

Asociación del polimorfismo rs2372536 del gen ATIC con la respuesta al tratamiento con Metotrexato en pacientes con Artritis Reumatoide

GARCÍA-MAGALLANES, Noemi †*, BOJORQUEZ-SANCHEZ, Carolina, GALARZA-ROBLES, Lucila y ROMO-MARTINEZ, Enrique

Universidad Politécnica de Sinaloa. Carretera Municipal Libre Mazatlán Higuera Km 3, 82199 Mazatlán, Sinaloa

Recibido Septiembre 13, 2017; Aceptado Diciembre 20, 2017

Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T, se caracteriza por una inflamación crónica de las articulaciones. La AR afecta aproximadamente al 1% de la población mundial, al 1.6 % de la población mexicana y su prevalencia en Sinaloa es de 1.8 %. En la actualidad no existe cura para la AR, pero el fármaco más utilizado es el Metotrexato y su principal efecto farmacológico es ser antagonista del folato. En el presente estudio se genotipificó el polimorfismo rs2372536 del gen ATIC y se relacionó con la respuesta al tratamiento con Metotrexato en pacientes con AR del estado de Sinaloa. Se realizó un estudio analítico, transversal, retrospectivo y comparativo, se analizaron 75 muestras de pacientes con artritis reumatoide diagnosticados de acuerdo con los criterios del ACR de 1987 o 2010 que completaron el cuestionario, captados en el periodo de marzo de 2015 a junio de 2016. El SNP fue genotipificado utilizando el sistema de sondas Taqman® y se analizaron llevando a cabo la PCR. En el presente estudio no se encontró asociación entre polimorfismo del gen ATIC 347 (C>G) y la respuesta a MTX (p=0.716). Este es el primer trabajo realizado con este gen en pacientes con AR en el estado de Sinaloa

rs2372536, Sinaloa, Artritis reumatoide, Metotrexato.

Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) it's a T Lymphocytes mediated autoimmune disease, characterized by a chronic joint inflammation. RA affects approximately 1 % of the world's population, 1.6% of Mexican population and it's prevalence in Sinaloa is 1.8%. There is no cure for RA right now, however methotrexate (MTX) it's the most used drug in Mexico, witch main pharmacological effect it's the folate antagonism. The present study genotype the ATIC gene rs2372536 polymorphism and related with the methotrexate treatment response in patients with RA in Sinaloa State. We perform an analytical, transversal, retrospective and comparative study, 75 samples of RA diagnose patients according to the ACR 1987 or 2010 criteria who fulfill the questionnaire, gather in the period of March 2015 to June 2016. The SNO was genotype using the Taqman ® probe system and analyzed in the Step One plus Real Time PCR equipment (Applied Biosystems). No association was found in this study between the 347 C>G ATIC polymorphism and the MTX treatment (p=0.716). This is the first study perform in patients with RA and this gene in the Sinaloa State.

rs2372536, Sinaloa, Rheumatoid Arthritis, Methotrexate

Citación: GARCÍA-MAGALLANES, Noemi, BOJORQUEZ-SANCHEZ, Carolina, GALARZA-ROBLES, Lucila y ROMO-MARTINEZ, Enrique. Asociación del polimorfismo rs2372536 del gen ATIC con la respuesta al tratamiento con Metotrexato en pacientes con Artritis Reumatoide. Revista de Ciencias de la Salud. 2017. 4-13: 22-29.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: ngarcia@upsin.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T, que se caracteriza por una inflamación crónica de las articulaciones. Esta enfermedad se inicia con la inflamación de la membrana sinovial, que con frecuencia lleva a la destrucción erosiva del cartílago adyacente y el hueso, se caracteriza por dolor crónico, mortalidad prematura y presentar un riesgo de invalidez elevado con altos costos para el enfermo y la sociedad (Caballero-Urbe y Pinzon-Cervantes, 2006).

La AR afecta aproximadamente al 1% de la población mundial, al 0.5 % de la población latinoamericana, su prevalencia en México es de 1.6% y en el estado de Sinaloa de 1.8 %; siendo la primera causa de atención en el Servicio de Reumatología en hospitales de segundo nivel (Mendoza-Vazquez y col., 2013).

La AR es de origen multifactorial, de naturaleza autoinmune que involucra factores genéticos, ambientales, inmunológicos y hormonales (Barragan Garfias, 2011). El objetivo del tratamiento en la AR es conseguir una disminución de la actividad inflamatoria suficiente para obtener un alivio sintomático significativo para el paciente, preservar su capacidad funcional para realizar las actividades cotidianas, incluyendo la capacidad laboral, mejorar su calidad de vida, el retraso o detención de la lesión estructural articular, así como la prevención de la morbilidad y la mortalidad.

Generalmente el tratamiento consiste en combinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) y/o glucocorticoides; siendo el Metotrexato (MTX) el de primera elección (Martín Alcalde y col., 2003).

El MTX es el más utilizado por su eficacia y seguridad a largo plazo, su respuesta tiene gran variabilidad entre los pacientes. Esto se atribuye a diferentes factores como el sexo, la edad, la duración de la enfermedad, la PCR, los niveles de factor reumatoide y las variaciones genéticas. Entre ellos, los factores genéticos se consideran de gran importancia y por esto se han estudiado, apoyándose de la farmacogenética para la búsqueda y el análisis de las variaciones genéticas del individuo (polimorfismos) asociados a la eficacia y seguridad terapéutica al tratamiento con MTX (Restrepo y col., 2016). Algunos de los genes implicados en la vía metabólica del ácido fólico que son diana del MTX son: MTHFR, DHFR, ATIC y TS (Moya y col., 2016). Aunque el MTX es el fármaco más utilizado, aproximadamente el 40% de los pacientes no responden a este tratamiento, lo cual se puede deber a mutaciones en genes involucrados en su metabolismo.

El gen ATIC se encuentra en el locus 2q35 y tiene una longitud de 37,818 pb. Este gen codifica para una proteína bifuncional de 591 aminoácidos que cataliza los últimos dos pasos de la ruta biosintética de purinas de novo. Este gen forma parte de la ruta de la adenosina y está involucrada en la liberación extracelular de la adenosina. El MTX inhibe directamente a ATIC con lo que se origina una acumulación de AICAR y de adenosina, una purina anti-inflamatoria (Rego-Perez y col., 2009). Se han estudiado diferentes variantes genéticas de ATIC con el fin de encontrar asociación entre ellas y la toxicidad y/o eficacia del tratamiento con MTX en pacientes con AR.

Se ha reportado evidencia de la asociación de un SNP en el gen ATIC con la respuesta al MTX; el polimorfismo rs2372536 se localiza en el exón 5 del gen, en el nucleótido 347 generando un cambio de una citosina por guanina (347 C>G); el codón ACT codifica una treonina la cual es sustituida por serina en el aminoácido 116 de la proteína ATIC (Thr116Ser). (Moya y col., 2016).

Un tratamiento adecuado y oportuno aumenta la probabilidad de limitar la progresión del daño, por estos motivos es importante entender la AR a nivel molecular por varias razones. En primer lugar, este conocimiento nos provee de nuevos modelos que permitan elucidar diferentes aspectos de la enfermedad. También, permite al médico explicar los síntomas y curso clínico de la enfermedad a pacientes y familiares. Asimismo, tal conocimiento debe producir un manejo de la enfermedad más efectivo mediante la identificación de blancos específicos para el desarrollo de terapias potenciales para AR (Smith & Haynes, 2002)

Justificación

La AR constituye un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta prevalencia, a sus graves consecuencias funcionales y al alto impacto económico y social (Cardiel et al., 2013). Se estima que tiene una prevalencia de alrededor del 1% en el mundo y de 1.6% en México. La población mexicana es afectada en la edad con mayor capacidad productiva y laboral, Un tratamiento adecuado y oportuno aumenta la probabilidad de limitar la progresión del daño articular y, consecuentemente, mejorar la funcionalidad y la calidad de vida del paciente y disminuir el impacto socioeconómico que genera.

Uno de los factores que aumentan el riesgo de incapacidad permanente es el retraso en el tratamiento, ya que el diagnóstico y tratamiento tempranos reducen la destrucción articular y preservan la función, por lo que el contar con marcadores genéticos que permitan la caracterización de los pacientes podría proveer las bases racionales para la elección del tratamiento, lo que conllevaría en el mediano plazo, mejorar la calidad de vida de los pacientes y disminuir los casos de incapacidad permanente.

Hipótesis

El polimorfismo rs2372536 del gen ATIC se encuentra asociado con una buena respuesta al tratamiento con Metotrexato en pacientes con artritis reumatoide del estado de Sinaloa.

Objetivos

Objetivo General

Asociar el polimorfismo rs2372536 del gen ATIC con la respuesta al tratamiento con Metotrexato en pacientes con AR del estado de Sinaloa.

Objetivos específicos

- Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs2372536 del gen ATIC en pacientes con respuesta adecuada al Metotrexato.
- Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs2372536 del gen ATIC en pacientes sin respuesta al Metotrexato
- Correlacionar el SNP presente en el gen ATIC analizado y la respuesta al tratamiento

Materiales y métodos

La metodología del estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biomedicina Molecular de la unidad académica de ingeniería en biotecnología de la Universidad Politécnica de Sinaloa. Las muestras fueron tomadas en el Hospital General de Zona (HGZ) No. 3 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) “Héctor González Guevara” de Mazatlán Sinaloa.

Tipo de estudio

Analítico, transversal, retrospectivo y comparativo.

Obtención de la muestra

Se obtuvieron muestras de sangre con anticoagulante EDTA de pacientes diagnosticados con artritis reumatoide de acuerdo con los criterios del ACR de 1987 o 2010 y cuestionario completo lo cual permitió conocer su esquema de tratamiento captados en el periodo de marzo de 2015 a junio de 2016. A todos los pacientes se les aplicó el DAS28 (Disease Activity Score), y el Spanish HAQ-DI (Spanish Health Assessment Questionnaire Disability Index) para determinar la actividad de la enfermedad. Los pacientes se dividieron en dos grupos de acuerdo a su respuesta al tratamiento.

En todos los casos se siguieron las normas y principios éticos de las instituciones participantes. Todos los sujetos incluidos en el estudio, participaron de forma voluntaria y firmaron la carta de consentimiento informado, de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Genotipificación del polimorfismo rs2372536 en el gen ATIC

A las muestras de sangre obtenidas se realizó la extracción de DNA genómico, utilizando el micrométodo o método de Gustincich y col., (1991). La pureza y concentración de DNA se evaluaron por espectrofotometría, tomando lectura de las absorbancias a 260, 280 y 320 nm. La evaluación de la integridad del material genético se realizó por electroforesis de agarosa al 1.5% con GelRed al 0.15X.

La genotipificación se realizó utilizando el sistema de sondas Taqman® de Applied Biosystem (assay ID: C_16218146_10). en un termociclador en tiempo real StepOnePlus de Applied Biosystem. En todos los casos se incluyeron muestras por duplicado y un control negativo para asegurar que la genotipificación sea correcta.

La reacción de amplificación se llevó a cabo con los siguientes reactivos: 5 µL de Taqman® GTExpress Master Mix (2x), 0.5 µL de Taqman® genotyping assay mix (20x), 2.5 µL de agua estéril o de ampollitas y 2 µL de DNA (25 ng/ µL) en un volumen de 10 µL. La discriminación alelica se realizó utilizando el software TaqMan Genotyper.

Análisis estadístico

La prueba Chi cuadrada para el análisis de correlación de alelos con la variable clínica, se realizó con el programa estadístico IBM SPSS v.20. Para la estimación de riesgo, se usaron los odds ratio (OR) y el intervalo de confianza al 95% de los OR con la herramienta winEpi. Se determinó si existen desviaciones mediante la ley de Hardy-Weinberg. Para realizar el análisis de la población se utilizó estadística descriptiva.

Resultados y discusiones

Características generales del grupo de estudio

Se recolectaron un total de 75 muestras de pacientes con AR durante el periodo de marzo de 2015 a junio de 2016 procedentes del IMSS de Mazatlán, Sinaloa, de las cuales el 92% fueron mujeres y el 8% varones, los resultados obtenidos mostraron una mayor incidencia de la enfermedad en el sexo femenino, lo cual concuerda con lo reportado con anterioridad por Barberá y Domínguez (2004). La proporción mujeres/hombres fue de 11:1.

La edad media obtenida de nuestro grupo de estudio fue de 53.29 ± 13.82 años en un rango de edad que oscila desde los 19 años (edad mínima) hasta los 84 años (edad máxima), concordando con Barragan-Garfias (2011) que indican en su estudio que la incidencia máxima del inicio de la enfermedad ocurre entre los 25 y 55 años de edad.

En la evaluación de la capacidad funcional de los pacientes con AR se utilizó el cuestionario HAQ donde se obtuvo como valor mínimo 0.5 y como valor máximo 3, presentándose mayor incidencia en la puntuación que marca con mucha dificultad funcional con un 49.34%. En lo relacionado al instrumento que evalúa la actividad de la AR basado en el recuento de 28 articulaciones dolorosas (DAS28) se obtuvieron valores que oscilan entre 2.7 (valor mínimo) y 8.4 (valor máximo), un 70.67% de los pacientes con AR tuvieron un resultado de DAS28 de actividad alta de la enfermedad, dentro de este grupo un 33.9 % recibieron medicamento biotecnológico.

En el análisis realizado del tratamiento que se le administró a nuestro grupo de estudio coincidimos con Tornero Molina y col., (2015), donde el MTX es el medicamento de primera elección administrado a los pacientes con AR. Del total de muestras analizadas, un 64% no respondió de manera adecuada al tratamiento con MTX, difiriendo con Wessels y col., (2006), Warren y col., (2009) y Pastore y col., (2014) que establecen una buena respuesta al MTX en su grupo de estudio. Según Rivas y col., (2009) cuando un paciente no responde adecuadamente al medicamento de primera elección que es el MTX se le suele administrar agentes modificadores de la respuesta biológica, por lo que nuestros resultados coinciden con su afirmación, siendo los medicamentos biotecnológicos los mayormente administrados una vez que no ha habido respuesta positiva al MTX.

Genotipificación del polimorfismo rs2372536 del gen ATIC

El análisis del polimorfismo rs2371536 del gen ATIC en la población estudiada mostró que de las 75 muestras analizadas, se obtuvieron los siguientes genotipos: 37 para homocigoto normal (C/C), 29 para heterocigoto (C/G) y 9 para homocigoto mutado (G/G) (grafico 1).

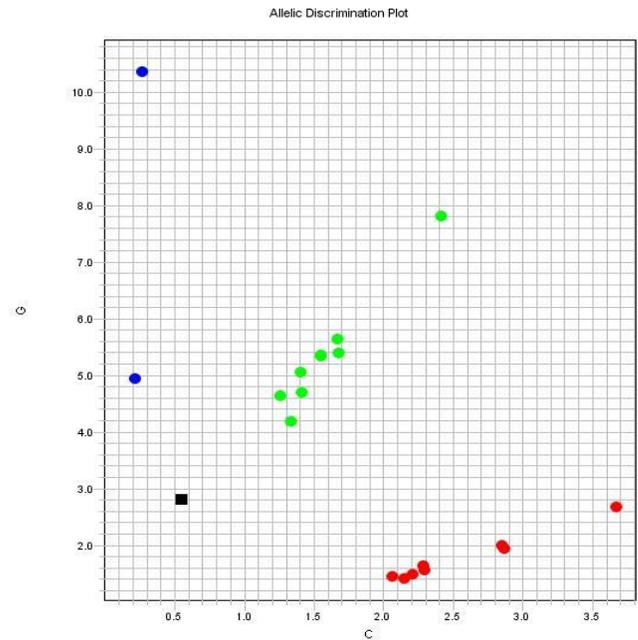


Grafico 1 Discriminación alelica del polimorfismo rs2372536. azul= Homocigoto mutado; Verde= Heterocigoto; Rojo= Homocigoto normal y Negro= Control negativo.

El resultado de las frecuencias genotípicas y alélicas se pueden observar en los graficos 2 y 3.

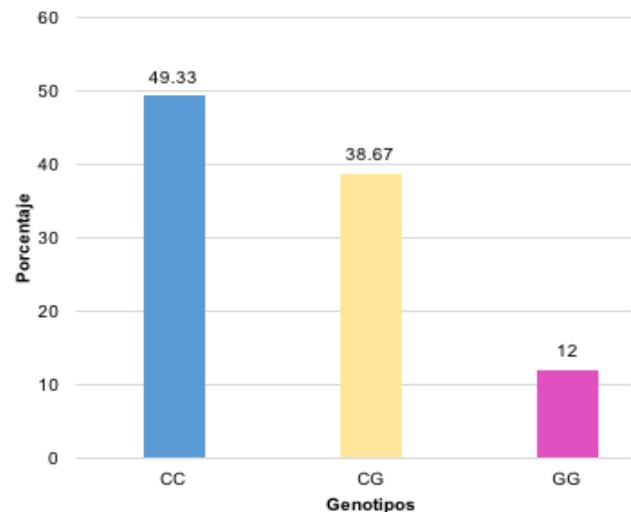


Grafico 2 Frecuencias genotípicas

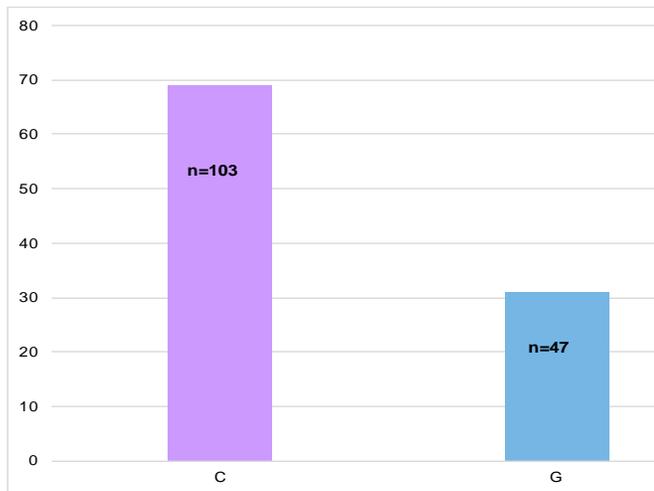


Grafico 3 Frecuencias alélicas

Al comparar las frecuencias alélicas obtenidas en nuestra población ($G=0.31$, $C=0.69$) con poblaciones como la europea ($G=0.32$, $C=0.68$), americana ($G=0.31$, $C=0.69$), y africana ($G=0.06$, $C=0.94$); se puede observar que las frecuencias son similares a la europea e igual que la americana y aunque nuestra población presenta un componente africano debido al mestizaje las frecuencias alélicas fueron distintas.

A partir de los resultados obtenidos se procedió al análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg, el cual indica que nuestra población de estudio se encuentra en equilibrio ($p = 0.31$).

Asociación del polimorfismo rs2372536 del gen ATIC y su respuesta al MTX

Los resultados obtenidos en el presente estudio no mostraron asociación con el polimorfismo rs2372536 del gen ATIC y su respuesta al MTX ($p = 0.716$). El resultado obtenido contrasta con el trabajo de Dervieux y col., (2004) y Pastore y col., (2014) donde ATIC 347 GG se asoció con una mejor respuesta, a su vez difiere con Wessels y col., (2006) donde ATIC 347 CC se relaciona con una buena respuesta al MTX.

Nuestro estudio coincidió con el realizado por Yanagimachi y col., (2011) que tampoco mostró asociación entre el polimorfismo y MTX. Las diferencias en los resultados pueden deberse a la composición genética de las poblaciones de estudio, es bien conocido que nuestra población presenta una enorme heterogeneidad genética; contando con ascendencia indígena, europea y africana. Sin embargo, de manera individual, los valores de ancestría de la población varían en un amplio rango, desde individuos con casi total ancestría indígena hasta otros con casi total ancestría europea (Moreno y Sandoval, 2013).

Conclusiones

El sexo femenino tiene mayor predisposición a padecer AR, en la población estudiada. Un mayor porcentaje de pacientes presentan elevada dificultad funcional para realizar las actividades diarias, más de la mitad de los pacientes con AR del estado de Sinaloa analizados no respondieron al tratamiento con MTX. En el presente estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el SNP estudiado y la respuesta a MTX.

Perspectivas

En el presente trabajo se analizó la asociación de un polimorfismo genético del gen ATIC en pacientes con AR del estado de Sinaloa. Debido a que la AR es la primera causa de atención en el servicio de reumatología en la población sinaloense afectando en gran medida la calidad de vida de quien lo padece y el MTX el principal medicamento administrado, se propone profundizar en estudios genéticos, realizando asociaciones de dicho polimorfismo con otros genes que se relacionan con la toxicidad y eficacia del MTX a los pacientes a los que se le administra, dichos genes son MTHFR, DHFR y TS, así como la mutación C677T.

Agradecimiento

A la Secretaría de educación pública, a través de Apoyos al Fomento para la Generación y Aplicación Innovadora del Conocimiento (PRODEP/SES-SEP) por brindar el financiamiento económico necesario para llevar a cabo el presente proyecto.

Referencias

- Barbera A y Domínguez MC. (2004). *Características e inmunopatogénesis de la artritis reumatoide. Estado actual en el tratamiento*. Biotecnología aplicada. 21(1): 189-201.
- Barragan -Garfias JA. (2011). *Artritis reumatoide en el paciente mayor*. Acta Médico Grupo Ángeles. 9(1): 20-25.
- Caballero -Uribe CV y Pinzon- Cervantes L. (2006). *Artritis reumatoide tratada con inhibidores del factor de necrosis tumoral α (Anti-TNF- α) y tuberculosis pulmonar*. Salud Uninorte. 22(1): 29-39.
- Cardiel MH, et al (2013). *Actualización de la Guía Mexicana para el tratamiento Farmacológico de la Artritis Reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología*. Reumatol Clin.
- Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith Ky col. (2004). *Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis*. Arthritis and rheumatism. 50(9): 2766-2774.
- Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C y Carninci P. (1991). *A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood*. Biotechniques. 11(3): 298-300, 302.
- Martín Alcalde E, Cantero Blanco S, Sánchez García FJ y Gómez Castillo JJ. 2003. *Nuevas Perspectivas en el tratamiento de la artritis reumatoide*. Farm Hosp 27(6): 360-370.
- Mendoza -Vazquez G, Rocha- Muñoz AD, Guerra -Soto AJ, Ramirez- Villafaña M, Gonzalez - Sanchez AG, Gamez-Nava JI y Nava A. (2013). *Artritis reumatoide y dislipidemias*. El Residente. 8(1): 12-22.
- Patricia Moya , Juliana Salazar, María Jesús Arranz , César Díaz-Torné , Elisabeth del Río , Jordi Casademont , Hèctor Corominas & Montserrat Baiget. (2015). *Methotrexate pharmacokinetic genetic variants are associated with outcome in rheumatoid arthritis patients*. Pharmacogenomics. 17(1):15.
- Pastore S, Stocco G, Favretto D, De Iudicibus S, Taddio A, d'Adamo P, Malusa N, Addobbati R, Decorti G, Lepore L y Ventura A. (2015). *Genetic determinants for methotrexate response in juvenile idiopathic arthritis*. Frontiers in pharmacology. 6: 52.
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Carreira-García V y Blanco FJ. (2009). *Polimorfismos genéticos y farmacogenética en la artritis reumatoide*. Reumatología clinica. 5: 268-279.
- Rivas A, Castillo O y Avila H. (2009). *Artritis reumatoide: patogenia y farmacos de uso frecuente*. Salus. 13(1): 114-128.
- Smith, J. B. & Haynes, M. K. (2002). *Rheumatoid arthritis--a molecular understanding*. Ann. Intern. Med. 136(12): 908-922.
- Tornero Molina J, Ballina Garcia FJ, Calvo Alen J, Caracuel Ruiz MA, Carbonell Abello Jy col. (2015). *Recommendations for the use of methotrexate in rheumatoid arthritis: up and down scaling of the dose and administration routes*. Reumatología clinica 11(1): 3-8.

Wessels JA, Kooloos WM, De Jonge R, De Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Linssen A, Collee G, De Sonnaville P, Lindemans J, Huizinga TW y Guchelaar, HJ. (2006). *Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis*. *Arthritis and rheumatism*. 54(9): 2830-2839.

Yanagimachi M, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Miyamae T, Imagawa T, Mori M, Kaneko T y Morita S. (2011). *Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis*. *British journal of clinical pharmacology*. 71(2): 237-243.