

Utilidad de Determinar el Polimorfismo de la Región Promotora -308 del Gen del Factor de Necrosis Tumoral Alfa, en Pacientes con Artritis Reumatoídea

Lilian Soto S.*, Carolina Llanos M.*, Francisca Sabugo S.*, Lorena Salazar **, J. Carlos Aguillón G.***, Miguel Cuchacovich T.*

* Sección de Reumatología, Depto. de Medicina, Hospital Clínico U. de Chile

** Bioquímico, Tesista Doctorado Ciencias Biomédicas, Programa Disciplinario de Inmunología, Facultad de Medicina, U. de Chile

*** Bioquímico, PhD Ciencias, Programa Disciplinario de Inmunología, Facultad de Medicina, U. de Chile

Resumen

La Artritis Reumatoídea es una enfermedad inflamatoria sistémica, crónica, de curso habitualmente progresivo, en cuya etiología interactúan mecanismos ambientales favorecidos por una predisposición genética. Existe un amplio espectro de citoquinas involucradas en la patogenia. Entre ellas, el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF α) juega un rol protagónico. Esto se ha visto confirmado en el último tiempo con las nuevas terapias biológicas que bloquean la acción de esta citoquina, logrando respuestas de gran impacto en la calidad de vida de los pacientes. En el presente artículo se revisan los elementos que ayudan a entender la fisiopatología, mecanismos reguladores y la importancia de determinar el polimorfismo del promotor del gen del TNF α -308, basados en la experiencia de un grupo de investigación nacional.

Summary

Rheumatoid Arthritis is systemic, inflammatory, chronic and progressive disorder. Both genetic and environmental factors are involved in the aetiology of RA. A large number of cytokines are associated with pathology. The TNF α is a pivotal factor in RA. There exist several stu-

dies where remarkable clinical benefit was observed in RA patients treated with TNF blocking agents. In the present article we review the necessary aspects to understand the pathophysiology, regulatory mechanisms and the utility of determining the -308 TNF α promoter polymorphism based on the national research group's experience.

INTRODUCCION

La Artritis Reumatoídea (AR) es un desorden autoinmune heterogéneo con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde sinovitis leve a compromiso de órganos profundos. Tanto mecanismos genéticos como ambientales están involucrados en la etiología de la AR. Además de la ya conocida predisposición genética observada en los pacientes portadores de alelos HLA-DRB1, se han descrito otros potenciales predisponentes, como el gen del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF α) (1-3).

El TNF α es una citoquina inducible con un amplio espectro de acciones proinflamatorias e inmunoestimuladoras, que juega un rol central en AR. Altos niveles de TNF α se encuentran tanto en el líquido como en el tejido sinovial de pacientes con AR. Además, importantes beneficios clínicos se han observado en pacientes con AR que han recibido tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-TNF α en estudios doble ciego, placebo-control (1, 4, 5).

Si bien el TNF α es una citoquina fundamental de la inmunidad innata y adquirida, diferentes niveles de producción se han relacionado con predisposición a enfermedades. La expresión persistente y aislada del TNF α basta para inducir artritis, como ha sido demostrado en un

Dirigir correspondencia a:

Dra. Lilian Soto S., Sección de Reumatología., Hospital Clínico Universidad de Chile. Santos Dumont 999, oficina 2115, Independencia, Santiago
Teléfono: 6788236.

lsotos@ns.hospital.uchile.cl

Financiamiento de Proyectos: FONDECYT 2004 N° 1040439 y HCUCH N° 037/02

modelo de ratones transgénicos en los que la sobreexpresión de TNF α humano transgénico provocó el desarrollo de una artritis similar a AR. La producción de TNF α ha mostrado importantes diferencias entre individuos, y estas variaciones parecen asociadas a ciertos alelos HLA-DR. Individuos HLA-DR2+ producen bajos niveles de TNF α , mientras que aquellos HLA-DR3+ y HLA-DR4+ producen altos niveles. Aproximadamente el 60% de las variaciones en la producción de TNF α está genéticamente determinado. Por otro lado, la ubicación del gen del TNF α dentro del locus HLA del cromosoma 6 permite plantear que la existencia de polimorfismos alélicos en la región promotora del gen del TNF α pueda afectar la expresión de éste y, así, predisponer la aparición de la AR o influir sobre su severidad (1, 6).

ACCIONES DEL TNF α

El TNF α es una citoquina inducible, glicosilada, de 17 kDa, secretada principalmente por macrófagos. En condiciones fisiológicas posee actividad antitumoral, antiviral y antimicrobiana. Induce el crecimiento tisular, diferenciación de tejidos e inmunorregulación. Se une a dos tipos de receptores, de 55 y 75 kDa, denominados tipo I y tipo II, respectivamente, los que se encuentran ampliamente distribuidos en las distintas líneas celulares (7).

Por poseer efectos sobre la adhesión leucocitaria, actividad procoagulante e influir sobre la vasculatura, el TNF α puede llegar a tener repercusiones a gran escala en el organismo, como shock séptico y coagulación intravascular diseminada.

En AR, la sobreexpresión de TNF α e IL-1 dirigirían tanto el proceso inflamatorio sistémico como el daño sinovial (8).

GENÉTICA DEL TNF

El gen que codifica el TNF α está ubicado en la región MHC clase III del brazo corto del cromosoma 6, entre los loci HLA-B (región MHC clase I) y HLA-DR (MHC clase II). El locus del TNF posee una variedad de sitios polimórficos en la región codificante y en su vecindad (Figura 1). Se describen dos tipos de polimorfismos. El primer tipo corresponde a Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP), los que consisten en cambios de un nucleótido que puede detectarse en cualquier lugar del DNA, ya sea en las secuencias regulatorias en el extremo 5' (promotor) o después de la región codificante (región no transcrita del extremo 3'[UTR]). El segundo tipo de polimorfismo es el DNA microsatélite, distribuido ampliamente en todos los cromosomas. Consisten en secuencias repetitivas de DNA (C y T), no transcritas, de longitud variable, ubicadas en regiones no codificantes. Si bien estas secuencias

no se transcriben a RNA mensajeros, su presencia puede alterar el plegamiento del DNA, afectando su unión a proteínas y enzimas y, consecuentemente, su transcripción. Se ha descrito la presencia de microsatélites a nivel del TNF α , TNF β , TNF γ , etc. (6, 9).

El gen del TNF α está regulado a distintos niveles, es decir, transcripcional, post-transcripcional, translacional y post-translacional. La regulación transcripcional del gen es mediada vía promotor 5'. SNP se han descrito en promotores de varias posiciones: -1031 (sustitución Tiamina [T] a Citosina [C]), -863, -857 (sustituciones C a adenina [A]), -574, -376, -308, -238, -163 (todas, sustituciones guanina [G] a [A] y +70 [inserción C]). Todos ellos están relacionados al sitio de inicio de la transcripción. El rol funcional de estos SNP ha sido estudiado y han mostrado poseer influencias individuales respecto a condiciones estimulatorias (9).

Algunos de estos polimorfismos se han relacionado a mayores frecuencias o mayor severidad en distintas patologías. Por ejemplo, se ha descrito un significativo incremento del polimorfismo -238 A en pacientes con psoriasis juvenil y artritis psoriática. Fabris *et al.* determinaron una estrecha relación entre el polimorfismo -238 G/G y una mayor severidad de AR. El alelo poco común +489 A está significativamente aumentado en pacientes granulomatosos (inmunodeficientes), independientemente del HLA. Por otro lado, se ha observado que este alelo estaría significativamente disminuido en pacientes AR, dándole a éste un rol protector frente a la enfermedad (10, 11).

En AR, las asociaciones entre polimorfismos y frecuencia o severidad de las manifestaciones aún es motivo de controversias. Uno de los primeros y más estudiados es el polimorfismo del promotor del gen en posición -308, el que da origen a dos alelos, G/G o TNF1 y G/A o TNF2 (Figura 2). El alelo poco común TNF2 está fuertemente asociado a los haplotipos HLA-A1-B8-DR-DQ2. Aunque se ha observado una frecuencia del alelo TNF2 más elevada en pacientes con AR que en grupos controles, muchos reportes no han podido confirmar una mayor relación entre este polimorfismo y una mayor susceptibilidad a AR. El grupo de Kroeger *et al.* determinó una mayor tasa de transcripción de TNF α en los individuos portadores del alelo TNF2 comparados con el TNF1 en distintos tipos celulares (11,12). Respecto a la relación entre el polimorfismo de esta región y la severidad de la AR, los resultados también han sido contradictorios. Cvetkovic encontró una relación significativa entre el alelo TNF 2 y una AR de curso más severo (12). Los grupos de Brinckman, de Lacki, de Yen y últimamente el grupo de Barton, han fracasado en demostrar una relación positiva entre este polimorfismo y una mayor severidad clínica o radiológica de la AR (1, 14-16).

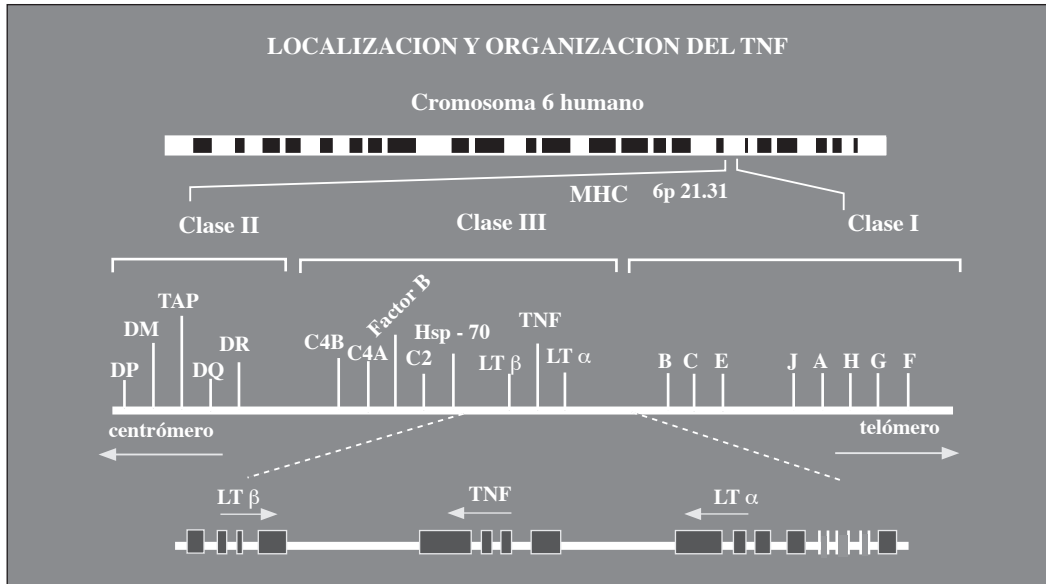


Figura 1. Localización del gen del TNF α en el genoma humano.

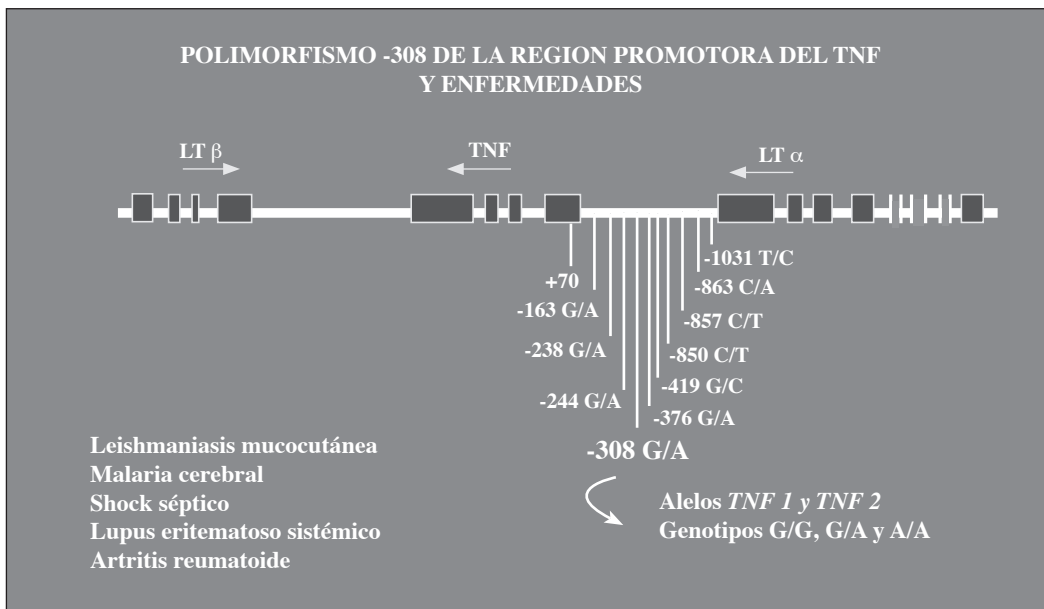


Figura 2. Localización de los distintos polimorfismos SNP en la región promotora del gen del TNF α .

EXPERIENCIA DE NUESTRO GRUPO

De todos los polimorfismos descritos, nuestro grupo se ha concentrado en el estudio del polimorfismo -308 del promotor del gen del TNF α .

En población chilena se ha estudiado la prevalencia de los distintos alelos para el polimorfismo -308 del promotor del TNF α . El genotipo G/G se presenta con una

frecuencia de 83,1%, el genotipo G/A, en un 16,3% y A/A, en un 0,6%. En cuanto a la frecuencia del alelo TNF 2 (G/A), nuestras estadísticas nos asemejan a los franceses, españoles y africanos, pero con estos grupos diferimos en presentar una mucho menor frecuencia del alelo A/A. En este último aspecto, nuestra población es semejante a la población china y japonesa (17).

Al comparar las frecuencias del alelo TNF 2 en población con AR y controles sanos, se observa que este alelo es dos veces más frecuente en pacientes con AR (22% vs 10%). Sin embargo, funcionalmente esta diferencia no se traduce en mayores niveles séricos de TNF α espontáneos medidos en los pacientes con AR o en condiciones experimentales de sobreestimulación a través de lipopolisacáridos (LPS) en células *in vitro*, al comparar los distintos alelos. Por otro lado, aunque los pacientes con AR muestran concentraciones mucho mayores de TNF α que los controles sanos, no existen diferencias de citotoxicidad de esta citoquina relacionadas al polimorfismo -308. Los resultados de este análisis coinciden con reportes de la literatura, tanto en términos de producción de TNF α como de funcionalidad de éste (18).

Al analizar la posible influencia del polimorfismo -308 del promotor del gen del TNF α en la respuesta a una terapia con anticuerpo monoclonal anti-TNF α en pacientes con AR, se observa que, si bien ambos grupos estudiados (G/G vs G/A) presentan una significativa mejoría en todas las variables medidas acompañada de aumento en los niveles de TNF α circulantes, sólo el grupo TNF 2 muestra una correlación estadísticamente significativa entre respuesta ACR 50 y el incremento en los niveles de TNF α . Al analizar subgrupos de pacientes se encontró que aquellos que no elevaron significativamente los niveles de TNF α presentaron una menor respuesta clínica frente al tratamiento. Lo anterior permitiría postular que la ausencia de incremento de niveles circulantes de TNF α luego de terapia anti-TNF α puede definir un grupo de pacientes menos respondedor. Respecto al análisis de grupos alélicos, los resultados de nuestro estudio difieren de los hallazgos de Mugnier *et al.*, quienes encuentran una correlación de mejor respuesta en el criterio clínico DAS 28 a la misma terapia anti-TNF α para el alelo G/G. Sin embargo, ambos estudios difieren tanto en número de pacientes estudiados como en los parámetros clínicos utilizados (19, 20).

Para continuar en la línea de investigación de influencias de los polimorfismos del gen del TNF α y el grado de respuesta a otra terapia anti-TNF α , nuestro grupo está desarrollando un estudio con un mayor número de pacientes que incorpora varios centros, lo que permitirá aumentar su representatividad (FONDECYT N° 1040439).

Considerando las diferencias étnicas y genéticas de las distintas poblaciones estudiadas, todos los esfuerzos realizados, y aquellos que se desarrollen en el futuro, en pro de poder identificar factores de mayor severidad de la enfermedad o de mejor respuesta clínica frente a terapias biológicas, representan una útil herramienta para optimizar recursos y buscar alternativas de tratamiento diferenciadas según las realidades locales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Brinkman B, Huizinga T, Kurban S, Van der Velde E, Schreuder G, et al. Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms in the Rheumatoid Arthritis: Association with Susceptibility to, or Severity of, Disease? *Br J Rheumatol* 1997; 36:516-521.
2. Weyand C y Goronzy J. The Molecular Basis of Rheumatoid Arthritis. *J Mol Med* 1997; 75:772-85.
3. Feldman M. Pathogenesis of Arthritis: Recent Research Progress. *Nat Immunol* 2001; 2:771-3.
4. Lipsky P, Van der Heide, St Clair W, Furst D, Breedveld F, et al. Infliximab and Methotrexate in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343:1594-602.
5. Moreland L, Baumgartner S, Schiff M, Tindall E, Fleischmann R, et al. Treatment of Rheumatoid Arthritis with a Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Receptor (p75)-Fc Fusion Protein. *N Engl J Med* 1997; 337:141-7.
6. Aguillon JC, Cruzat A, Cuenca J, Cuchacovich M. Tumor Necrosis factor Alpha Genetic Polymorphism as a Risk factor in Disease. *Rev Méd Chile* 2002; 130:1043-50.
7. Abbas L. Citokines. En: Abbas L, Lichtman A, Pober J. Cellular and Molecular Immunology, fourth edition, Mc Graw-Hill 2000;196-235.
8. Brennan F, Maini R, Feldman M. TNF α : a pivotal role in Rheumatoid Arthritis. *Br J Rheumatol* 1992; 31:293-8.
9. Waldron-Lynch F, Adams C, Amos C, Zhu DK, Mc Dermott MF, et al. Tumor Necrosis factor 5- Promoter Single Nucleotide Polymorphism Influence Susceptibility to Rheumatoid Arthritis (RA) in Immunogenetically Defined Multiplex RA Families. *Genes and Immunity* 2001; 2:82-87.
10. Fabris M, Di Poli E, D-Elia A, Damante G, Sinigaglia L, et al. Tumor Necrosis Factor- Gene Polymorphism in Severe and Mild-moderate Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatology* 2002; 29:29-33.
11. Verweij C. Tumor necrosis factor gene Polymorphism as Severity Markers in Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 (suppl 1):120-126.
12. Kroeger K, Carville K, Abraham L. The -308 Tumor Necrosis Factor α Promoter Polymorphism Effects Transcription. *Mol Immunol* 1997; 34:391-9.
13. Cvetovic J, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Kantapaa-Dahlqvist S, Lefvert AK. Susceptibility for and Clinical Manifestations of Rheumatoid Arthritis are Associated with Polymorphism of the TNF α , IL-1, and IL-1Ra Genes. *J Rheumatol* 2002; 29:212-9.
14. Lacki JK, Moser R, Korczwska I, Mackiewicz S, Muller W. TNF α gene Polymorphism does not Affect the Clinical and Radiological Outcome of Rheumatoid Arthritis. *Rheumatol Int* 2000; 19:137-40.
15. Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, Lin CH, Ou TT, et al. Tumor necrosis factor Promoter Polymorphism in Patients with Rheumatoid Arthritis in Taiwan. *J Rheumatol* 2001; 28:1788-9.
16. Barton A, Platt H, Salway F, Symmons D, Barrett E, et al. Polymorphism in the Tumour necrosis factor gene are not associated with severity of inflammatory Polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:280-284.
17. Cuenca J, Perez C, Aguirre A, Schiattino I, Aguillon JC. Genetic Polymorphism at Position -308 of the Tumor Necrosis Factor (TNF): Implications of its allelic distribution and Susceptibility or Resistance to diseases in the Chilean Population. *Biol Research* 2001; 34:237-41.
18. Cuenca J, Cuchacovich M, Perez C, Ferreira L, Aguirre A, Schiattino I, Soto L, et al. The -308 Polymorphism in the Tumour Necrosis factor (TNF) gene Promoter Region and ex vivo Lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology* 2003; 42:308-313.
19. Cuchacovich M, Ferreira L, Soto L, Aliste M, Gatica H, et al. TNF α levels and Influence of -308 TNF α Promoter Polymorphism on the Responsiveness to Infliximab in patients with Rheumatoid Arthritis. *Scand J Rheumatol* 2004 (en prensa).
20. Mugnier B, Balandraud N, Darque A, Roudier C, Roudier J, Revron D. Polymorphism at Position -308 of the Tumour Necrosis factor α Gene Influences Outcome of the Infliximab Therapy in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1849-52.