

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología¹.
Servio Nacional de Reumatología. Hospital Clínico Quirúrgico de 10 de Octubre².

Caracterización de Moléculas HLA tipo II y evaluación de citocinas en pacientes cubanos con Artritis Reumatoide.

Autores:

- M. C. Domínguez¹: Licenciada en Bioquímica, investigadora agregada, profesora titular.
N. Lorenzo¹: Licenciada en Microbiología, aspirante a investigador.
A. Barbera¹: Licenciada en Bioquímica, aspirante a investigador.
M. V. Hernández²: Doctora en Medicina, Especialista en Inmunología.
A.M. Torres²: Doctora en Medicina, Especialista en Inmunología.
M. Nazabal¹: Licenciado en Bioquímica, investigador auxiliar.
H. Camacho¹: Licenciado en Bioquímica, investigador agregado.
I. Hernández²: Dra. En Medicina. Especialista en Reumatología.
Neisy Ortiz²: Ingeniera Química
V. Morera¹: Dra en Ciencias, Investigador Titular, Prof. Titular.
G. Padrón¹: Dr. en Ciencias, Investigador Titular, Prof. Titular.

Resumen

La Artritis Reumatoide es una enfermedad de etiología multifactorial, que involucra la presencia de factores genéticos, ambientales, inmunológicos y hormonales. En los últimos años se ha establecido una asociación entre la predisposición a padecer esta enfermedad y la existencia de determinados haplotipos del HLA clase II. El objetivo fundamental de este trabajo es la caracterización del polimorfismo de las moléculas HLA-DQB1 y HLA-DRB de un grupo de pacientes cubanos con Artritis Reumatoide, además analizar una posible correlación entre los niveles de varias citocinas proinflamatorias en un grupo de estos pacientes, con los alelos HLA tipo II genotipados, el sexo y el tiempo de diagnosticada la enfermedad. El estudio se llevo a cabo en 50 pacientes cubanos con el diagnóstico de Artritis Reumatoide y un grupo control, compuesto de 211 donantes sanos. Los haplotipos HLA-DQ y HLA-DRB1 fueron determinados a través de la reacción en cadena de la polimerasa. La cuantificación de las citocinas se realizó empleando inmuno-ensayos comerciales. Los resultados obtenidos en este análisis indican que los alelos con un radio de la razón de probabilidades superior a 2 fueron para el caso de la molécula HLA-DQB1: HLA-DQB1*03 y *06, y para la molécula HLA-DRB1 los alelos: *01, *04, *09 y *10. Encontramos además que los niveles de la citocina interferon ganma están significativamente aumentados en los pacientes con menos tiempo de diagnosticada la enfermedad. Este trabajo constituye el primer reporte de caracterización de las moléculas HLA tipo II, a través de técnicas moleculares, en pacientes cubanos con Artritis Reumatoide.

Artritis Reumatoide; HLA-DQ; HLA-DR; IFN γ .

Introducción

La Artritis Reumatoide (AR), es una de las enfermedades autoinmunes de más alta incidencia en la población mundial, con un índice mujer/hombre de 3:1¹. Es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones, debido a la infiltración

de células T activadas en la membrana sinovial, lo cual conduce a la destrucción progresiva del cartílago y el hueso.

La causa de la AR es desconocida. Se conoce que es una enfermedad de etiología multifactorial, que involucra la presencia de factores genéticos, ambientales, inmunológicos y hormonales.

Estudios recientes demuestran que la AR tiene una mayor incidencia en pacientes con una especial predisposición genética, sin embargo no se puede calificar como una enfermedad hereditaria. Existen ciertos genes que tienen un papel en el sistema inmune, como los que codifican para las moléculas HLA, que se asocian con una tendencia a desarrollar la AR. Algunas personas que desarrollan la enfermedad no presentan los genes que determinan la susceptibilidad a padecerla, y otras personas que tienen los genes nunca desarrollan la patología. Esto ha sugerido que el fondo genético de cada persona es importante pero no es determinante².

El componente genético que más se ha relacionado a esta patología se encuentra asociado a motivos específicos presentes en las moléculas del HLA-DR (DR1, DR4 y DR10), llamados epítopes compartidos y que se localizan en la tercera región hipervariable codificada por estos alelos. De esta región se destaca la secuencia QKRAA por su potente acción inmunogénica, que además está involucrada en fenómenos de mímica molecular.^{3,4}

Por otra parte, se ha encontrado que ciertos alelos del HLA-DRB1 poseen un efecto protector dominante frente a la aparición de la AR, los mismos tienen en común el motivo DERRAA. La protección podría estar dada por la presentación de péptidos derivados del HLA-DRB1, en el contexto del HLA-DQ, a células T con un fenotipo regulador. Además, se ha podido comprobar que el proceso de presentación de estos motivos ocurre por los mecanismos convencionales mediados por las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen Presenting Cells*)⁵.

Otros genes fuera del MHC que contribuyen al desarrollo de la AR son los que codifican para citocinas, hormonas y moléculas de membrana que participan en la respuesta inmune patológica.

En situaciones normales existe un equilibrio entre las citocinas inflamatorias como: el factor de crecimiento tumoral alfa (TNF- α , del inglés, *tumor necrosis factor*), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 15 (IL-15), interleucina 16 (IL-16), interleucina 17 (IL-17), interleucina 18 (IL-18) y el interferón gamma (IFN γ), y las anti-inflamatorias como: la interleucina 4 (IL-4), interleucina 11 (IL-11), interleucina 13 (IL-13) y antagonistas de IL-1 o TNF α . En la AR sin embargo este equilibrio se mueve a favor de las citocinas inflamatorias⁶.

Estos genes pueden actuar de forma sinérgica o aislada y junto a los del MHC constituyen el denominado componente global génico de la AR⁷.

El objetivo fundamental de este trabajo es la caracterización del polimorfismo de las moléculas HLA-DQB1 y HLA-DRB de un grupo de pacientes cubanos aquejados de AR. Analizamos además una posible correlación entre los niveles de varias citocinas

proinflamatorias en un grupo de estos pacientes, con los alelos HLA tipo II genotipados, el sexo y el tiempo de diagnosticada la enfermedad.

Materiales y Métodos

Realizamos este estudio en 50 pacientes cubanos con el diagnóstico de AR, de acuerdo con los criterios diagnósticos del Colegio Americano de Reumatología (ACR), atendidos en el Servicio Nacional de Reumatología. Los pacientes una vez informados de los objetivos del trabajo, dieron su consentimiento para la participación en el mismo.

La determinación de los alelos HLA tipo II, se realizó de acuerdo a las recomendaciones del kit comercial de la firma Dynal. El ADN fue extraído de la sangre de los pacientes usando el paquete comercial para la purificación de ADN de la firma Promega (Promega Corp., USA). Los haplotipos HLA-DQ y HLA-DRB1 fueron determinados a través de la reacción en cadena de la polimerasa (RELI SSO HLA DQ and DRB test; Dynal, Merseyside, UK), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Nosotros comparamos la frecuencia de alelos presente en los pacientes con un grupo control, compuesto de 211 donantes sanos, de ambos sexos, de diferentes regiones de Cuba, principalmente de Ciudad Habana.

En este estudio se cuantificó en 13 pacientes los niveles de las citocinas: interleucina 2 (IL-2), TNF α e IFN γ , para ello la sangre proveniente de los pacientes se diluyó 1:2 en PBS 1X y se añadió 5 mL de esta dilución a 3 mL de Ficoll-Paque (Amershan) en tubos de centrifugación de 15 mL. Los leucocitos se centrifugaron a 1200 rpm durante 30 minutos y se obtuvo el anillo de células mononucleares (2 mL aproximadamente). Las células se colectaron y se lavaron dos veces con PBS 1X. Seguidamente el precipitado celular se resuspendió en medio RPMI 1640 conteniendo 10 % de suero fetal bovino y suplementado con gentamicina (100U/mL), HEPES 25 mM/L y L-glutamina 2mM (todos adquiridos de Gibco BRL). El número de células se contaron en una cámara de Neubauer a partir de una disolución 1/20 en RPMI y 1/2 con tripán azul (Boehringer Mannheim, Alemania)

Las células mononucleares fueron cultivadas durante 3 horas e incubadas a 37°C, en atmósfera húmeda de CO $_2$ al 5%. Al término de esta incubación, se colectaron los sobrenadantes de cultivo en tubos eppendorf de 0.5 mL y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se extrajo el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su posterior empleo en la cuantificación de citocinas.

Los niveles de las citocinas en los sobrenadantes de cultivo se determinaron mediante un ensayo tipo ELISA (Quantikine® R&D Systems, EEUU) específico para cada una, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. La determinación de la concentración de cada citocina fue realizada por triplicado en cada uno de los pacientes. El límite de detección para el TNF- α fue de 4.4 pg/mL, para la IL-10 de 3.9 pg/mL y para el IFN γ de 8 pg/ml.

Para determinar las diferencias significativamente estadísticas entre los niveles de expresión de las citocinas en los pacientes se empleó el programa estadístico Sigma Stat

versión N°2 (GraphPad Software, Inc) y las pruebas estadísticas utilizadas fueron la de Kruskal-Wallis y la de Student-Newman-Keuls.

Resultados

Nosotros caracterizamos los alelos HLA-DQB1 y HLA-DRB presentes en todos los pacientes sin ninguna ambigüedad, para el nivel de los dos primeros dígitos en la nomenclatura de estas moléculas. Sin embargo, en el nivel de los cuatro dígitos, caracterizamos estos mismos alelos con la misma propiedad, para el 82% de los pacientes.

Las frecuencias absolutas y relativas para los alelos HLA-DRB se representan en la tabla 1, así como los radios de la razón de probabilidades (OR) estimados. En la tabla 2, se muestran estos mismos datos para la molécula HLA-DQB1.

Nosotros encontramos que los alelos con un OR superior a 2 fueron: HLA-DQB1*03 y *06, y HLA-DRB1*01, *04, *09 y *10.

Otros genes que pueden actuar de forma sinérgica con los del MHC, son los genes que codifican para las citocinas proinflamatorias como IL-2, TNF alfa y IFN γ , las cuales tienen un rol muy importante en la patogenia de la enfermedad.

En este estudio, nosotros también analizamos una posible correlación entre los niveles de estas tres citocinas, las moléculas HLA-DQ y HLA-DR que expresan los pacientes, así como con el sexo y el tiempo de diagnosticada la enfermedad. Este análisis lo realizamos empleando una N de 13 pacientes, ya que para nuestras condiciones resulta muy costoso la medición de las citocinas a través de estos kits comerciales, sin embargo estos métodos permiten realizar una cuantificación muy exacta de los niveles de estas moléculas en cada paciente. En el momento de tomar las muestras de sangre a los pacientes, estos se encontraban hospitalizados en el Servicio Nacional de Reumatología, en todos los casos las muestras se tomaron alrededor de las 9 de la mañana, con el objetivo de homogenizar las fluctuaciones que pueden tener la expresión de las citocinas en el organismo humano.

En la tabla 3 se muestran las características de los pacientes en cuanto a: moléculas HLA tipo II estudiadas, sexo y tiempo de diagnosticada la enfermedad.

Nosotros no encontramos ninguna correlación entre los parámetros analizados y los niveles de expresión de las citocinas TNF- α e IL-2 en los pacientes (resultados no mostrados). Sin embargo, como se muestra en la figura 1, encontramos un aumento significativo en los niveles de expresión de la citocina IFN γ en los pacientes: P4, P11 y P16, estos pacientes son los que presentan un tiempo menor de evolución de la enfermedad.

Discusión

En los últimos años se ha establecido una asociación entre la predisposición a padecer la AR y la existencia de determinados haplotipos del HLA clase II, pues muchos de los pacientes con AR poseen alguno de estos alelos. La correlación no es definitiva, pues algunas personas que no presentan dichos genes desarrollan la enfermedad y viceversa, lo cual sugiere que el factor genético es importante pero no determina la aparición de la AR [8].

El componente genético que más se ha relacionado a esta patología se encuentra asociado a motivos específicos presentes en las moléculas del HLA-DR (DR1, DR4 y DR10), llamados epítopes compartidos. Existe una hipótesis, basada en observaciones epidemiológicas, que plantea que la predisposición genética se incrementa con la combinación de determinados alelos HLA-DQ en asociación con alelos HLA-DR, pues los péptidos que se obtienen a partir de estos últimos serían presentados en el contexto de las moléculas del locus HLA-DQ⁸.

Nosotros en este trabajo nos planteamos la caracterización de las moléculas HLA-DQB1 y HLA-DRB en un grupo de pacientes cubanos con AR, con el objetivo de comprobar si en la población cubana determinados alelos de estas moléculas, se pueden asociar con el desarrollo de la AR. Además es objetivo principal de nuestro proyecto de investigación el desarrollo de terapias para la AR de tipo antígeno específicas, como es conocido en la aplicación de estas estrategias terapéuticas, cada vez se hace más común a nivel mundial la terapia personalizada, producto de las diferencias genéticas existentes entre los pacientes y que conllevan a la heterogeneidad de la respuesta desarrollada por los mismos frente a determinados agentes terapéuticos, por lo que genotipar las moléculas HLA tipo II en un grupo de pacientes cubanos, dispuestos a participar en futuros ensayos clínicos, constituye un paso importante en nuestras investigaciones.

La caracterización de los alelos HLA-DQB1 y HLA-DRB pudimos realizarla sin ninguna ambigüedad para los dos primeros dígitos en la nomenclatura de estas moléculas, en todos los pacientes. Sin embargo para el nivel de los cuatro dígitos, caracterizamos estos mismos alelos con la misma propiedad, para el 82% de los pacientes. Estos resultados están en total correspondencia con las potencialidades que brindan los *kit* comerciales de la Firma Dynal, que utilizamos en este trabajo

En este estudio nosotros consideramos como un indicador importante el parámetro OR (del inglés *Odds Ratio*). En estadística el término *Odds* (término en inglés de traducción discutida, que se ha traducido como: *razón de posibilidades, razón de ventajas, razón de oportunidades, razón de momios, razón de probabilidades*), es la razón entre la probabilidad de que un evento suceda y la probabilidad de que no suceda. El OR es una medida epidemiológica utilizada en los estudios de casos-controles y en los meta-análisis.

Este indicador representa el cociente entre la *Odds* de exposición observada en el grupo estudiado (en nuestro caso, pacientes con AR) y la *Odds* en el grupo control. En este tipo de estudio un ratio de desigualdades superior a 2, es indicativo que el grupo poblacional que presenta este alelo tiene mayor predisposición a padecer la enfermedad.

Hemos encontrado como se muestra en las tablas 2 y 3 que los alelos con un OR superior a 2 fueron para el caso de la molécula HLA-DQB1: HLA-DQB1*03 y *06, y para la molécula HLA-DRB1 los alelos: *01, *04, *09 y *10. Estos resultados están en concordancia con los encontrados en estudios similares realizados en otras poblaciones^{9,10,11}.

Como se muestra en la tabla 2, no encontramos la presencia del alelo DRB1*12 en los pacientes analizados, esto puede ser debido al tamaño de la N empleada, por lo que nos

proponemos en estudios futuros aumentar el número de pacientes a 75 ó 100, con el objetivo de tener mas probabilidad de detectar este alelo.

Otros genes fuera del MHC que contribuyen al desarrollo de la AR son los que codifican para citocinas, hormonas y moléculas de membrana que participan en la respuesta inmune patológica. Estos genes pueden actuar de forma sinérgica o aislada y junto a los del MHC constituyen el denominado componente global génico de la AR⁷.

Nosotros en este trabajo analizamos además una posible correlación entre los niveles de las citocinas proinflamatorias: TNF- α , IL-2 e IFN γ en un grupo de estos pacientes, con los alelos HLA tipo II, el sexo y el tiempo de diagnosticada la enfermedad. Como resultados de este análisis, solamente encontramos correlación entre los niveles de la citocina IFN γ y el tiempo de evolución de la enfermedad. Significativamente, nosotros encontramos que los pacientes con menos tiempo de diagnosticada la enfermedad (pacientes: P4, P11 y P16) presentan los mayores niveles de expresión del IFN γ (figura1).

Aunque estas correlaciones se llevaron a cabo en un grupo reducido de pacientes, los resultados obtenidos están en correspondencia con el papel del IFN γ en la patogenia de la AR. Como es conocido probablemente el reconocimiento de un antígeno exógeno o autoantígeno sea el detonante de una serie de eventos que culminan con la destrucción articular en pacientes con AR. Este fenómeno desencadena la activación de los linfocitos T CD4⁺ lo que conjuntamente con la estimulación de diferentes citocinas, induce a su diferenciación a células Th1 (del inglés *T helper 1*) con la consecuente liberación de citocinas proinflamatorias como: IL-2 e IFN γ ¹². La acción de estas citocinas sobre los macrófagos provoca la producción de cantidades elevadas de TNF α y de IL-1. Estos a su vez ejercen una serie de acciones en el ámbito local y sistémico tales como regular la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales como: la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1) y el antígeno asociado a la función leucocitaria tipo 1 (LFA-1), las que favorecen el reclutamiento de otras células al sitio de la inflamación. Además estimulan a los macrófagos, fibroblastos, condrocitos y osteoclastos a la liberación de otros mediadores de la inflamación, como la IL-15 y la interleucina 8 (IL-8). El TNF α y la IL-1 estimulan la proliferación de la membrana sinovial que conlleva a la formación del *pannus*, pueden inducir la diferenciación de linfocitos B a células productoras de anticuerpos, que potencialmente también participan en la destrucción articular. Además inhiben la producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10) producidas por las células Th2 (del inglés *T helper 2*) y estimulan a los hepatocitos para liberar IL-6. La IL-6 a su vez favorece la producción de las proteínas de la fase aguda, las cuales participan potenciando la respuesta inmune¹³.

Nosotros nos proponemos en trabajos futuros, cuantificar estas citocinas en un número mayor de pacientes e incluir la evaluación de la IL-1, por su importante rol en el desarrollo la AR.

Este trabajo constituye el primer reporte de caracterización de las moléculas HLA tipo II, a través de técnicas moleculares, en pacientes cubanos aquejados de AR, permitiendo conocer de forma preliminar los alelos de las moléculas HLA-DQB1 y HLA-DRB presenten en la población cubana, que pudieran predisponer al padecimiento de la AR.

Bibliografía.

1. Graciela S. Avances en la patogenia y el tratamiento de la artritis reumatoide. *Revista Mexicana Reumatología* 2001; 16: 227-235.
2. Zanelli E, Breedveld FC, de Vries R. HLA Class II Association with Rheumatoid Arthritis. *Facts and Interpretations. Human Immunology* 2000; 61:1254-61.
3. Brown MA, Wordsworth BP. Genetic studies of common rheumatologic diseases. *Br J Rheumatol.* 1998. 37: 818-822.
4. Holmdahl R. Association of MHC and rheumatoid arthritis. Why is rheumatoid arthritis associated with the MHC genetic region? An introduction. *Arthritis Res* 2000; 2: 203-4.
5. Zanelli E, Breedveld FC, de vries RR. HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? *Rheumatology* 2000; 39: 1060-1066.
6. Arend, W.P. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum.* 2001; 30 (2):1-6.
7. Cantagrel A, Navaux F, Loubel-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abba M et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1093-1100.
8. Gabriel SE. The epidemiology of RA in Rochester, Minnesota. *Arthritis Rheumatoid* 1999; 42:415-20.
9. Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD and M Arcos-Burgos. Rheumatoid arthritis association in Colombian population is restricted to HLA-DRB1*04 QRRRA. *Genes and Immunity.* 2002; 3: 56-58
10. Carcassi C, Passiu G, Sanna G, Cauli A, Alba F, Mathieu A, Contu L. HLA-DRB1*01 and DRB1*04 alleles in Sardinian rheumatoid arthritis patients *Tissue Antigens.* 1999; 53: 97-100.
11. S. Lai, T.-G. Kim H.-B. Choi S.-H. Park H.-Y. Kim H. Han. DQCAR 113 and DQCAR 115 in combination with HLA-DRB1 alleles are significant markers of susceptibility to rheumatoid arthritis in the Korean population. *Tissue Antigens* 1999; 54: 552-559.
12. Simon A.J. Terapia biológica en artritis reumatoide. *Revista de Investigación Clínica* 2001; 53(5):452-459.
13. Forre, O. New possibilities of treatment in AR. *Scand J Rheumatol* 2000; 29 (2):73-84.

Anexos**Tabla 1.**

Características de los pacientes estudiados.

Pacientes	genotipo		Tipo de evolución	sexo
	DQB1	DRB1		
P4	0.303/ 0602, 0611, 0616	0.915	3	F
P5	0.302,0307/ 0603, 0614	0.411	12	F
P6	0.301,0309,0313/0501	0.108	25	F
P7	0.302,0307/ 0302,0307	0.404	19	F
P8	0.302,0307/0302,0307	0.409	12	F
P9	0.501/0603,0614	1313	12	F
P10	0.201,0202/0402	0.308	8	F
P11	0.501/0602,0611,0616	0.115	1	F
P12	0.301,0309,0313/ 0302,0307	0.411	8	F
P16	0.301,0309,0313/ 0603,0614	1113	1	M
P17	0.501/0501	1010	4	F
P18	0.301,0309,0313/0302,0307	1111	30	M

Tabla 2.

Estimación de la frecuencia absoluta, relativa y OR para los alelos DRB1

Alelos DRB1	Controles		Pacientes		OR	
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa		
O1	26	0.071	13	0.144	2.179	*
O3	45	0.123	8	0.089	0.688	
O4	23	0.063	11	0.122	2.051	
O7	49	0.134	4	0.044	0.297	
O8	22	0.06	3	0.033	0.533	
O9	8	0.022	5	0.056	2.602	*
O10	11	0.03	2	0.022	0.725	
O11	47	0.128	13	0.144	1.131	
O12	14	0.038	0	0	0	
O13	63	0.172	11	0.122	0.661	
O14	3	0.008	6	0.067	8.541	****
O15	51	0.139	13	0.144	1.029	
O16	4	0.011	2	0.022	2.034	*
Total	366		91			

Tabla 3.

Estimación de la frecuencia absoluta, relativa y OR para los alelos DQB1

Alelos DB1	Controles		Pacientes		OR	
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa		
,0201,0202	107	0.309	14	0.161	0.428	
,050101,050102	67	0.194	15	0.172	0.868	
,030101, 030102, 0309, 0313	76	0.22	13	0.149	0.624	
,0302, 0307	8	0.023	15	0.172	8.802	***
,0402	23	0.066	4	0.046	0.677	
,0602, 061101, 0616	8	0.023	10	0.115	5.487	**
0,60401, 060402	9	0.026	3	0.034	1.337	
0,30302 , 030303	8	0.023	1	0.011	0.491	
0603, 0614	8	0.023	5	0.057	2.576	*
,0203	8	0.023	3	0.034	1.509	
0502, 050201	8	0.023	2	0.023	0.994	
,050301	8	0.023	1	0.011	0.491	
060101, 060102, 060103	8	0.023	1	0.011	0.491	
Total	346		87			

Figura 1.

Niveles de IFN γ cuantificado en los pacientes. Letras diferentes representan diferencia significativa.

