

ASOCIACION DEL POLIMORFISMO DEL GEN PTPN22 (C1858T) CON HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO 1 EN LA POBLACION MESTIZA VENEZOLANA

Dra. María del Pilar Fortes, MSc, Dr. Paolo Tassinari,
Dr. Isaac Blanca, Dra. Irma V. Machado.
Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina,
Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN

Introducción: La Hepatitis Autoinmune (HAI) tipo 1 es una enfermedad hepática progresiva en la cual se demuestra susceptibilidad genética asociada a determinantes compartidos de moléculas HLA clase II. Sin embargo, 30 a 50% de estos pacientes, no asocian alelos HLA de susceptibilidad por lo que otros promotores genéticos que pudiesen predisponer a la ruptura de inmunotolerancia están siendo investigados. La Proteína Linfoide Tirocina Fosfatasa (LTP) codificada por el gen PTPN22, ejerce una potente inhibición en el linfocito T activado. El polimorfismo de este gen en la posición 1858 (sustitución de citosina (C) por una timina (T)) se describe asociada a múltiples patologías autoinmunes pero aún no se ha reportado en HAI tipo 1. **Objetivo:** Determinar la posible asociación del polimorfismo del gen PTPN22 en mestizos venezolanos con HAI tipo 1. **Material y Métodos:** Nuestra población consistió de 62 pacientes con HAI tipo 1 y 107 individuos sanos, ambos grupos venezolanos de tercera generación. La determinación del polimorfismo se realizó mediante la amplificación de la región en estudio (posición 1850 del codón 620) con la técnica de PCR estandarizada seguida por digestión de enzimas de restricción (Xcm I). **Resultados:** El genotipo más frecuente fue el genotipo homocigoto silvestre (C/C) tanto en pacientes (90.3%) como en controles (98.1%), sin diferencia significativa. El polimorfismo C1858T (genotipo C/T) del gen PTP22 se identificó con mas frecuencia en los pacientes con diferencia estadísticamente significativa al relacionarlo con el grupo control ($p=0.029$, $OR=5.6$). El genotipo homocigoto TT no se observó en ninguno de los individuos estudiados. **Conclusión:** El polimorfismo del gen PTPN22 a nivel C1858T descrito en otras enfermedades de origen autoinmune también se detecta en HAI tipo 1, probablemente confiriendo susceptibilidad a esta enfermedad en la población mestiza venezolana.

Palabras clave: hepatitis autoinmune tipo 1, mestizos venezolanos.

SUMMARY

Background: Autoimmune hepatitis (AIH) type 1 is a progressive inflammatory disorder of the liver with genetic association to human leukocyte antigens. However, the genetic background of AIH type 1 is considered to be polygenic. Lymphoid tyrosine phosphatase, encoded by the PTPN22 gene, exerts an important down regulatory effect on T cell activation in immune response. The single nucleotide polymorphism C1858T within the PTPN22 gene has been associated with increased susceptibility to a number of autoimmune disorders. **Objective:** The aim of this study was to assess the association of the single nucleotide polymorphism C1858T of the PTPN22 gene in Venezuelan Mestizo patients with AIH type 1. **Materials and Methods:** 62 Venezuelan Mestizo patients with AIH type 1 and 107 healthy volunteers were investigated. Cases and controls were genotyped for C1858T polymorphism by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR products. **Results:** The wild-type C/C homozygous genotype was the most common variant in both patients (90.3 %) and controls (98.1 %). The heterozygous genotype C/T was significantly found in AIH patients compared to controls ($OR = 5.6$, $P = 0.029$). The T/T homozygous mutant genotype was not observed in either population. **Conclusions:** These results suggest that the PTPN22 1858C/T genotype could confer differential susceptibility to AIH type 1 in Venezuelan Mestizo patients. In addition, these findings provide strong evidence that lymphoid tyrosine phosphatase could be a critical player in multiple autoimmune disorders.

Key words: autoimmune hepatitis type 1, Venezuelan mestizos

INTRODUCCIÓN

La Hepatitis Autoinmune (HAI) es una enfermedad hepática progresiva caracterizada por la presencia de autoanticuerpos circulantes, hipergammaglobulinemia y respuesta al tratamiento inmunosupresor⁽¹⁾. No están claras las razones que provocan la ruptura de tolerancia inmunológica y los mecanismos que causan la enfermedad. La hipótesis más comúnmente aceptada es que esta patología es desencadenada por un factor ambiental en un individuo genéticamente susceptible⁽²⁾. Múltiples genes pueden interactuar produciendo el llamado "pool de genes permisivos" que determinan tanto el riesgo como las características clínicas de esta patología⁽²⁾.

Las evidencias demuestran que, además de los determinantes compartidos de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) o Antígeno Leucocitario Humano (HLA) clase II, que juegan un rol prevalente en la susceptibilidad hacia la enfermedad, múltiples promotores genéticos de autoinmunidad están presentes en HAI y pueden incluir tanto genes dependientes como independientes del CPH, (1) reportándose al menos un 30 a 50% de los pacientes con HAI sin alelos HLA de susceptibilidad⁽³⁾.

En cuanto a los genes que se encuentran fuera del CPH es importante estudiar aquellos que regulan la función del linfocito T, linfocito ampliamente involucrado en la inmunopatogenia de la HAI^(4, 5).

En este sentido, el gen PTPN22 que codifica La Proteína Linfoide Tirocina Fosfatasa (LTP) se ha asociado con una variedad de enfermedades autoinmunes. Hay suficientes evidencias que soportan el rol que juega la molécula LTP en la inhibición de los linfocitos T activados^(6,7). LTP es una proteína de 110 kDa expresada exclusivamente en las células hematopoyéticas, incluyendo los linfocitos T⁽⁶⁾. Se encuentra en el citosol⁽⁸⁾ y en el núcleo⁽⁹⁾ de estas células ejerciendo por sí sola⁽¹⁰⁾ o, en combinación con moléculas adaptadoras (c-Cbl, Csk y Grb2)⁽¹¹⁻¹³⁾, una fuerte regulación negativa de los linfocitos T. Por esta función, recientes estudios involucran a la tirocina LTP en el desarrollo de autoinmunidad⁽¹⁴⁻¹⁸⁾.

Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) ha sido identificado en el gen PTPN22 en la posición 1858 del codón 620, donde hay una sustitución de citosina (C) por una timina (T) resultando el cambio de una Arginina (Arg) por un Triptófano (Trp) en la molécula LTP⁽¹⁴⁾. Este alelo T se asocia con diversas enfermedades autoinmunes como Diabetes Mellitus tipo I^(14,15), Artritis Reumatoidea⁽¹⁷⁾, Lupus Eritematoso Sistémico⁽¹⁷⁾ y Tiroiditis Autoinmune⁽¹⁸⁾. Hasta este momento no se ha reportado en la literatura ningún estudio que asocie este polimorfismo con HAI tipo 1.

Puesto que el linfocito T juega un papel clave en la patogenia de la HAI y la molécula LTP funciona como una molécula inhibitoria de esta célula y, habiéndose asociado el polimorfismo del gen PTPN22 con diversas patologías autoinmunes nos propusimos investigar este polimorfismo en pacientes mestizos venezolanos con HAI tipo 1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este es un estudio transversal prospectivo de casos-contróles.

PACIENTES

Los 62 pacientes incluidos en el estudio son venezolanos de tercera generación, con hepatitis autoinmune tipo 1 ya comprobada reuniendo los criterios diagnósticos establecidos internacionalmente para Hepatitis Autoinmune tipo 1 (International Autoimmune Hepatitis Group)⁽¹⁹⁾.

Cada uno de los pacientes firmó el consentimiento para su participación en este estudio.

Controles

El grupo control de 107 individuos se obtuvo de la base de datos de donantes de la Sección de Inmunogenética del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela. Los individuos controles son sanos, no relacionados entre sí y venezolanos de nacimiento, con padres y abuelos venezolanos.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Inmunología.

Encuesta

Se realizó una breve encuesta a cada paciente recogiéndose los datos personales con énfasis en el origen familiar el cual confirmaba como mínimo que las dos últimas generaciones eran venezolanas.

Purificación del ADN

La obtención del ADN de cada individuo se realizó mediante el método ya descrito anteriormente⁽²⁰⁾.

Determinación del polimorfismo del gen PTPN22

La determinación del polimorfismo del gen de PTPN22 se realizó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y enzimas de restricción (RFLP) siguiendo el siguiente protocolo:

1- Se hizo una mezcla de reacción que contenía: 1.2 µl de tampón 10X de PCR, 1.2 µl (1.25 mmol/l) de mezcla de nucleótidos, 0.6 µl DMSO, 0.3 µl de cada iniciador (iniciador sentido: 5'-CCACGGCTTCCTTTCTCGTA-3', iniciador antisentido: 5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3'), 2 µl (20 ng) de ADN y 0.1 µl de Taq polimerasa.

2- Se llevó a un termociclador el cual se programó con las siguientes condiciones de PCR:

1 Ciclo	94 °C	1 Min	(fase de desnaturalización)
35 Ciclos	94 °C	30 Seg	(fase de desnaturalización)
	60 °C	30 Seg	(fase de alineación)
	72 °C	30 Seg	(fase de extensión)
1 Ciclo	72 °C	2 Min	(fase de extensión)

3- Después de la amplificación se tomó 16 µl del amplificado y se agrega 10 U de la enzima de restricción XcmI incubándose toda la noche a 37 °C.

4- Se realiza la electroforesis en un gel de agarosa al 3 % con bromuro de etidio.

5- Se coloca el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y se documentó por fotografía.

6- El alelo que posee la mutación 1858T no puede ser digerido por la enzima de restricción obteniéndose un solo fragmento de 218 bp, mientras que con el alelo 1858C se obtiene dos fragmentos (176bp y 46 bp). (Figura 1)

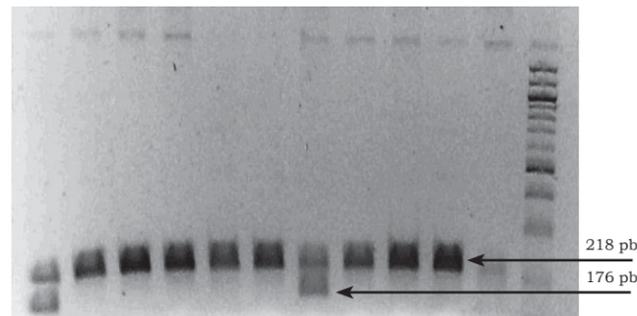


Figura 1. Visualización de los fragmentos de PCR-RFLP. Productos amplificados para el gen PTPN22, digeridos con la enzima de restricción de XcmI en un gel de agarosa al 3%. En el pozo 1 y 7 se visualizan las bandas correspondientes al genotipo heterocigoto C/T, en el resto de los pozos se observa el resultado de la digestión correspondiente al genotipo homocigoto C/C, el cual carece del sitio de restricción y por tanto no hay corte del producto amplificado. En el pozo 12 se colocó un marcador de peso molecular de 100 pb para verificar el peso molecular de los fragmentos digeridos.

Análisis Estadístico

Las frecuencias fenotípicas (FF), alélicas (FA) y genotípica (FG) se calcularon mediante conteo directo. La FF es la proporción de sujetos de una población (pacientes o controles) portadores de un determinado antígeno. La FA y FG es una proporción que, generalmente, se expresa como frecuencia x 1000, y se calcula dividiendo el número de veces en que aparece el alelo o genes en el grupo estudiado, dividido por el número total de cromosomas investigados en el mismo grupo, es decir el doble del número de individuos estudiados. Las frecuencias se calcularon en porcentajes. La significancia (p) de la asociación con hepatitis autoinmune y un determinado alelo presente en pacientes y controles fue estimada por la prueba exacta

de Fisher (21,22), la cual es muy apropiada para muestras pequeñas (21). Se considera significativo un valor de $p < 0.05$. (StatSoft, Inc. STATISTICA data analysis software system 2001 version 6. www.statsoft.com)

RESULTADOS

Para el polimorfismo PTPN22 observamos en los pacientes solo dos de los genotipos posibles (CC y CT). El genotipo más frecuente fue el genotipo homocigoto silvestre tanto en pacientes como en controles (90.3% y 98.1%) observándose más en el segundo grupo, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa (Tablas 1 y 2, pacientes y controles, respectivamente). El genotipo C/T se evidencia con una frecuencia mayor en los pacientes (9.7%) con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.029$) al relacionarlos con

el grupo control. La presencia de este genotipo mostró un OR significativo de 5.6. El genotipo homocigoto TT no se observó en el grupo de pacientes ni en el grupo control. (Tabla 3)

Tabla 1. Frecuencia Alélica, Fenotípica y genotípica del gen PTPN22 en pacientes Venezolanos con Hepatitis Autoinmune tipo 1

PTPN22 (SNP 1858) n=62				
Alelo	C	95.2 (118)	Genotipo	
	T	4.8 (6)	C/C	90.3 (56)
Fenotipo	C	100 (62)	C/T	9.7 (6)
	T	9.7 (6)	T/T	0.0 (0)

Tabla 2. Frecuencia Alélica, Fenotípica y genotípica del gen PD-1 en individuos sanos Venezolanos

PTPN22 (SNP 1858) n=107				
Alelo	C	99.1 (212)	Genotipo	
	T	0.9 (2)	C/C	98.1 (105)
Fenotipo	C	100 (107)	G/T	1.9 (2)
	T	1.9 (2)	T/T	0.0 (0)

Nota: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores de un genotipo y/o fenotipo para cada sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje.

Tabla 3. Distribución de genotipos PTPN22 en pacientes con HAI e individuos sanos

Genotipos	Grupo Pacientes	Grupo Control	OR (IC95%)	p
CC	56 (90.3%)	105 (98.1%)	ns	ns
CT	6 (9.7%)	2 (1.9%)	5.6	0.029
TT	0	0	---	---

DISCUSIÓN

La inmunopatología de la HAI aún no es bien conocida, planteándose como resultado de muchos factores entre los que se encuentran los ambientales (infecciones virales) y los genéticos. La mayoría de los estudios realizados han asociado la HAI tipo 1 con moléculas del CPH clase II. Sin embargo, se ha reportado hasta 40% de los pacientes con HAI sin alelos HLA de susceptibilidad⁽³⁾ lo que sugiere la posible presencia de otros genes que pueden proporcionar susceptibilidad a sufrir de esta enfermedad.

Así, en nuestro primer estudio demostramos que, al igual que en otras poblaciones, un 38% de los pacientes mestizos venezolanos con HAI tipo 1 no presentaba alelos HLA de susceptibilidad⁽²⁰⁾ por lo que investigamos el polimorfismo de algunos otros genes que, en este caso, codifican proteínas con función inhibitoria de los linfocitos T, linfocitos estos ampliamente involucrados en la inmunopatogenia de la HAI.

Específicamente, el gen PTPN22 es un buen candidato como marcador genético de susceptibilidad para autoinmunidad. Este gen, como acotamos, codifica la fosfatasa tirosina lin-

foide (LYP), la cual está involucrada en la prevención de la activación espontánea del linfocito T mediante la desfosforilación e inactivación de las quinasas y sus sustratos. La LYP es una de las moléculas inhibitoras más potentes de la activación del linfocito T. Como también comentamos un SNP ha sido identificado en el gen PTPN22 en la posición 1858 del codón 620, donde hay una sustitución de citosina (C) por una timina (T) resultando el cambio de una Arginina (Arg) por un Triptófano (Trp) en la molécula LYP⁽¹⁴⁾. Esta mutación se ha asociado a diversas enfermedades autoinmunes pero, para nuestro conocimiento, no existía ninguna documentación de la asociación de este polimorfismo con susceptibilidad a padecer HAI.

En el presente estudio, encontramos asociación del polimorfismo del gen PTPN22 a nivel C1858T y la presencia de HAI tipo 1. Este hallazgo fue significativo lo que implica que, en la HAI tipo 1, la ruptura de la tolerancia inmunológica pudiere estar modulada, en parte, por una capacidad inhibitoria aberrante de la molécula inhibitoria LYP sobre la funcionalidad de los linfocitos T. Esta inmunomodulación aberrante estaría dirigida principalmente a la expansión y activación de los linfocitos T CD4 cooperadores por lo que la disfunción se expresaría como una hiperfuncionalidad de estas células las cuales activarían a los linfocitos B y a los linfocitos T con capacidad citotóxica. Los primeros tenderían a la activación de plasmocitos y la consecuente hiperproducción de inmunoglobulinas que estimularían la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos mientras los segundos, actuarían destruyendo a los hepatocitos por citólisis directa^(4,5,10). Ambos mecanismos, considerados primordiales en la inmunopatología de esta enfermedad, perpetuarían la necroinflamación y el compromiso hepático característico de la HAI, inflamación y compromiso que se logra controlar con inmunosupresores que precisamente limitan estos efectos inmunológicos deletéreos.

En conclusión, se demuestra por primera vez que la asociación del polimorfismo del gen PTPN22 (C1858T) descrito en otras enfermedades autoinmunes también es característica de la HAI tipo 1 y, en esta investigación, prevalente en pacientes mestizos venezolanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol Rev* 2000;174:250-9
- Donaldson PT. Genetics in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002;22(4): 353-63
- Goldberg AC, Bittencourt PL, Mougín B, Cancado ELR, Porta G, Carrilho F, et al. Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: identifying the major susceptibility locus. *Hum Immunol* 2001;62:165-9
- Wen L, Peakman M, Lobo-Yeo A, McFarlane BM, Mowat AP, Mieli-Vergani G, et al. T-cell directed hepatocyte damage in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1990;336:1527-30
- Lohr H, Manns M, Hyriatsoulis A, Lohse AW, Trautwein C, Buschenfelde K-H, et al. Clonal analysis of liver-infiltrating T cells in patients with LKM-1 antibody-positive autoimmune chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1991;84:297-302
- Mustelin T, Alonso A, Bottini N, Huynh H, Rahmouni S, Nika K,

- et al. Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. *Mol Immunol* 2004;41:687-700
- Chow LM, Fournel M, Davidson D, Veillette A, et al. Negative regulation of T-cell receptor signaling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature* 1993;365:156-60
- Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase. *Lyp Blood* 1999;93:2013-24
- Gjorloff-Wingren A, Saxena M, Han S, Wang X, Alonso A, Renedo M, et al. Subcellular localization of intracellular protein tyrosine phosphatases in T cells. *Eur J Immunol* 2000;30:2412-21
- Cloutier JF, Veillette A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med* 1999;189:111-21
- Hill RJ, Zozulya S, Lu YI, Ward K, Gishizhy M, Jallal. The lymphoid protein tyrosine phosphatase LYP interacts with the adaptor molecule GRB2 and functions as a negative regulator of T-cell activation. *Exp Hematol* 2002;30:237-44
- Ota Y, Samelson LE. The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 1997;276:418-20
- Lupher ML, Songyang Z, Shoelson SE, Cantley LC, Band H. The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J Biol Chem* 1997;272:33140-44
- Bottini N, Musumci L, Alonso A, Raloumouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004;36:337-8
- Yokoi N, Komeda K, Wang HY, Yano H, Kitada K, Saitoh Y, et al. Cblb is major susceptibility gene for rat type diabetes mellitus. *Nat Genet* 2002;31:391-4
- Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, Gonzales B, Novitzke J, Kern M, et al. Analysis of families in the multiple autoimmune genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet* 2005;76:561-71
- Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot Ma, Torres B, Caliz R, et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:219-24
- Brand O, Gough S, Heward J. HLA, CTLA-4 and PTPN22: the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert rev* 2005;7(23):1-15
- Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: international autoimmune hepatitis group. *Hepatology* 1993;18:998-1005
- Fortes MP, Machado IV, Gil G, Fernández-Mestre M, Dagher L, León R et al. Genetic Contribution of MHC class II region to Type 1 Autoimmune Hepatitis Susceptibility in Venezuela. *Liver Internat* 2007;27(10):1409-1

Para cualquier información o separata contactar a la; Dra. Maria del Pilar Fortes. Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Correo - e: igleforts@gmail.com
Fecha de Recepción: Sep. 2010. Fecha de Revisión: Sep. 2010. Fecha de Aprobación: Sep. 2010.