud@yahoo.com.mx; Luis Llorente\* - llyrp@quetzal.innsz.mx

\* Corresponding author

Published: 03 November 2005

Received: 16 August 2005

*Immunity & Ageing* 2005, 2:13 doi:10.1186/1742-4933-2-13

Accepted: 03 November 2005

This article is available from: <http://www.immunityageing.com/content/2/1/13>

© 2005 Soto-Vega et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** There is strong evidence that an individual's genetic background is an important predisposing factor to longevity. In the present study we analysed the frequency of HLA class I, class II, as well as the TNF- $\alpha$  -308 polymorphism that may be related to an increased life span in Mexican Mestizo healthy elders.

**Results:** HLA typing was performed by polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotide (PCR SSO) reverse dot blot. The TNF- $\alpha$  -308 polymorphism was assessed by PCR restriction fragment length polymorphism. A significant increased frequency of HLA-DRB1\*11 was found in elderly women whereas this allele was not present in elderly males. The TNF2 allele was also increased in the elder group when compared to young controls. The frequencies of the remaining alleles tested were not statistically different among groups.

**Conclusion:** These data suggest an ethnicity independent tendency of HLA-DRB1\*11 in elder females to increase life span and a possible role of the TNF2 allele with the successful remodelling of senescent immune system.

### Background

Ageing is associated with a complex remodelling of the immune system often in the direction of apparently decreased immune competence. However, it has been proposed that longevity is related to optimal function of the immune system because some genetic determinants for successful ageing might reside in those polymorphisms of genes that regulate immune responses e.g. major histocompatibility complex (MHC) [1,2]. The studies of life span in humans have resulted in different, and even controversial, associations of HLA class I, class II and

class III genes with old age. Thus, longevity has been shown to be related with the selection of HLA alleles or haplotypes being the more frequently associated the A1 B8 Cw7 DR3 in Caucasians [3,4], the increased or decreased frequency of HLA-B40 [5-7], the augmented frequency of HLA-DR11 in elder women in Caucasian as well as in Japanese populations [8,9] among other alleles. Immunogenetic studies in aged, healthy Mexican Mestizo population have not been yet performed.

Mexican Mestizo individuals have a proportion of 56% Native American Indian genes, 40% Caucasian genes, and 4% African genes [10]. Mestizo population represents a complex mixture of European and American native inhabitants, and constitute the core of the Mexican population. This complex genetic process began in the 16<sup>th</sup> century and has been expanded during the course of time and continues to be a dynamic process, e.g., African population inhabited the Americas almost 200 years later. On the other hand, aged people in the Mexican population have increased from a life expectancy of 63 years in the 1970's up to 70 years nowadays.

Healthy elderly people show a pro-inflammatory phenotype with increased levels of cytokines such as TNF- $\alpha$  [11]. The TNF- $\alpha$  gene is located within the HLA class III region. This cytokine is involved in tissue remodelling, epithelial cell barrier permeability, macrophage activation, recruitment of inflammatory infiltrate, and up-regulation of adhesion molecules, among other functions. TNF- $\alpha$  also determines the strength, effectiveness and duration of local and systemic inflammatory responses [12].

TNF- $\alpha$  promoter contains numerous polymorphic sites, which are possible targets for transcription factors. The polymorphism at position -308 is defined by de substitution of a G by an A, where the presence of G defines the common allele TNF1 and A defines the TNF2 variant, which is less frequent [13]. Some studies have shown that individuals bearing the TNF2 polymorphism are higher TNF- $\alpha$  producers than those who bear the TNF1 variant [14].

The aim of this study was to evaluate the class I, class II HLA genotypes as well as the TNF- $\alpha$  -308 polymorphism with successful ageing in Mexican Mestizo.

## Results and Discussion

Of the 71 elders, 38 (53.5%) were females and 33 (46.5%) males. Results of the observed and expected antigen and genotype frequencies for HLA-B, -DRB1 and -DQB1 loci were consistent with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium. It is worth mentioning that the frequencies identified in our population are similar from those reported in previous studies performed in Mexican Mestizo populations [10].

Gene frequencies at the HLA-DRB1 locus were not statistically significant different among groups. The most frequent allele in both, young subjects and elders, was the HLA-DRB1\*04. The high resolution typing revealed that the more frequent alleles in the elderly group were HLA-DRB1\*0802, DRB1\*0701, DRB1\*0404 and DRB1\*0407, whereas HLA-DRB1\*0802, DRB1\*0701, DRB1\*1101 and

DRB1\*0404 were the more frequent in the young group, being these alleles not statistically significant.

When the differences between aged males and females were analysed, a decreased frequency of HLA-DRB1\*11 in males was found when compared to females, for no one in the former group was HLA-DRB1\*11 ( $p = 0.002$ ; OR = 0.18; CI 95% = 0.06–0.53;  $p = 0.024$  by Bonferroni's correction). On the other hand, when elderly males were compared to young males for HLA-DRB1\*11, a diminished frequency was found although not statistically significant when Bonferroni's correction was applied. The high resolution typing showed a decreased frequency of the HLA-DRB1\*1101 allele in elderly females when compared to the other HLA-DRB1\*11 alleles from young women and, again, this difference was not significant by Bonferroni's correction.

Our data must be balanced against the small number of subjects studied. However, we found that, interestingly, no old man was HLA-DRB1\*11, which may suggest that survival being gender-dependent [15,16]. This finding for Mexican Mestizo women is in agreement with previous reports in different populations, which might indicate that the contribution of this allele to an increase in the life span is independent of ethnicity [8].

Concerning the HLA-B and HLA-DQB1 alleles, no differences were observed among elders and young controls nor when compared by gender. The high resolution typing of HLA-DQB1 showed that in the elderly group the most frequent subtypes were HLA-DQB1\*0302, DQB1\*0402 and DQB1\*0501 whereas in the young group were the HLA-DQB1\*0302, DQB1\*0301, DQB1\*0402 and DQB1\*0201. Finally, the generic typing of the HLA-B locus showed that the more frequent alleles in both groups were HLA-B\*35 and HLA-B\*15. A decreased tendency in the HLA-B\*14 frequency in the elder group was also observed when compared to that of the control group, although this was not statistically significant.

The analysis of the TNF- $\alpha$  -308 promoter polymorphism showed a diminished frequency of the TNF1 allele accompanied by an increased one in the TNF2 allele in elders. The heterozygote genotype TNF1/2 was more common in the elderly group (9.02%) than in the control group (1.5%) (Table 1). Serum levels of TNF- $\alpha$  showed a slight increase in the elderly group although this difference was not statistically significant (data not shown). Interestingly, it was found that 58% of the TNF2 individuals were HLA-DR3 and HLA-DR4. The -308A TNF- $\alpha$  polymorphism has been shown to vary between individuals. These variants have been associated with certain HLA-DR alleles, e.g., HLA-DR2 subjects are considered low TNF- $\alpha$  produc-

**Table 1: TNF- $\alpha$  -308 polymorphism in elderly and young adults.**

	Healthy elders (n = 72) gf (n = 144)	Young controls (n = 198) gf (n = 110)	P	Statistics OR	CI 95%
<b>TNFI</b>	0.909	0.985	NS	-	-
<b>TNF2</b>	0.090	0.015	0.001	0.33	0.14–0.73

gf = gene frequency; OR = Odds ratio; CI = Confidence interval; NS: non significant.

ers while those bearing HLA-DR3 and HLA-DR4 alleles produce high levels of this cytokine [13,14,17-19]

The TNF2 genotype has been related to an increased cytokine transcription rate [20]. Furthermore, it has been proposed that individuals who are heterozygous for this polymorphism possess an optimal inflammatory response that protects them against age-related neurodegeneration [21]. Although the inflammatory process has been related to chronic illnesses, incapacity, and death, it is interesting that in healthy old people this pro-inflammatory phenotype may be involved in the remodeling of the cytokine network which contributes to the successful ageing process [22]. Notwithstanding, lack of such association has also been reported [23,24].

## Conclusion

Longevity studies must ideally include healthy centenarians, as they represent the extreme of human old age. Most studies carried out on centenarians come from either Europe or Asiatic countries such as Japan. It is precisely in these regions that the largest numbers of centenarians can be found. This is closely related on the one hand, with the social, cultural, and economic conditions of developed countries and, on the other, with biological factors including the long history of their ethnic groups, which has permitted a natural selection of genes favouring longevity [25]. By contrast, the ethnic group known as Mexican Mestizo is, in evolutionary terms, a recent one barely 500 years old. This lapse is certainly not enough to establish an allele selection or, even, modify completely the structure of previous haplotypes by the genetic admixture process that could account to change certain HLA clusters of Mexican natives. On the other hand, infectious diseases imported by conquerors indeed, have influenced the selection of HLA repertoire in our region. The cultural and socio-economic conditions of our geographical zone (Mexico and Central America) have contributed to a marked increase in life expectancy, particularly over the last 50 years, even though this is still far removed from that of developed countries. It is worth mentioning that the mean age of our study group is at least 10 years greater than the current life expectancy for Mexico and, hence, they represent the oldest population that have enjoyed successful ageing within our country.

Certainly, a great diversity of genes and factors influence successful ageing. Single nucleotide polymorphisms located in cytokine gene promoters have been demonstrated to affect the binding of transcription factors and, hence, its gene expression. Genetic variants that determine an increased production of anti-inflammatory cytokines or a decreased one of pro-inflammatory cytokines have been associated with successful ageing, suggesting a role in the control of the inflammatory state in the attainment of increased life span [12,26,27].

Moreover, the study of polymorphic genes on the X chromosome do not have to be procrastinated for there are some – albeit relatively old – evidence that they are critical in the genetic regulation of the immune response and thus could be of utmost importance for conditioning the life span expectancy [28-30].

## Methods

### Subjects

A total of 71 healthy elders were studied, age ranged from 80 to 96 years (mean 86.2 years). The control samples were obtained from 99 young (from 21 – 54 years; mean 35.2 years) healthy individuals unrelated to elders. All subjects were Mexican Mestizo which is defined as an individual who was born in Mexico and is descendent from mixed racial ancestry of the native Americans of such region with individuals from Europe (mainly Spain) or Africa, all of them living in Mexico City. A complete social and medical history and physical examination was performed. Laboratory tests included complete blood cell count, erythrocyte sedimentation rate (Westergreen), immunoglobulin levels (IgG, IgA, IgM), serum electrolytes, glucose, creatinine, urea, alkaline phosphatase, aspartate transaminase, total bilirubin, and total cholesterol. All subjects were informed about the objectives and methods of the study. Work has been done according to current law.

### DNA isolation

Genomic DNA was extracted from 5 mL of peripheral whole blood employing the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI) according to manufacturer's instructions. Isolated DNA was quantified by

spectrophotometry and adjusted to a concentration of 100 ng/ $\mu$ L, and stored at -70°C until use.

### HLA Typing

Generic HLA-DRB1, DQB1, and HLA-B typing was performed by polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) reverse dot blot using the Dynal RELI SSO system (Hoffman-La Roche Ltd. and Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA) as described previously [31]. High resolution typing of HLA-DRB1 and DQB1 loci was done by sequence based typing method (SBT). The primers' sequences and PCR conditions for amplification of polymorphic exons were obtained from protocols of the 13<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop (Seattle, 2002).

### TNF- $\alpha$ <sup>308</sup> polymorphism

Genotyping for the TNF- $\alpha$  -308 polymorphism was performed using a PCR fragment amplified using the forward primer 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' and the reverse primer 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3' to create a restriction site for the NcoI endonuclease (Fermentas, Hanover, MD) according to previous reports [32]. Digestion products were analysed by photo typing in 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. Only 55 healthy young subjects were analysed for this polymorphism.

### TNF- $\alpha$ serum levels

Serum from each subject was obtained from 5 mL whole blood and stored at -70°C until tested. An ELISA kit was used for the measurement of TNF- $\alpha$  levels according to manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### Statistics

Allele frequencies were evaluated by gene count and 2  $\times$  2 contingency tables. Statistical differences of allele frequencies between elders and controls were done employing chi square test and Yate's correction. Obtained P values were subjected to Bonferroni's correction. Odds ratio was calculated for healthy elders' carriers of specific alleles. Data were tested for the goodness of fit between the observed and expected genotype values and their fit to Hardy-Weinberg equilibrium.

### List of Abbreviations

HLA Human Leukocyte Antigen

TNF Tumor Necrosis Factor

PCR Polymerase Chain Reaction

PCR SSO Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide

### Acknowledgements

E. Soto-Vega was supported by a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico. This work was part of the PhD degree thesis of E. Soto-Vega, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Authors thank Dr. G. Vargas-Alarcón for kindly providing the genotypic data from healthy young controls and the Department of Geriatrics from our Institute for the elders' clinical evaluation.

### References

- Caruso C, Candore G, Colonna Romano G, Lio D, Bonafé M, Valensin S, Franceschi C: Immunogenetics of longevity complex polymorphism relevant to the control of human longevity? A review of literature data. *Mech Ageing and Dev* 2001, **122**:445-462.
- Candore G, Lio D, Colonna Romano G, Caruso C: **Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions.** *Autoimmunity Rev* 2002, **1**:29-35.
- Proust J, Moulins R, Fumeron F, Bekkhoucha F, Busson M, Schimid M, Hors J: **HLA and longevity.** *Tissue Antigens* 1982, **19**:168-173.
- Rea I, Middleton D: **Is the phenotypic combination A1B8Cw7DR3 a marker for male longevity?** *J Am Geriatr Soc* 1994, **42**:978-923.
- Bender BS, Nagel JE, Adler WH, Andres R: **Absolute peripheral blood lymphocyte count and subsequent mortality of elderly men. The Baltimore longitudinal study of aging.** *J Am Geriatr Soc* 1986, **34**:649-654.
- Hansen HE, Sparck JV, Larsen SO: **An examination of HLA frequencies in three age groups.** *Tissue Antigens* 1977, **10**:49-55.
- Lagaay AM, D'Amato J, Ligthart GJ, Schreuder GM, van Rood JJ, Hijmans W: **Longevity and heredity in humans. Association with human leukocyte antigen phenotype.** *Ann NY Acad Sci* 1991, **621**:78-89.
- Ivanova R, Hénon N, Lepage V, Charron D, Vicaut E, Schächter F: **HLA-DR alleles display sex-dependent effects on survival and discriminate between individual and familial longevity.** *Hum Mol Genetics* 1998, **2**:187-194.
- Takata H, Suzuki M, Ishii T, Sekiguchi S, Iri H: **Influence of major histocompatibility complex region genes on human longevity among Okinawan-Japanese centenarians and nonagenarians.** *Lancet* 1987, **2**:824-826.
- Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V, de Rubens J, Armendares S, Buentello L: **Gene frequencies and admixture estimates in Mexico City population.** *Am J Phys Anthropol* 1986, **71**:203-207.
- Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A: **The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians.** *Immunol Today* 1995, **16**:12-16.
- Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso : **Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases.** *Genes Immunity* 1999, **1**:3-19.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW: **Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter on transcriptional activation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:3195-3199.
- Hajeer AH, Hutchinson IV: **Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease.** *Hum Immunol* 2001, **62**:1191-1199.
- Franceschi C, Motta L, Valensin S, Rapisarda R, Franzone A, Berardelli M, Motta M, Monti D, Bonafé M, Ferruci L, Deiana L, Pes GM, Carru C, Desole MS, Barbi C, Sartoni G, Gemelli C, Iesca F, Oliviere F, Marchegiani F, Cardelli M, Cavallone L, Guerresi P, Cossarizza A, Trojano L, Pini G, Sansoni P, Passeri G, Lisa R, Spazzafumo L, Amadio L, Iunta S, Stecconi R, Morresi R, Viticchi C, Mattace R, De Benedictis G, Baggio G: **Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? Italian Multicenter Study on Centenarians (IMUSCE).** *Ageing (Milano)* 2000, **12**:77-84.
- Caruso C, Candore G, Colonna Romano G, Lio D, Bonafé M, Valensin S, Franceschi C: **HLA, aging, and longevity: A critical reappraisal.** *Hum Immunol* 2000, **61**:942-949.
- Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, Mc Devitt HO: **Heritable major histocompatibility complex class II associ-**



- ated differences in production of tumor necrosis factor- $\alpha$ : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**:1233-1237.
18. Bouma G, Crusius JBA, Poo MO, Kolkman JJ, von Bloomborg BME, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GMT, Meuwissen SGM, Peña AS: **Secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  and lymphotoxin  $\alpha$  in the relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease.** *Scand J Immunol* 1996, **43**:456-463.
  19. Abraham LJ, French NAH, Dawkins RL: **Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumor necrosis factor-alpha.** *Clin Exp Immunol* 1993, **92**:14-18.
  20. Fargion S, Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL: **TNF alpha promoter polymorphisms.** *Methods Mol Med* 2004, **98**:47-58.
  21. McCusker SM, Curran MD, Dynan KB, McCullagh CD, Urquhart DD, Middleton D, Patterson CC, McIlroy SP, Passmore AP: **Association between polymorphism in regulatory region of gene encoding tumor necrosis factor alpha and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia: a case-control study.** *Lancet* 2001, **357**:436-439.
  22. Franceschi C, Ottaviani E: **Stress, inflammation and natural immunity in the aging process: a new theory.** *Ageing (Milano)* 1997, **9**:30-31.
  23. Ross OA, Curran MD, Rea IM, Hyland P, Duggan O, Barnett CR, Annett K, Patterson C, Barnett YA, Middleton D: **HLA haplotypes and TNF polymorphism do not associated with longevity in the Irish.** *Mech Ageing Dev* 2003, **124**:563-567.
  24. Wang XY, Hurme M, Jylha M, Hervonen A: **Lack of association between human longevity and polymorphisms of IL-1 cluster, IL-6, IL-10 and TNF-alpha genes in Finnish nonagenarians.** *Mech Ageing Dev* 2001, **123**:29-38.
  25. Price P, Witt C, Allcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, French M, Mallal S, Christiansen F: **The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases.** *Immunol Rev* 1999, **167**:257-274.
  26. Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafe M, Cavallone L, Marchegiceni F, Olivieri F, Franceschi C, Caruso C: **Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 -1082 promoter SNP and its interaction with TNF- $\alpha$  -308 promoter SNP.** *J Med Genet* 2003, **40**:296-299.
  27. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ: **The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription.** *Mol Immunol* 1997, **34**:391-399.
  28. Zeicher M, Mozes E, Lonai P: **Lymphocytes alloantigens associated with X-chromosome linked immune response genes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, **74**:721-724.
  29. Litwin SD: **Does the X chromosome have a special role in immune biology?** *Med Hypotheses* 1982, **9**:313-323.
  30. Jansson L, Holmdahl R: **Genes on the X chromosome affect development of collagen-induced arthritis in mice.** *Clin Exp Immunol* 1993, **94**:459-465.
  31. Bignon JD, Fernandez-Viña MA: **Protocols of the 12<sup>th</sup> International histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP)).** In *Genetic Diversity of HLA, functional and Medical implications Volume I*. Edited by: Charon D. Paris: EDK; 1997.
  32. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW: **Single base polymorphism in the human Tumor Necrosis Factor (TNF) alpha gene detectable by NcoI restriction of PCR product.** *Hum Mol Gen* 1992, **1**:353-358.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)





Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Immunology Letters 93 (2004) 211–215



[www.elsevier.com/locate/](http://www.elsevier.com/locate/)

## Class I and class II MHC polymorphisms in Mexican patients with Behçet's disease

Elena Soto-Vega<sup>a</sup>, Ricardo García-Muñoz<sup>a</sup>, Yvonne Richaud-Patin<sup>a</sup>, Joaquín Zúñiga-Ramos<sup>b</sup>, José Carlos Crispín<sup>a</sup>, Efraín Díaz-Jouanen<sup>c</sup>, Luis Felipe Flores-Suárez<sup>a</sup>, Luis Llorente<sup>a,\*</sup>, Julio Granados<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000, México, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Molecular Biology and Immunogenetics, Infectious Diseases Unit, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, Tlalpan 14080, México, D.F., Mexico

<sup>c</sup> Department of Medicine, Hospital Angeles Lomas, Huixquilucan 52763, Edo. México, Mexico

Received 24 February 2004; received in revised form 25 March 2004; accepted 27 March 2004

Available online 22 April 2004

### Abstract

Behçet's disease is a multi-system inflammatory disorder of unknown etiology. The disease is more prevalent in Eastern Mediterranean countries and Japan where there is a linkage to HLA-B51. Mexican Mestizos are suitable subjects for studying the role of ethnicity in the susceptibility to Behçet's disease. High-resolution HLA class I and class II typing was performed by polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) reverse dot blot and PCR-single-strand polymorphism in 32 patients with Behçet's disease and 99 healthy ethnically-matched controls. A significant increased frequency of HLA-B\*44 ( $P = 0.02$ ; OR = 2.78; CI 95% = 1.1–7.7), HLA-B\*52 ( $P = 0.02$ ; OR = 5.33; CI 95% = 1.07–29.1), and HLA-B\*56 ( $P = 0.003$ ; OR = 4.19; CI 95% = 3.37–5.21) as well as HLA-DRB1\*01 and HLA-DRB1\*13 ( $P = 0.007$ ; OR = 3.36; CI 95% = 1.22–9.27) was found in Mexican patients with Behçet's disease when compared to controls. The low frequency of native markers in Mexican Mestizo patients with Behçet's disease suggests that genetic admixture between Eastern Mediterraneans and Orientals with Amerindians is a recent event that increased the risk of developing Behçet's disease in the Mexican population.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** HLA-B; HLA-DR; Behçet's disease; Genetic susceptibility; Mexican Mestizos

### 1. Introduction

In 1937, Hulusi Behçet described a syndrome evidenced by recurrent oral and genital ulcerations, and uveitis often leading to blindness. Nowadays it is considered as a systemic vasculitis that also affect the joints, the skin, all sizes of blood vessels, lungs, central nervous system, and the gastrointestinal tract [1].

The etiology of Behçet's disease is unknown, however, it has been suggested that some environmental factors such as

certain streptococci, *Escherichia coli*, Herpes simplex virus, parvovirus B19, mycobacterial heat shock protein-derived peptides, and staphylococcal superantigens can trigger the disease manifestations in genetically susceptible individuals [2–6]. The prevalence of Behçet's disease is considerably higher in countries from the Mediterranean region to Japan, along the Silk road. The highest incidence occurs in the population of Turkey. It has been suggested that the disease susceptibility genes might have been spread along this trading route by nomadic tribes or migrating Turks, or that this geographic predilection may be a reflection of the increased frequency of HLA-B51 in the healthy population [7–9]. Indeed, the association of HLA-B51 with Behçet's disease has been regarded as the strongest evidence of genetic contribution described to date [10]. Moreover, allelic association,

\* Corresponding author. Tel.: +52-56-55-59-54; fax: +55-55-73-20-96.

E-mail addresses: [llyrp@quetzal.innsz.mx](mailto:llyrp@quetzal.innsz.mx) (L. Llorente), [julgrate@yahoo.com](mailto:julgrate@yahoo.com) (J. Granados).

<sup>1</sup> Co-corresponding author.

genotypic differentiation, and stratification analyses in different ethnic groups have supported the direct role of HLA-B51 in the disease pathogenesis, and all other associations with neighboring gene or markers e.g., MICA (MHC class I chain-related gene A), could be explained by linkage disequilibrium with HLA-B51 [11]. Certainly, the presence of HLA-B51 negative patients suggest the influence of other genetic factors and/or of environmental or infectious agents.

Mexican Mestizo individuals who have a proportion of 56% Native American Indian genes, 40% Caucasian genes, and 4% African genes [12] are suitable subjects for studying the role of ethnicity in the susceptibility to Behçet's disease. Mestizo population represents a complex mixture of European (Caucasian) and American native inhabitants (Mongoloid). Mestizos constitute the core of the Mexican and the Latin American populations. This complex genetic process initiated in the 16th century, has expanded during the course of time and continues to be a dynamic process. Hence, class I and class II MHC genotypes were studied in Mexican Mestizo patients in order to elucidate the genetic factors behind Behçet's disease.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

The study included 32 subjects all of whom fulfilled the International Study Group diagnostic criteria for Behçet's disease [13]. Age ranged from 12 to 56 years (mean 33.9 years). There were 18 females (64%) and 10 males (36%). Disease duration was from 3 months to 25 years (mean 6.5 years). Patient's clinical characteristics are shown in Table 1. All patients were Mexican Mestizos. A Mexican Mestizo is defined as an individual who was born in Mexico and is a descendant of the native inhabitants of such region, and of individuals, mainly from Spain or from Africa, who migrated to America during the 16th century [14]. The control samples were obtained from 99 Mexican Mestizo healthy, unrelated individuals ethnically matched to patients with Behçet's dis-

ease. All subjects were informed about the objectives and methods of the study and gave their written consent.

### 2.2. HLA typing

Genomic DNA was isolated from peripheral EDTA anticoagulated whole blood employing the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA). DNA was then precipitated with isopropanol, washed with 70% ethanol and resuspended in sterile distilled water at a final concentration of 0.1–1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  before use. Generic HLA-B and HLA-DRB1 typing was performed by polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) reverse dot blot hybridization using the Dynal RELI SSO HLA-DR and HLA-B test kits (Hoffman-La Roche Ltd. and Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA). Information about DRB1 sequence was obtained from the 12th International Histocompatibility Workshop [15].

### 2.3. Statistical analysis

Gene frequencies were compared with matched healthy controls using the Chi-square test and *P* values were corrected from the number of comparisons performed by Bonferroni's test. Hardy-Weinberg equilibrium was confirmed on each HLA system.

## 3. Results

### 3.1. HLA-B locus

A statistically increased frequency of HLA-B\*44 ( $P = 0.02$ ; OR = 2.78; CI 95% = 1.1–7.7), HLA-B\*52 ( $P = 0.02$ ; OR = 5.33; CI 95% = 1.07–29.1), and HLA-B\*56 ( $P = 0.003$ ; OR = 4.19; CI 95% = 3.37–5.21) was observed in patients with Behçet's disease when compared to healthy controls (Table 2). No difference was found in the frequency of HLA-B\*51 [9% versus 5% ( $P = 0.24$ ; OR = 1.88; CI 95% = 0.58–5.93)] among patients and controls (Table 2).

### 3.2. HLA-DRB1 locus

Significant increased frequencies of HLA-DRB1\*01 and HLA-DRB1\*13 were found in patients with Behçet's disease as compared to healthy controls [15.6% versus 5% ( $P = 0.007$ ; OR = 3.36; CI 95% = 1.22–9.27)]. Moreover, a decreased tendency towards the frequency of HLA-DRB1\*08 [7.8% versus 16.6% ( $P = 0.06$ ; OR = 0.41; CI 95% = 0.13–1.17)] was observed in patients when compared to controls (Table 3).

Haplotype analysis showed no differences between both groups (data not shown). However, the most frequent haplotypes in our patients were HLA-B35-DR13, HLA-B44-DR1, and HLA-B52-DR4.

Table 1  
Patients' clinical characteristics

Manifestation	Frequency (%)
Oral ulcers	100
Genital ulcers	75
Skin lesions	50
Erythema nodosum	25
Pathergy test	60
Uveitis	39
Arthralgias	85
Arthritis	53
Deep vein thrombosis	7
Neurological involvement	25
Epididymitis	9
Gastrointestinal lesions	22

Table 2  
HLA-B gene frequencies in patients with Behçet's disease

HLA-B	Behçet's (n = 66)		Controls (n = 198)		PC <sup>a</sup>	OR <sup>b</sup>	CI <sup>c</sup> 95%
	n <sup>d</sup>	gf <sup>e</sup>	n	gf			
35	14	0.212	53	0.270	NS <sup>f</sup>	–	–
44	9	0.136	11	0.055	0.02	2.78	1.1–7.7
51	6	0.090	10	0.050	0.24	1.88	0.58–5.93
52	5	0.075	3	0.015	0.02	5.33	1.07–29.1
15	5	0.075	10	0.050	NS	–	–
56	4	0.060	0	0.000	0.003	4.19	3.37–5.21
40	4	0.060	15	0.075	NS	–	–
7	3	0.045	5	0.025	NS	–	–
39	3	0.045	21	0.105	NS	–	–
27	3	0.045	2	0.010	NS	–	–
14	2	0.030	12	0.060	NS	–	–
18	2	0.030	13	0.065	NS	–	–
41	2	0.030	4	0.020	NS	–	–
38	1	0.015	2	0.010	NS	–	–
45	1	0.015	1	0.005	NS	–	–
49	1	0.015	9	0.045	NS	–	–
50	1	0.015	2	0.010	NS	–	–
48	0	0.000	5	0.025	NS	–	–
8	0	0.000	5	0.025	NS	–	–
37	0	0.000	2	0.010	NS	–	–

<sup>a</sup> PC = *P* corrected value.

<sup>b</sup> OR = odds ratio.

<sup>c</sup> CI = confidence interval.

<sup>d</sup> n = number of alleles.

<sup>e</sup> gf = gene frequency.

<sup>f</sup> NS = not significant.

Table 3  
HLA-DRB1 gene frequencies in patients with Behçet's disease

HLA-DRB1	Behçet's (n = 66)		Controls (n = 198)		PC <sup>a</sup>	OR <sup>b</sup>	CI <sup>c</sup> 95%
	n <sup>d</sup>	gf <sup>e</sup>	n	gf			
1	10	0.156	10	0.050	0.007	3.36	1.22–9.27
4	10	0.156	47	0.237	NS <sup>f</sup>	–	–
13	10	0.156	10	0.050	0.007	3.36	1.22–9.27
3	7	0.109	11	0.055	0.16	2.02	0.67–5.95
2	7	0.109	18	0.090	NS	–	–
8	5	0.078	33	0.166	0.06	0.41	0.13–1.17
11	5	0.078	20	0.101	NS	–	–
14	4	0.062	21	0.106	NS	–	–
7	4	0.062	22	0.111	NS	–	–
10	1	0.015	0	0.000	NS	–	–
12	1	0.015	2	0.010	NS	–	–

<sup>a</sup> PC = *P* corrected value.

<sup>b</sup> OR = odds ratio.

<sup>c</sup> CI = confidence interval.

<sup>d</sup> n = number of alleles.

<sup>e</sup> gf = gene frequency.

<sup>f</sup> NS = not significant.

#### 4. Discussion

In this study, the association between polymorphisms in the HLA-B and HLA-DR loci with genetic susceptibility to develop Behçet's disease in Mexican Mestizo patients was evaluated.

A significant association was found between HLA-B44, B52, and B56 with Behçet's disease in our population. It is worth to mention that the alleles HLA-B\*51 and HLA-B\*52 belong to the serologically defined B5 major allele. Members of this group share the amino acid alanine at position 26, which contributes to the structure of peptide-binding

pocket B and determines the motif of bound peptides [16]. In this study, we found three HLA-B alleles different from others studies in which the HLA-B\*51 allele has been associated consistently in Turkish, Korean, Greek, Japanese, Israel Arabs, Iranian, Italian, and Moroccan patients [17–24]. These alleles, in Mexicans, might be the equivalent of HLA-B51 found in the above mentioned populations.

The gene frequency of HLA-B\*44 and HLA-B\*52 is relatively low while HLA-B\*56 is not found in the normal Mexican Mestizo population. The presence of HLA-B52 and HLA-B56 in Mexican Mestizo patients with Behçet's disease necessarily indicate that these alleles were acquired by admixture with oriental populations. By contrast HLA-B44 was acquired by admixture with Mediterranean populations. In the normal Mexican Mestizo population, the HLA-B\*35, B\*39, and B\*40 were the most common alleles, representing 45% of all HLA-B alleles [25]. Recently, it has been reported that these three alleles were also found in more than 50% in four Mexican Amerindian populations (50.6% in Mayos, 60.4% in Mazatecos, 53.4% in Nahuas, and 68.7% in Teenek), confirming the autochthonous origin of these alleles [26].

On the other hand, the HLA class II genotyping showed a statistically increased frequency of the HLA-DRB1\*01 (Eastern Mediterranean) and HLA-DRB1\*13 (Oriental) in the group of patients. These alleles were acquired by admixture with Mediterranean and Oriental populations for they are found infrequently in the normal Mexican Mestizo population (5%) and are not present in Mexican Amerindian populations [27].

Results from this work showed that Mexican Mestizo patients with Behçet's disease are genetically heterogeneous; however, its tempting to suggest that the alleles HLA B35, B44, B52, and B56 as well as HLA-DR1 and DR13 might explain up to half of the genetic susceptibility to develop the disease. The acquisition of these alleles in Mexican population indicates that genetic admixture between either, Eastern Mediterraneans or Orientals with Amerindians is a recent event beginning in the 16th century. The continuous movement of diverse populations to Latin America foresee an increase in the incidence of Behçet's disease in this region.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by a research grant from the Fundación Miguel Alemán, AC, Mexico City. Elena Soto-Vega is recipient of a Ph.D. scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico.

#### References

- [1] Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Current concepts: Behçet's disease. *N Eng J Med* 1999;341:1284–91.
- [2] Eglín RP, Lehner T, Subak-Sharpe JH. Detection of RNA complementary to the herpes simplex virus in mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. *Lancet* 1982;2:1356–61.
- [3] Lehner T. The role of heat shock protein. *Int Rev Immunol* 1997;14:21–32.
- [4] Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T. Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behçet's disease. *Infect Immun* 1991;59:1434–41.
- [5] Isogai E, Ohno S, Kotake S, Isogai H, Tsurumizu T, Fujii N, Yokota K, Syuto B, Yamaguchi M, Matsuda H. Chemiluminescence of neutrophils from patients with Behçet's disease and its correlation with an increased proportion of uncommon serotypes of *Streptococcus sanguis* in the oral flora. *Arch Oral Biol* 1990;35:43–8.
- [6] Yokota K, Hayashi S, Araki Y, Isogai E, Kotake S, Yoshikawa K, Fujii N, Hirai Y, Oguma K. Characterization of *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behçet's disease. *Microbiol Immunol* 1995;39:729–32.
- [7] Kaklamani V, Vaiopoulos G, Kaklamani P. Behçet's disease. *Semin Arthritis Rheum* 1998;27:197–217.
- [8] Gül A. Behçet's disease: an update on the pathogenesis. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:S6–S12.
- [9] Krause I, Molad Y, Weinberger A. Association of HLA-B5 with clinical expression and severity of Behçet's disease in Israel. *J Clin Rheumatol* 1999;5:137–40.
- [10] Gül A, Hajeer AH, Worthington J, Barrett JH, Ollier WE, Silman AJ. Evidence for linkage of the HLA-B locus in Behçet's disease, obtained using the transmission disequilibrium test. *Arthritis Rheum* 2001;44:239–40.
- [11] Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoco H, Gül A, Onoé K, Isogai E. Immunology and functional genomics of Behçet's disease. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1903–22.
- [12] Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V, de Rubens J, Armendares S, Buentello L. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol* 1986;71:203–7.
- [13] International Study Group for Behçet's disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1990;335:1078–80.
- [14] Burgos-Vargas R, Granados-Arriola J. Ankylosing spondylitis and related diseases in the Mexican Mestizo. In: Kahn MA, editor. *State of the art reviews*. Philadelphia, New York: Hanley & Belfus Inc.; 1990, p. 237–68.
- [15] Charron D, editor. Genetic diversity of HLA functional and medical implication. In: *Proceedings of the 12th International Histocompatibility Workshop and Conference*. Paris: EDK, Medical and Scientific International Publishers; 1997.
- [16] Marsh SGE, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens* 2001;57:236–83.
- [17] Kaya TI, Dur H, Tursen U, Gurler A. Association of class I HLA antigens with the clinical manifestations of Turkish patients with Behçet's disease. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:498–501.
- [18] Park SH, Park KS, Seo YI, Min DJ, Kim WU, Kim TG, Cho CS, Mok JW, Park KS, Kim HY. Association of MICA polymorphism with HLA-B51 and disease severity in Korean patients with Behçet's disease. *J Korean Med Sci* 2002;17:366–70.
- [19] Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Shiina T, Palimeris GD, Kaklamani E, Ito D, Ohno S, Inoko H. Sequencing based typing of HLA-B\*51 alleles and the significant association of HLA-B\*5101 and B\*5108 with Behçet's disease in Greek patients. *Tissue Antigens* 2002;59:118–21.
- [20] Nishiyama M, Nakae K, Kuriyama T, Hashimoto M, Hsu ZN. A study among related pairs of Japanese patients with familial Behçet's disease: group comparisons by interval of disease onsets. *J Rheumatol* 2002;29:743–7.

- [21] Cohen R, Metzger S, Nahir M, Chajek-Shaul T. Association of the MIC-A gene and HLA-B51 with Behçet's disease in Arabs and non-Ashkenazi Jews in Israel. *Ann Rheum Dis* 2002;61:157–60.
- [22] Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Yoshida M, Onari K, Nikbin B, Davatchi F, Chams H, Ghaderi AA, Ohno S, Inoko H. HLA class I genotyping including HLA-B\*51 allele typing in the Iranian patients with Behçet's disease. *Tissue Antigens* 2001;57:457–62.
- [23] Salvarani C, Boiardi L, Mantovani V, Olivieri I, Ciancio G, Cantini F, Salvi F, Malesta R, Molinotti C, Govoni M, Trotta F, Filippini D, Paolazzi G, Viggiani M. Association of MICA alleles and HLA-B51 in Italian patients with Behçet's disease. *J Rheumatol* 2001;28:1867–70.
- [24] Choukri F, Chakib A, Himmich H, Hue S, Caillat-Zucman S. HLA-B\*51 and B\*15 alleles confer predisposition to Behçet's disease in Moroccan patients. *Hum Immunol* 2001;62:180–5.
- [25] De Leo C, Castelán N, López M, González N, Weckmann AL, Melín-Aldana H, Vargas-Alarcón G, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J, Ramírez E, Lisker R. *Hum Biol* 1997;69:809–18.
- [26] Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Zúñiga J, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Rancel C, Villareal-Garza C, Martínez-Laso J, Granados J, Arnaiz-Villena A. Distribution of HLA-B alleles in Mexican Amerindian populations. *Immunogenetics* 2003;54:756–60.
- [27] Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Gamboa R, Zúñiga J, Flores C, Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, Granados J, Arnaiz-Villena A. Polymorphism and distribution of HLA-DR2 alleles in Mexican populations. *Hum Immunol* 2001;3:286–90.



## P-glycoprotein in autoimmune diseases

Yvonne Richaud-Patin, Elena Soto-Vega, Juan Jakez-Ocampo, Luis Llorente\*

*Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga #15, Tlalpan, 14000 Mexico City, Mexico*

Received 22 August 2003; accepted 25 August 2003

### Abstract

Multidrug resistance-1 (MDR-1) is characterized by overfunction of P-glycoprotein (P-gp), a pump molecule that decreases intracellular drug concentration by effluxing them from the intracellular space. Broad ranges of structurally unrelated compounds are transported by P-gp, including antineoplastic agents, HIV protease inhibitors, prednisone, gold salts, methotrexate, colchicine as well as several antibiotics. In contrast, many other compounds such as calcium channel blockers (verapamil) and immunosuppressors (cyclosporine-A) are able to inhibit P-gp function. The P-gp role in therapeutic failures has been extensively studied in cancer; however, there is little information regarding MDR-1 phenotype in autoimmune disorders. It has been reported that an increased number of lymphocytes are able to extrude P-gp substrates in rheumatoid arthritis, immune thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus, the patients with poor response to treatment being the ones that exhibit the highest values. This may be due, at least in part, to a simultaneous long-term usage of several drugs that induce P-gp function. Since abnormally activated cell compartments characterize autoimmune diseases, it is possible that those cells are the ones that exhibit drug resistance. The study of drug resistance mechanisms in autoimmunity may be helpful for the optimization of the current therapeutic schemes through their combination with low doses of P-gp inhibitors.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* P-glycoprotein; Multidrug resistance-1; Rheumatoid arthritis; Immune thrombocytopenia; Systemic lupus erythematosus

### 1. Multidrug resistance-1 phenotype

Treatment of autoimmune diseases has been one of the greatest challenges in modern medical practice. This is due, in part, to the therapeutic failures often seen in patients suffering from these diseases. Little is known about the possible factors involved

in the unresponsiveness to agents commonly employed for the treatment of such disorders. Nevertheless, studies performed mainly in cancer and, more recently, in HIV have provided information shedding light on drug resistance mechanisms [1–3].

Protection systems for survival have developed through evolution from bacteria to mammals [4]. Among these mechanisms, one of the most extensively studied is the so-called multidrug resistance-

\*Corresponding author. Tel.: +52-55-56-55-59-54; fax: +52-55-55-73-20-96.

E-mail address: [lllyrp@quetzal.innsz.mx](mailto:lllyrp@quetzal.innsz.mx) (L. Llorente).

1 (MDR-1) characterized by the expression and functional activity of the 170-kD transmembrane P-glycoprotein (P-gp), which belongs to a super-family of ABC (ATP binding-cassette) transporters [5]. P-gp is normally expressed in a wide variety of tissues and cells, including the blood brain barrier, proximal tubular renal epithelium, gut, liver, adrenal glands, lymphocytes and early CD34+ hematopoietic stem cells [6–8]. Nowadays, the physiological role of P-gp is not completely understood; it has, however, been related to cell detoxification of bacterial products, hormone secretion and transport of some metabolites [9–11]. This phenomenon is due to the ability of P-gp to act as a one-way energy-dependent pump, effluxing several molecules from the inside to the extracellular space [12]. Its clinical relevance became evident with the development of cancer chemotherapy, when the emergence of resistant clones (as previously seen with antibiotics) was noticed. Thus, certain antineoplastic agents were identified as substrates of P-gp, most of them structurally unrelated, e.g. vinca alkaloids and anthracyclines. Then, it was found that P-gp transports many other drugs, such as antibiotics (erythromycin, actinomycin D), and cytotoxics (colchicine), as well as several drugs commonly used for the treatment of autoimmune diseases (gold salts, methotrexate (MTX), glucocorticoids and vincristine). It is worth mentioning that several compounds termed chemosensitizers are able to circumvent the MDR-1 phenotype; among them the most thoroughly studied are verapamil and cyclosporine-A (Cy-A) [12].

## 2. P-glycoprotein in autoimmunity

Research on the MDR-1 phenotype in autoimmune disorders, particularly in rheumatoid arthritis (RA), began in the mid-1990s with works from the French teams of Jorgensen et al. and Maillefert et al. They described, respectively, high P-gp mRNA levels in synovium from RA patients with history of treatment with three or more second-line agents [13], and P-gp surface overexpression in peripheral lymphocytes from RA patients under long-term steroid therapy [14]. These reports suggest that in RA patients receiving steroids and/or

immunosuppressive drugs, P-gp overactivity in immune cells might be associated with increased efflux of these agents and, consequently, with an insufficient therapeutic effect. Yudoh et al. reported that RA patients partly unresponsive to sulfasalazine or bucillamine exhibited high P-gp expression on Th1 cells [15]. This finding may be of clinical significance since P-gp inhibitors added to the RA treatment might improve the efficacy of the selected disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD). It is worth to mention that deficient therapeutic responses and disease progression occurs with a frequency of less than 5%, but it represents an important and easily recognizable group of RA patients [16]. Indeed, it has been shown that patients with refractory RA are those with the highest P-gp functional activity that correlates with TNF- $\alpha$  mRNA levels [17]. These findings are of the utmost importance for the well-known role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of RA [18]. TNF- $\alpha$ , unlike other cytokines, lacks hydrophobic signal sequences and hence, must be secreted by non-conventional mechanisms. Molecules that share this feature are transported through energy-dependent proteins [19]. Furthermore, it has been demonstrated that the presence of TNF- $\alpha$  induces *mdr-1b* gene expression and functional activity of P-gp in cultures of rat hepatocytes [20], and similar results were found in a human GM-CSF-dependent leukemia myeloid cell line [21]. Thus, if TNF- $\alpha$  has such effects on immune cells, it could explain the P-gp overfunction in lymphocytes from refractory RA patients.

MTX is the most widely DMARD employed for the treatment of RA, and is frequently administered in combination with other agents. The combined use of MTX and Cy-A has been shown to be a beneficial therapeutic scheme for RA due to the immunomodulatory effect of Cy-A (suppression of calcium-dependent calcineurin-stimulated effects, e.g. IL-2 production and T-cell activation) [22,23]. Since Cy-A circumvents P-gp function, it is reasonable to suggest that the synergism of these drugs is, at least in part, the consequence of both an enhanced therapeutic effect of MTX (decreased serum IL-1 levels) and the inhibition of TNF- $\alpha$  release by Cy-A.



Considering that one of the physiological functions of P-gp is detoxification, it cannot be ruled out that its overfunction in RA could be the result of long-term usage of multiple agents, and that it is not necessarily linked to an inherent defect of the disease.

Recently, P-gp function in immune thrombocytopenia (ITP) has been the subject of interest. Approximately 30–40% of ITP patients are unresponsive to treatment, even after splenectomy, and the aggressive therapeutic schemes needed have high risks of adverse events, besides its considerable cost. Since not only steroids but also vinca alkaloids and alkylating agents are employed for the therapy of refractory ITP, drug resistance mechanisms could be also involved. Indeed, a high P-gp function in lymphocytes from ITP as well as in Evan's syndrome patients has been described [24,25]. In both reports, the highest values of P-gp function were found within treatment refractory patients, suggesting on the one hand, an inherent feature of the abnormal autoimmune process and, on the other, an acquired or induced MDR-1 phenotype.

Treatment resistance/dependency is not the exception for SLE patients and information regarding MDR-1 is very scarce. The broad range of clinic and biological manifestations of SLE is reflected in the heterogeneous treatment requirements as well as in disease outcome. Accordingly, some patients are dependent or refractory to corticosteroids, which remain the mainstay therapy for active SLE. Since prednisone (PDN) is another P-gp substrate, it is conceivably related to the MDR-1 phenotype. So far, there is a single report in which P-gp function in lymphocytes from SLE patients was evaluated [26]. Clear-cut differences in P-gp function were found among patients and controls. Interestingly, patients in clinical remission showed no differences when compared to controls, while the active SLE group exhibited the highest P-gp values. In the same report, low doses of verapamil were added to the current treatment of five steroid-dependent active SLE patients with high P-gp functional activity. In all of them, PDN tapering and improvement of the clinical status were achieved in parallel with a decrease in MDR-1 lymphocytes. These data open further lines of

research concerning the role of P-gp in the treatment-response of SLE patients and the therapeutic benefit when MDR-1 phenotype is reversed.

### 3. Concluding remarks

Development of cancer treatment has been invariably related to the arising of drug resistance. In the last 30 years, research on chemotherapy resistance has discovered different mechanisms implicated in this process. Among the first and most well described is the MDR-1 through the increased function of the *mdr-1* gene product [1]. This knowledge has allowed the identification of compounds that are able to diminish or block the transport by P-gp. Several attempts to reverse the MDR-1 phenotype have been performed in drug-resistant neoplastic cell-lines and in animal models with promising data [27]. Nevertheless, when clinical trials in humans have been carried out, disappointing results were obtained. The major problem for P-gp inhibition in human cancer is that the usefulness of chemosensitizers depends on its capacity to potentiate selectively the therapeutic effect of the antineoplastic drugs at optimum concentrations. On the other hand, the dosage to achieve MDR-1 circumvention must be non-toxic, inasmuch as it may surpass the possible benefit [27]. Furthermore, it should be taken into account that P-gp function is important to protect normal tissues from chemical/biological insults; thus, MDR-1 antagonists may enhance the toxic effects of these substances.

Lessons from cancer research can be learned and applied to other areas. The goal of cancer treatment is, undoubtedly, to selectively annihilate the malignant clones, whereas in autoimmune diseases it is to control the abnormally activated cell subpopulations. In this regard, calcium ions as well as protein kinase C are well-known intracellular second messengers for biological and biochemical events, namely, cell activation and signal transduction pathways for apoptosis/survival [28,29]. It has been demonstrated in chronic lymphocytic leukemia cells that calcium antagonists enhance the pharmacological effects of antineoplastic agents that, interestingly, are not P-gp substrates and induce apoptosis by calcium depletion [30].

Moreover, both calcium ions and protein kinase C are related to the MDR-1 phenotype [30–32], and differential calcium influx/efflux from Th1 and Th2 lymphocytes have been described [33]. The P-gp involvement in cytokine synthesis and immune regulation is now being explored [34,35]. Indeed, in autoimmunity the MDR-1 phenotype alters the response to treatment as well as disease outcome, but it may be biased towards immune imbalance, rather than solely to drug resistance. Much remains to be elucidated concerning the immunological role of P-gp in order to understand this Nature's conundrum.

### Take-home messages

- Transmembrane transporter P-gp is a one-way ATP-dependent pump and represents an evolutionary cellular-defense mechanism involved in detoxification and excretion of metabolites.
- MDR-1 is related to P-gp overfunction, which reduces the intracellular accumulation of drugs, diminishing its pharmacological action. The MDR-1 phenotype and its possible relationship with therapeutic failures in autoimmune diseases have been poorly explored. However, in RA, ITP as well as SLE, high numbers of lymphocytes have been reported that are able to extrude P-gp substrates. As autoimmune diseases are not of neoplastic nature, the addition of chemosensitizers might lead to an improvement of the established therapeutic schemes, in contrast to the discouraging attempts to circumvent drug resistance in cancer.
- The MDR-1 phenotype in autoimmunity may be related not only to drug resistance but also to immune regulation for it may be involved in cytokine release as well as in cell activation/death pathways.
- Although novel and specific biological therapies for autoimmune diseases are under development, the optimization of the currently available treatments would benefit those patients in less time, with minimum drug requirements and, more importantly, minimizing the risk of toxicity.

### References

- [1] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48–58.
- [2] Lee CG, Gottesman MM. HIV protease inhibitors and the MDR-1 multidrug transporter. *J Clin Invest* 1998;101:287–8.
- [3] Kim RB. Drug transporters in HIV therapy. *Top HIV Med* 2003;11:136–9.
- [4] Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:67–113.
- [5] Higgins CF. The ABC of channel regulation. *Cell* 1995;82:693–6.
- [6] Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in normal human and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;38:1277–87.
- [7] Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, et al. Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood–brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:695–8.
- [8] Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Pohlack DJ, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:265–9.
- [9] Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, et al. Homology between P-glyco-protein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 1986;324:485–9.
- [10] Chen CJ, Chin JE, Ueda K, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the MDR-1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986;47:381–9.
- [11] Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 1986;47:371–80.
- [12] Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385–427.
- [13] Jorgensen C, Sun R, Rossi JF, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human rheumatoid synovium. *Rheumatol Int* 1995;15:83–6.
- [14] Maillefert JF, Maynadie M, Tebib JG, et al. Expression of the multidrug resistance glycoprotein 170 in the peripheral blood lymphocytes of rheumatoid arthritis patients. The percentage of lymphocytes expressing glycoprotein 170 is increased in patients treated with prednisolone. *Br J Rheumatol* 1996;35:430–5.
- [15] Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Increased expression of multidrug resistance of P-glycoprotein on Th1 cells correlates with drug resistance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2014–5.

- [16] Morgan C, Lunt M, Brightwell H, et al. Contribution of patient related differences to multidrug resistance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:15–9.
- [17] Llorente L, Richaud-Patin Y, Diaz-Borjón A, et al. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome. *Joint Bone Spine* 2000;67:30–9.
- [18] Feldman M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996;14:397–440.
- [19] Kuchler K, Thorner J. Secretion of peptides and proteins lacking hydrophobic signal sequences: the role of adenosine triphosphate-driven membrane translocators. *Endocrinol Rev* 1992;13:499–514.
- [20] Hirsh-Ernst KI, Ziemann C, Foth H, Kozian D, Schmitz-Salue C, Kahl GF. Induction of mdrlb mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol* 1998;176:506–15.
- [21] Bailly JD, Pourquier P, Jaffrezou JP, et al. Effect of 5637-conditioned medium and recombinant cytokines on P-glycoprotein expression in human GM-CSF-dependent leukemic myeloid cell line. *Leukemia* 1995;9:1718–25.
- [22] Panayi GS, Tugwell P. An international consensus report: the use of cyclosporin A in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1993;32(Suppl 1):v.
- [23] Tugwell P, Pincus T, Yokum D, et al. Combination therapy with cyclosporine and methotrexate in severe rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1995;333:137–41.
- [24] Ruiz-Soto R, Richaud-Patin Y, López-Karpovitch X, Llorente L. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in autoimmune disorders III: increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from immune thrombocytopenic purpura patients. *Exp Hematol* 2003;31:483–7.
- [25] Levy AS, Cunningham-Rundles S, Mazza B, Simm M, Gorlick R, Bussel J. High P-glycoprotein-mediated export observed in patients with a history of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2002;118:836–8.
- [26] Diaz-Borjón A, Richaud-Patin Y, Alvarado de la Barrera C, Jakez-Ocampo J, Ruiz-Argüelles A, Llorente L. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part II: increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients might affect steroid requirements for disease control. *Joint Bone Spine* 2000;67:40–8.
- [27] Ford JM. Modulators of multidrug resistance. Preclinical studies. *Hematol/Oncol Clin N Am* 1995;9:337–59.
- [28] Truman JP, Garban F, Choqueux C, Charron D, Mooney N. HLA class II signaling mediates cellular activation and programmed cell death. *Exp Hematol* 1996;24:1409–15.
- [29] Distelhorst CW, Dubyak G. Role of calcium in glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes and lymphoma cells: resurrection of old theories by new findings. *Blood* 1998;91:731–4.
- [30] Vilpo J, Koski T, Vilpo L. Calcium antagonists potentiate P-glycoprotein-independent anticancer drugs in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Haematologica* 2000;85:806–13.
- [31] O'Brian CA, Ward NE, Stewart JR, Chu F. Prospects for targeting protein kinase C isozyme in the therapy of drug-resistant cancer—an evolving story. *Cancer Metastasis Rev* 2001;20:95–100.
- [32] Aftab DT, Yang JM, Hait WN. Functional role of phosphorylation of the multidrug transporter (P-glycoprotein) by protein kinase C in multidrug-resistant MCF-7 cells. *Oncol Res* 1994;6:59–70.
- [33] Fanger CM, Neben AL, Cahalan MD. Differential  $Ca^{2+}$  influx, KCa channel activity, and  $Ca^{2+}$  clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *J Immunol* 2000;164:1153–60.
- [34] Pendse S, Sayegh MH, Frank MH. P-glycoprotein a novel therapeutic target for immunomodulation in clinical transplantation and autoimmunity? *Curr Drug Targets* 2003;4:469–76.
- [35] Jorgensen C, Maillefert JF. Multidrug resistances genes in rheumatology: is their role immunological or pharmacological? *Joint Bone Spine* 2000;67:8–10.

### ***The World of Autoimmunity; Literature Synopsis***

#### **Sudden hearing loss and cochlear antigen reactivity**

Garcia Callejo et al. (*Acta Oto-Laryngologica* 2003;123:168) screened 51 patients having idiopathic sudden sensorineural hearing loss with a Western blot for bovine cochlear antigen. 16 (31%) of these patients had a band identified in this Western blot method. These patients with 'positive' Western blot had a greater number of non-specific laboratory tests with abnormal results, and had better hearing recovery. These 'positive' patients had a positive correlation between the degree of hearing recovery and age and also early onset of treatment. Hence, this finding can predict a beneficial response to corticosteroid therapy.



## Effect of Rapamycin on Cytokine Profile in Kidney Transplant Recipients Treated With Triple Drug Therapy

L.E. Morales-Buenrostro, L. Llorente, Y. Richaud-Patin, C. de Leo, E. Soto-Vega, A. Díaz-Alderete, L.G. Vázquez-Lavista, S. Coto, R. Correa-Rotter, and J. Alberú

### ABSTRACT

The aim of this study was to explore differences in the cytokine profile among de novo kidney transplant recipients treated with either Rapamycin (Rapa) + cyclosporine (CsA) + prednisone (P) or CsA + azathioprine (Aza) + P.

**Patients and methods.** Among the 13 adult kidney transplant recipients studied, seven received Rapa + CsA + P while the remaining six received CsA + Aza + P with their living donors serving as controls ( $n = 13$ ). Spontaneous production of IL-2, IFN $\gamma$ , IL-10, and TGF- $\beta$  were measured by ELISA in supernatants from 24-hour cultured unstimulated peripheral blood mononuclear cell (PBMC) at time zero (the day before the transplant), and at 3 and 6 months posttransplant. Cytokines were also measured 1 month after CsA withdrawal in the Rapa + CsA + P group.

**Results.** From time zero to the end of the study, IL-2, IFN $\gamma$ , and IL-10 were present at low or undetectable levels in all three groups. TGF- $\beta$  tended to increase in supernatants from patients under Rapa + CsA + P at 6 months posttransplant and at 1 month after CsA withdrawal without correlation to Rapa blood levels. TGF- $\beta$  remained stable throughout the study period for patients included in the CsA + Aza + P group. There was no difference in this cytokine level between these study groups at any given time.

**Conclusions.** This study showed no differences in the spontaneous cytokine profiles evaluated in patients treated with both therapeutic schemes.

RECENTLY IT HAS BEEN suggested that Rapamycin (Rapa) induces the production of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) by lymphoid cells.<sup>1</sup> Rapa and TGF- $\beta$  have similarities in both their immunosuppressive and antiproliferative profiles, suggesting a potential functional link between the drug and this cytokine.<sup>2</sup> It has been proposed that cyclosporine (CsA) exerts its immunosuppressive and profibrotic effects at least partially through the induction of TGF- $\beta$ .<sup>3</sup> As Rapa may also enhance TGF- $\beta$  production by leukocytes, it is of concern that both agents may synergize not only in immunosuppression but also in fibrogenesis.<sup>1</sup> Also previous studies have demonstrated that Rapa combined with tacrolimus produced an increase in circulating TGF- $\beta$  levels.<sup>4</sup> Accordingly, we explored the in vivo TGF- $\beta$  production in kidney transplant recipients undergoing treatment with either Rapa + CsA or CsA-Azathioprine (Aza) without Rapa.

In this study, we compared the spontaneous production of TGF- $\beta$ , as well as of other Th1 (IL-2, IFN $\gamma$ ) and Th2

(IL-10) cytokines in the novo KTR under immunosuppression with either Rapa + CsA + prednisone (P) or CsA + Aza + Pdn.

### PATIENTS AND METHODS

#### Patients

The 13 adult recipients were grouped according to their initial/maintenance immunosuppressive combinations into the following groups: Rapa + CsA + P group ( $n = 7$ ), and

From the Departments of Nephrology and Mineral Metabolism (L.E.M.-B.; R.C.-R.), Immunology (L.L., Y.R.-P., E.S.-V., A.O.-A., L.G.V.-L.) and Transplantation (C.D.L., J.A.), Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico.

Address reprint requests to Josefina Alberú, MD, Departamento de Trasplantes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Sección XVI, Tlalpan, México DF, CP 14000, Mexico. E-mail: josefinaalberu@hotmail.com

**Table 1. TGF- $\beta$  Levels, CsA and Rapa Blood Levels, and Serum Creatinine Values in the Two Experimental Groups and the Control Group**

	Rapa + CsA + P (n = 7)	CsA + Aza + P (n = 6)	Controls (n = 13)
TGF- $\beta$ (IU/mL)			
At time 0	24.6 $\pm$ 13.2*	27 $\pm$ 13.6*	12.9 $\pm$ 7.7*
At 3 months	26.3 $\pm$ 13.3	24.7 $\pm$ 12.2	19.6 $\pm$ 14
At 6 months	35.1 $\pm$ 23.1	26.3 $\pm$ 11.5	22 $\pm$ 12.4
1 month after CsA withdrawal	45.7 $\pm$ 20.5	—	—
Rapa blood level (ng/mL)			
At 3 months	17.6 $\pm$ 7	—	—
At 6 months	9.8 $\pm$ 4.8	—	—
1 months after CsA withdrawal	12.1 $\pm$ 5.2	—	—
CsA blood level (ng/mL)			
At 3 months	141.3 $\pm$ 31.4	142.1 $\pm$ 102	—
At 6 months	122.3 $\pm$ 68	119.6 $\pm$ 85.8	—
SCr (mg/dL)			
At 3 months	1.46 $\pm$ 0.43	1.32 $\pm$ 0.45	—
At 6 months	1.46 $\pm$ 0.45	1.33 $\pm$ 0.36	—

\*P = .034, controls versus the other two groups.

CsA + Aza + P group (n = 6). The 13 living donors to the above patients served as controls.

#### Cytokine Measurements

TGF- $\beta$ , IL-2, IFN $\gamma$ , and IL-10 production were quantified by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) of supernatants after 24-hour cultured unstimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC), which had been isolated by gradient centrifugation on Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway). After two washes with RPMI-1640 culture medium (Gibco-BRL, Gaithersburg, Md, USA), the cells were adjusted to a concentration of  $1 \times 10^6$ /mL RPMI-1640 containing 10% gamma globulin-free fetal calf serum (Gibco-BRL) for incubation at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. Supernatants collected after centrifugation were stored at -70°C until tested. Cytokine ELISA assays were performed according to the manufacturer's recommendations (Boehringer Mannheim, Germany) with the results expressed as mean IU/mL  $\pm$  SD. Supernatants were collected at time zero (the day before transplant), and at 3 and 6 months posttransplant. Also, cytokines were quantitated at 1 month after CsA withdrawal for the group receiving Rapa + CsA + P for 12 months; in these patients, the dose of Rapa was increased to achieve blood levels above 10 ng/mL before CsA withdrawal.

#### Statistical Analysis

Results were reported as mean values  $\pm$  standard deviation (SD). A two-tailed nonpaired *t* test was considered significant if *P* < .05.

#### RESULTS

The Rapa + CsA + P group included five men and two women; the CsA + Aza + P group, six men. The mean age  $\pm$  SD of the patients in these two groups were 29.1  $\pm$  10.3

years and 26.2  $\pm$  5.6 years, respectively. The 13 living kidney donors (controls) were eight men/five women of mean age 36.2  $\pm$  13.3 years.

Spontaneous production of IL-2, IFN $\gamma$ , and IL-10 in supernatants under unstimulated conditions remained at low levels; in most instances they were undetectable throughout the study period, showing no differences among the groups at any time. It is worth mentioning that all measurements were determined in supernatants from 24-hour culture of unstimulated PBMC.

TGF- $\beta$  tended to increase (Table 1) in supernatants from patients under Rapa + CsA + P, at 6 months posttransplant and at 1 month after CsA withdrawal without correlation to Rapa blood levels. TGF- $\beta$  remained stable throughout the study period for patients included in the CsA + Aza + P group. There was no difference in this cytokine level between these study groups at any given time. In contrast, a statistical difference was observed in TGF- $\beta$  level at time zero between the controls and the other two groups (*P* = .034).

#### DISCUSSION

This study showed no differences in the spontaneous cytokine profiles evaluated under the therapeutic regimens at 3 and 6 months posttransplant. The difference among both groups versus controls regarding TGF- $\beta$  spontaneous production at time zero may be related to the inflammatory process caused by renal insufficiency, although this deserves to be further explored. In contrast, the increased TGF- $\beta$  levels through time in the control group may be the result of the tissue repair process.

An unexpected finding was the almost twofold increase in TGF- $\beta$  spontaneous production 1 month after CsA withdrawal when compared to time zero for the Rapa + CsA + P group although this increase may exclusively reflect a long-term effect of Rapa, it could be related to a mechanism

triggered by the immune system in an attempt to compensate for CsA withdrawal and sustain graft acceptance in a Rapa-independent fashion. Rapa is recognized for its antiproliferative effect attributed primarily to the inhibition of signaling events in cell cycle progression. However, part of this effect could also be amplified by TGF- $\beta$ .<sup>1</sup> Also, sustained expression of TGF- $\beta$  may promote fibrosis leading to chronic rejection.<sup>5</sup> To our knowledge, the presence of fibrosis in kidney grafts has not yet been related to the use of Rapa. Then, it will be of interest to further specify the TGF- $\beta$  isoform production as well as of the expression of its receptors among recipients under Rapa (without CsA), seeking to determine whether the detected cytokine corresponds to an isoform that may be less profibrotic than TGF- $\beta$ 1 (induced by CsA), thereby maintaining a beneficial immunosuppressive effect of this multifunctional cytokine on the graft. Given the small number of patients, however, we can not confirm any specific role for TGF- $\beta$  in Rapa-immunosuppressed patients.

The absence of differences in the studied Th1-derived cytokines among Rapa + CsA + P versus CsA + Aza + P groups suggests that both immunosuppressive schemes are equally effective to down-regulate the production of proinflammatory molecules. Certainly, further studies with larger

number of patients during long-term posttransplant follow-up will be valuable to elucidate differences in the Th1/Th2 balance and its potential implications in Rapa immunosuppressed patients.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a research grant from the Fundación Miguel Alemán, AC México, DF, México.

#### REFERENCES

1. Dodge IL, Demirci G, Strom TB, et al: Rapamycin induces transforming growth factor-beta production by lymphocytes. *Transplantation* 70:1104, 2000
2. Wang T, Li BY, Danielson PD, et al: The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86:435, 1996
3. Shin GT, Khanna A, Ding R, et al: In vivo expression of transforming growth factor-beta1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 65:313, 1998
4. Khanna AK, Plummer MS, Bresnhan B, et al: Molecular analysis of immune function in renal transplant patients treated with tacrolimus and rapamycin. *Am J Transplant* 2(Suppl 3):234, 2002 (abstract # 384)
5. Sharma VK, Bologna RM, Xu GP, et al: Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 49:1297, 1996