

Estudio de biomarcadores epigenéticos para el diagnóstico y pronóstico de la Artritis Reumatoide.

Gracia María Martín Núñez^{1,2,3}, Arkaitz Mucientes^{2,3}, Jose Manuel Lisbona Montañez^{1,2,3}, Patricia Ruiz Limón^{2,4}, Rocío Redondo Rodriguez^{1,2}, Sara Manrique Arija^{1,2,3}, Inmaculada Ureña Garnica^{2,3}, Laura Cano García², Natalia Mena Vázquez^{2,3}, Antonio Fernández Nebro^{1,2,3}.

¹Departamento de Medicina, Universidad de Málaga, 29016 Malaga, Spain. ²Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA)-Plataforma Bionand, 29010 Malaga, Spain. ³Unidad de Gestión Clínica de Reumatología, Hospital Regional Universitario de Málaga, 29009 Malaga, Spain. ⁴Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición, Hospital Clínico Virgen de la Victoria, 29010 Málaga, Spain

1.-Introducción

Las modificaciones epigenéticas pueden actuar como biomarcadores, y son el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Estas alteraciones en el ADN han sido relacionadas con la artritis reumatoide (AR).

2.-Objetivos

Identificar nuevos biomarcadores epigenéticos para el diagnóstico y pronóstico de la AR.

3.-Métodos

Estudio Transversal de 110 AR y 110 controles

Cohorte de descubrimiento

Estudio del metiloma (Infinium Methylation EPIC BeadChip Illumina) >>> Validación técnica por pirosecuenciación (Pyromark Q48) de los CpGs seleccionados en la matriz HM850K (CpG anotados en genes, incluidos en regiones diferencialmente metiladas, β -valor $\geq 0,10$ entre grupos, y valor de $p \leq 0,01$).



32 AR



32 Controles

FR: positivo
ACPA: positivo

16 AR Graves:
DAS28-VSG $\geq 3,2$
Collinsella aerofaciens $\geq 0,015$

16 AR no Graves
DAS-VSG $< 3,2$
Collinsella aerofaciens $< 0,015$

Cohorte de Validación

Estudio de validación por pirosecuenciación (Pyromark Q48) de los CpGs seleccionados de la matriz HM850K y verificados previamente en la validación técnica (cohorte de descubrimiento).



78 AR



78 Controles

21 AR Graves:
DAS28-VSG $\geq 3,2$

57 AR no Graves:
DAS28-VSG $< 3,2$

4.-Resultados

4.1 Características de los sujetos

	Cohorte descubrimiento			Cohorte Validación		
	AR	Controles	p-valor	AR	Controles	p-valor
Edad en años, media (DE)	58.1 (9.6)	57.2 (9.4)	0.690	54.9 (11.5)	54.2 (17.8)	0.771
Sexo, mujer; n (%)	24 (75.0)	24 (75.0)	1.000	65 (83.3)	64 (82.1)	0.560
Tabaco			0.015			0.036
Nunca fumador, n (%)	12 (37.5)	19 (59.4)		34 (43.6)	49 (62.8)	
Exfumador, n (%)	13 (40.6)	3 (9.4)		20 (25.6)	10 (12.8)	
Fumador activo, n (%)	7 (21.9)	10 (31.3)		24 (30.8)	19 (24.4)	
Obesidad OMS, n (%)	17 (53.1)	9 (28.1)	0.042	23 (29.5)	16 (20.5)	0.339
Tiempo de evolución AR, meses, mediana (RIC)	84.5 (77.5-100.5)	-	-	91.2 (77.6-120.0)	-	-
Retraso diagnóstico, meses, mediana (RIC)	8.3 (4.0-12.3)	-	-	8.1 (4.5-14.2)	-	-
Erosiones, n (%)	23 (71.9)	-	-	49 (62.8)	-	-
FR >10, n (%)	29 (90.6)	0 (0.0)	<0.001	63 (80.8)	0 (0.0)	<0.001
ACPA >20 U/ml, n (%)	23 (71.9)	0 (0.0)	<0.001	66 (84.6)	0 (0.0)	<0.001
ACPA elevado >340 U/ml	16 (50.0)	0 (0.0)	<0.001	25 (32.1)	0 (0.0)	<0.001
DAS28-ESR puntual, media (DE)	3.0 (1.1)	-	-	2.8 (1.0)	-	-
Remisión-baja actividad, n (%)	20 (62.5)	-	-	51 (65.4)	-	-
Moderada-alta actividad, n (%)	12 (37.5)	-	-	27 (34.6)	-	-
DAS28-ESR promedio, media (DE)	3.6 (0.5)	-	-	2.8 (0.6)	-	-
Remisión-baja actividad, n (%)	16 (50.0)	-	-	55 (70.5)	-	-
Moderada-alta actividad, n (%)	16 (50.0)	-	-	23 (29.5)	-	-
HAQ promedio, mediana (RIC)	0.8 (0.6)	-	-	0.7 (0.6)	-	-
FAME sintético, n (%)	30 (93.8)	0 (0.0)	<0.001	71 (91.0)	0 (0.0)	<0.001
FAME biológico, n (%)	11 (34.4)	0 (0.0)	<0.001	31 (39.7)	0 (0.0)	<0.001
Glucocorticoides al protocolo, n (%)	5 (15.6)	0 (0.0)	0.020	14 (17.9)	0 (0.0)	<0.001
<i>Collinsella aerofaciens</i> frecuencia relativa, mediana (RIC)	0.005 (0.0009-0.01)	0.003 (0.0008-0.005)	0.035	0.007 (0.002, 0.01)	0.002 (0.0005, 0.008)	<0.001
<i>Collinsella aerofaciens</i> frecuencia relativa (OTU ≥ 0.010), n (%)	11 (34.4)	3 (9.4)	0.016	31 (39.7)	14 (18.7)	0.004

4.2 Niveles medios de metilación obtenidos por pirosecuenciación de los CpGs seleccionados para los grupos de estudio.

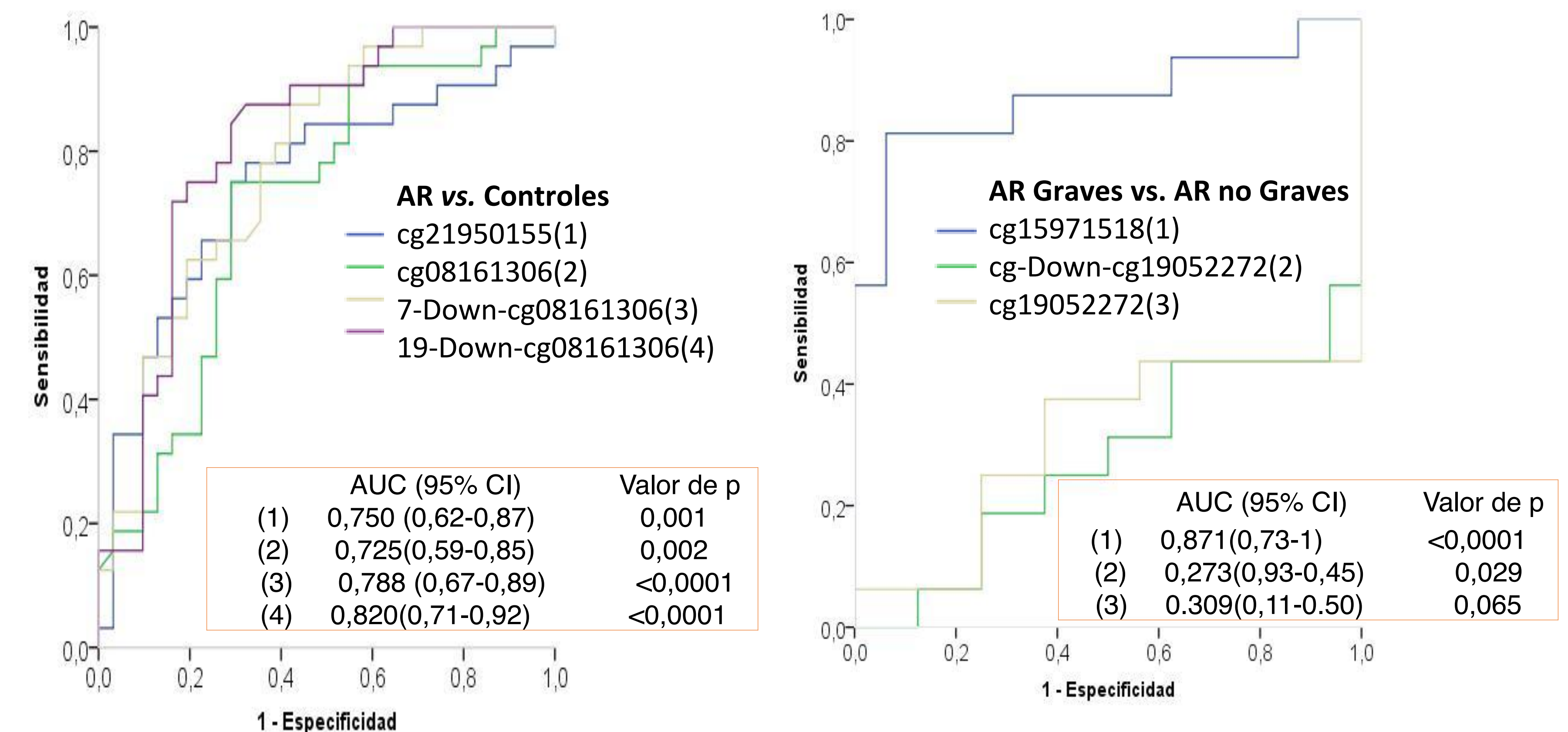
Gen	ID	Cohorte Descubrimiento	Cohorte Validación
		Paciente vs. Controles	Paciente vs. Controles
PRHOXNB	cg21950155	60,45 \pm 16,11 vs. 47,06 \pm 14,12, p=0,001	53,78 \pm 15,68 vs. 53,46 \pm 14,85, p>0,05
TBC1D22A	cg08161306	75,08 \pm 13,92 vs. 63,96 \pm 13,54, p=0,002	73,18 \pm 14,83 vs. 71,92 \pm 15,75, p>0,05
	7-Down-cg08161306	86,35 \pm 5,43 vs. 79,46 \pm 6,65, p<0,0001	84,58 \pm 6,80 vs. 83,32 \pm 7,79, p>0,05
	19-Down-cg08161306	81,23 \pm 4,81 vs. 74,48 \pm 6,04, p<0,0001	80,10 \pm 5,70 vs. 77,96 \pm 6,41, p=0,03
Gen	ID	AR grave vs AR no grave	AR grave vs AR no grave
PRG2	cg15971518	37,09 \pm 14,17 vs. 18,1762 \pm 8,86, p<0,0001	28,14 \pm 14,68 vs. 29,57 \pm 14,86, p>0,05
ALLC	5-Down-cg19052272	55,04 \pm 12,21 vs. 65,63 \pm 6,10, p=0,02	59,63 \pm 16,13 vs. 61,98 \pm 10,72, p>0,05
	cg19052272	75,73 \pm 13,10 vs. 87,70 \pm 5,43, p=0,003	79,05 \pm 18,75 vs. 83,80 \pm 11,24 p>0,05
TBC1D22A	7-Down-cg08161306	85,60 \pm 5,32 vs. 87,10 \pm 5,60 p>0,05	87,32 \pm 7,06 vs. 83,57 \pm 6,47, p=0,031

4.3 Asociación de los CpGs seleccionados con la AR y gravedad de la AR en un modelo de regresión logística.

Gen	ID	Cohorte Descubrimiento	Cohorte Validación
		Paciente vs. Controles R ² ;OR(95%IC), valor de p	Paciente vs. Controles R ² ;OR(95%IC), valor de p
PRHOXNB	cg21950155	0,163; 1,059 (1,02-1,09), p=0,002*	NS
TBC1D22A	cg08161306	0,143; 1,062 (1,01-1,10), p=0,004*	NS
	7-Down-cg08161306	0,247; 1,21 (1,08-1,34), p<0,0001*	NS
	19-Down-cg08161306	0,280; 1,26 (1,11-1,43), p<0,0001*	0,030; 1,06(1,00-1,18), p=0,032*
Gen	ID	AR grave vs AR no grave R ² ;OR(95%IC), valor de p	AR grave vs AR no grave R ² ;OR(95%IC), valor de p
PRG2	cg15971518	0,385;1,13 (1,04-1,22), p=0002*	NS
ALLC	5-Down-cg19052272	0,233; 0,89 (0,82-0,97), p=0,01*	NS
	cg19052272	0,263; 0,89 (0,81-0,97), p=0,01*	NS
TBC1D22A	7-Down-cg08161306	NS	0,060; 1.09 (1,00-1,17), p=0,034*

En la tabla se muestran dos modelos de regresión logística. Modelo 1: variable dependiente: Pacientes (1) vs. Controles (0). Modelo 2: variable dependiente: AR grave (1) vs. AR no grave (0). * $p < 0.05$ al incluir además en el modelo edad y sexo. Resultados obtenidos con los datos de validación (pirosecuenciación) para ambas cohortes. NS: modelo estadísticamente no significativo.

4.4 Potencial diagnostico de los CpGs seleccionados de acuerdo al área bajo la curva ROC (Cohorte descubrimiento, datos de validación).



5.-Conclusiones. El nivel de metilación del ADN en los sitios CpG identificados está asociado con la AR y la severidad de la AR, los cuales podrían actuar como biomarcadores potenciales en el diagnóstico y pronóstico de la AR.

