

LAVORO ORIGINALE

Polimorfismi del gene del TNF- α in pazienti con artrite reumatoide trattati con biologici anti-TNF- α : risultati preliminari*

TNF- α gene polymorphisms in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF- α agents: preliminary results

M. Fabris¹, E. Di Poi¹, S. Sacco¹, G. Damante², L. Sinigaglia³, G. Ferraccioli¹

Divisione di Reumatologia¹ - DPMSC - e Cattedra di Genetica Medica² - DSTB - Università degli Studi di Udine, e Cattedra di Reumatologia³ - Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano

SUMMARY

Objectives: To study -238 and +489 TNF- α polymorphisms in severe-unresponsive (more than 6 swollen joints and still active disease despite at least 6 months of DMARDs combination therapy) and mild-responsive (less than 3 swollen joints and good response to MTX or other conventional DMARDs) rheumatoid arthritis (RA).

Methods: We investigated 100 RA patients (56 with severe and 44 with mild disease activity) and 45 healthy blood donors (HBDs). Genotyping was performed by PCR-restriction fragment length polymorphism procedure. Several clinical and serological parameters were also examined.

Results: Severe RA patients disclosed the -238 GG genotype in 100% of the cases versus 95.5% in the mild-responsive patients and 91.2% in the HBDs. The +489 GG genotype disclosed only a trend towards a prevalence in severe RA patients. However the +489 A allele seems to associate with early onset, longer disease duration and longer responsiveness to conventional therapy.

Conclusion: The -238 AG genotype is absent in severe-unresponsive RA, but present in mild-responsive RA subjects. Thus -238 GG homozygosity associates with severity and unresponsiveness. In contrast the +489 polymorphism does not segregate differently between responsive and unresponsive RA patients.

Reumatismo, 2002; 54(1):19-26

INTRODUZIONE

Negli ultimi cinque anni, una più profonda comprensione degli eventi biologici che caratterizzano il tessuto sinoviale reumatoide ha permesso di cambiare in modo sostanziale l'approccio terapeutico dell'AR (1, 2).

In particolare, il riconoscimento del ruolo fondamentale del TNF- α nel processo infiammatorio cronico dell'AR, grazie soprattutto al lavoro condotto presso il Kennedy Institute di Londra (3, 4), è sfociato nella produzione di agenti farmacolo-

gici volti a bloccare l'attività del TNF- α sia direttamente (anticorpi anti-TNF- α) che a livello di interazione recettoriale (recettore p75 chimerico) (5, 6). La terapia con agenti anti-TNF- α ha dimostrato di rallentare o addirittura bloccare la progressione del danno anatomico laddove le terapie convenzionali - Methotrexate (MTX) da solo o in associazione con altri DMARDs (Disease modifying antirheumatic drugs) - non avevano avuto successo (7, 8). Tali evidenze cliniche hanno indirizzato la ricerca verso la definizione di nuovi e più efficienti marcatori biochimico-genetici che permettano di individuare gli individui con maggiore predisposizione allo sviluppo di una malattia più grave da trattare precocemente con una terapia più aggressiva ed efficace mediante i biologici anti-TNF- α (9, 10). Il ruolo preponderante (stimato intorno al 60%) della componente genetica nella suscettibilità alla malattia reumatoide

*Lavoro premiato al XXXVII Congresso SIR di Milano, 2000

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. G. Ferraccioli, Cattedra di Reumatologia, DPMSC, Policlinico Universitario di Udine, Piazzale S. Maria della Misericordia 1, 33100 Udine, Italia, E mail: gf.ferraccioli@med.uniud.it

(11) ed il riconoscimento del ruolo chiave del TNF- α in questa affezione (3) hanno spinto ad analizzare il gene codificante questa citochina ed a studiare i meccanismi responsabili della sua regolazione trascrizionale. Il gene del TNF- α si trova nel cromosoma 6 tra i geni degli MHC di classe III (12) e presenta numerosi siti polimorfici, soprattutto a livello del promotore (13). Poiché il 60% circa della variazione della produzione di TNF- α sembra geneticamente determinata (14), numerosi sforzi si sono focalizzati verso l'individuazione di una possibile associazione tra AR ed alterazioni genotipiche del TNF- α (14-16). Gli studi finora effettuati hanno concordemente dimostrato che l'omozigosi GG dei polimorfismi -238 (promotore) e +489 (primo introne) risulta significativamente associata ad una maggiore gravità dell'erosione articolare, tuttavia i tentativi di chiarire il significato funzionale di questi come di altri polimorfismi del gene del TNF, hanno portato a risultati spesso molto contrastanti (17-20). In altre parole non è ancora chiaro se e come la variabilità polimorfica a carico del promotore e del gene codificante il TNF- α possa influenzarne l'espressione a livello dell'infiammazione articolare, determinando gli effetti erosivi più marcati. Scopo del nostro studio è stato ridefinire il ruolo e la penetranza dei polimorfismi del gene del TNF- α nella nostra popolazione reumatoide, suddividendo i pazienti sulla base della severità del decorso clinico in modo da distinguere le due facce della malattia reumatoide, quella moderatamente aggressiva che risponde alle terapie farmacologiche classiche e quella più severa, erosiva e resistente. Dal confronto tra questi due gruppi di pazienti si intendono far emergere i marcatori prognostici più significativi per guidare la terapia farmacologica.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Nello studio sono stati arruolati 100 pazienti con AR diagnosticata secondo i criteri ACR 1987 (21) e 45 controlli (donatori sani del centro immunotrasfusionale dell'Ospedale di Udine) confrontabili per età e sesso.

I pazienti afferenti rispettivamente alle cliniche Reumatologiche di Udine (56) e Milano (44), sono stati distinti in due gruppi sulla base della gravità della malattia e della responsività al trattamento convenzionale con MTX, da solo o in associazione con altri DMARDs. Il primo gruppo (44 pazienti totali), distinto dalla sigla MTX-R, comprendeva i soggetti in remissione stabile da almeno 6 mesi dopo un trattamento con MTX (15 mg/Kg/settimana) o con altri DMARDs convenzionali. Con remissione stabile si intendeva la presenza di meno di 3 articolazioni tumefatte e una rigidità mattutina di durata inferiore ai 20 minuti. Il secondo gruppo, siglato TNF-T, comprendeva invece 56 soggetti che presentavano, al momento dell'arruolamento, una malattia attiva nonostante 6 mesi di trattamento con terapie di combinazione (MTX + Sulfasalazina + Idrossiclorochina o MTX + Ciclosporina A, incluse basse dosi di prednisone, 5 mg/die).

Con il termine malattia attiva si intendeva la presenza di più di 6 articolazioni tumefatte ed una rigidità mattutina superiore ai 60 minuti. Questo gruppo di pazienti è stato in seguito sottoposto a trattamento anti-TNF- α (Infliximab, in accordo con il protocollo del trial ATTRACT (7)). I dati riguardanti le due popolazioni udinesi e milanesi sono stati analizzati dapprima separatamente, quindi globalmente, per consentire di escludere eventuali bias di campionamento.

Tabella I - Programmi di amplificazione PCR e condizioni dell'analisi di restrizione.

Polimorfismo	-238	+489
Primer sense	5'-AAA CAG ACC ACA GAC CTG GTC-3'	5'-GGA GAG AAG CAA CTA CAG AC-3'
Primer antisense	5'-AAG GAT ACC CCT CAC ACT CCC CAT CCT CCT CCC GGA TC-3'	5'-CAC ACT TAG TGA GCA CCT TC-3'
Programma di amplificazione PCR	95°C x 40" 61°C x 1' 72°C x 40", 40 cicli.	95°C x 40" 60°C x 1' 72°C x 1', 40 cicli
Analisi di restrizione	Bam HI, 37°C 2 ore, elettroforesi su gel 3% agarosio in TBE	Tai I, 65°C 2 ore, elettroforesi su gel 2.5% agarosio in TBE

Estrazione del DNA, PCR ed analisi di restrizione

Il DNA è stato estratto a partire da 2 ml di sangue intero in EDTA mediante il metodo del "salting out". Le amplificazioni mediante PCR sono state eseguite secondo i programmi indicati in tabella I in accordo con procedure precedentemente riportate in letteratura (16, 19). Il genotipo è stato identificato per digestione con specifici enzimi di restrizione e confrontando il pattern di digestione con quello riportato in letteratura (Fig. 1-2).

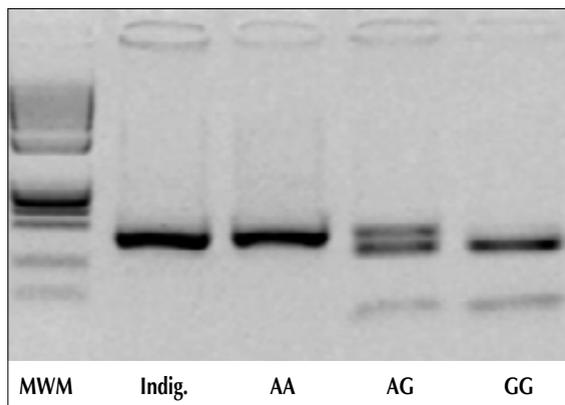


Figura 1 - Pattern di digestione enzimatica per l'analisi del polimorfismo -238 del TNF- α . MWM: marker di peso molecolare, ϕ IX HaellI. Indig.: prodotto della PCR non digerito.

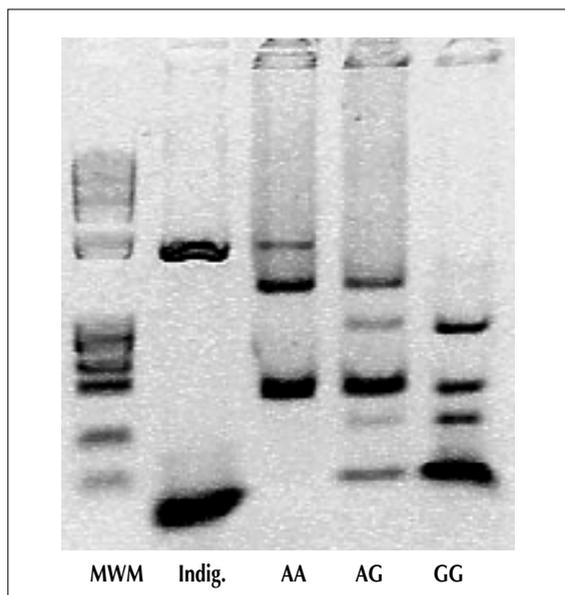


Figura 2 - Pattern di digestione enzimatica per l'analisi del polimorfismo +489 del TNF- α . MWM: marker di peso molecolare, ϕ IX HaellI. Indig.: prodotto della PCR non digerito.

Analisi statistica

Sui dati demografici, clinici e di laboratorio è stata calcolata la mediana e le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante il Test di Mann Whitney per campioni non appaiati, considerando significativa una $p < 0.05$.

RISULTATI

Analisi genotipica

La distribuzione delle frequenze genotipiche dei polimorfismi -238 e +489 del TNF- α nelle diverse popolazioni udinesi (UD) e milanesi (MI) è illustrata nella tabella II. Entrambe le popolazioni di pazienti AR TNF-T mostrano una assoluta prevalenza del genotipo GG del polimorfismo -238, mentre il gruppo MTX-R UD si differenzia da quello analogo di MI in quanto presenta una frazione di soggetti eterozigoti AG (5.9%), anche se inferiore a quella riscontrata nella popolazione di controllo (8.8%), mentre i soggetti MTX-R MI presentano un 100% di GG, al pari dei soggetti TNF-T. Tuttavia la ridotta numerosità del gruppo MTX-R MI non consente certamente di ottenere analisi significative soprattutto per il polimorfismo -238, data la bassa frequenza dell'allele A già nella popolazione sana. L'analisi del polimorfismo +489 ha permesso di mettere in luce differenze marcate tra le popolazioni di AR delle due sedi. Mentre nel gruppo TNF-T UD si nota una sostanziale diminuzione dell'allele A sia rispetto al gruppo MTX-R (OR=1.9), sia rispetto ai controlli (OR=2), i pazienti TNF-T di Milano mostrano addirittura un aumento della frazione di soggetti AG (41.2%) rispetto ai pazienti MTX-R (30%). Complessivamente la popolazione di AR di Milano presenta una percentuale di eterozigoti AG (38.6%) più elevata dei pazienti di Udine (21.4%), ma curiosamente non si è rinvenuto nessun caso di omozigosi AA, presente invece tra i soggetti con AR di Udine, pur se in percentuale più ridotta (3.6%) rispetto alla popolazione di controllo (8.9%). Riunendo i pazienti responsivi di Udine e Milano e ponendoli a confronto con il totale dei pazienti non responsivi delle due città, il dato più importante è rappresentato dal 100% di omozigosi GG del polimorfismo -238 nei TNF-T, versus 95.5% nei MTX-R e 91% nei controlli. L'omozigosi GG del -238 rappresenta un marcatore necessario, anche se non unico, della classe di AR con malattia più grave e refrattaria alle terapie convenzionali. L'omozigosi GG del polimorfismo +489, indicata in letteratura come marcatore di erosività articolare in corso di AR (14,16), non si di-

Tabella II - Frequenza dei polimorfismi del TNF- α nelle diverse popolazioni esaminate.

Soggetti (n)	-238GG (n)	-238AG (n)	+489GG (n)	+489AG (n)	+489AA (n)
MTX-R UD (34)	94.1% (32)	5.9% (2)	70.6% (24)	26.5% (9)	2.9% (1)
TNF-T UD (22)	100% (22)	-	81.8% (18)	13.6% (3)	4.6% (1)
MTX-R MI (10)	100% (10)	-	70% (7)	30% (3)	-
TNF-T MI (34)	100% (34)	-	58.9% (20)	41.1% (14)	-
MTX-R tot (44)	95.5% (42)	4.5% (2)	70.5% (31)	27.3% (12)	2.2% (1)
TNF-T tot (56)	100% (56)	-	67.8% (38)	30.4% (17)	1.8% (1)
AR UD tot (56)	96.4% (54)	3.6% (2)	75% (42)	21.4% (12)	3.6% (2)
AR MI tot (44)	100% (44)	-	65% (39)	35% (21)	-
Controlli (45)	91.2% (41)	8.8% (4)	68.9% (31)	22.2% (10)	8.9% (4)

mostra altrettanto importante nel distinguere i casi più gravi e resistenti di AR nella popolazione considerata complessivamente nel nostro studio, poiché presenta la stessa frequenza nei 2 gruppi di pazienti non responsivi e responsivi e nei controlli (Tab. II).

Associazione tra genotipo e parametri demografici e clinico-patologici

In tabella III sono riportate le principali caratteristiche demografiche, cliniche serologiche dei di-

versi gruppi di pazienti analizzati. I gruppi MTX-R e TNF-T di UD e MI mostrano sia analogie, che importanti differenze. Anche se non in modo statisticamente significativo, l'età d'esordio è tendenzialmente più precoce in entrambe le popolazioni TNF-T rispetto ai corrispondenti gruppi MTX-R. I pazienti TNF-T di UD presentano un numero di articolazioni tumefatte e dolenti superiore a quello rilevato mediamente nei TNF-T di MI, tuttavia gli indici di flogosi (PCR e VES) e la classi-

Tabella III - Valori (mediana; minimo-massimo) rappresentanti le caratteristiche demografiche, cliniche e serologiche dei pazienti sottoposti ad analisi genotipica (distinti sulla base dell'afferenza alle due Divisioni di Reumatologia). FR: fattore reumatoide; VES: velocità di eritrosedimentazione, mm/h; PCR: proteina C reattiva, mg/L. Alla voce "manifestazioni extra-articolari" è riportata la percentuale di pazienti che le presentavano. Alla voce "classe funzionale" è riportata la percentuale dei pazienti in classe I.

Parametro	TNF-T UD	MTX-R UD	TNF-T MI	MTX-R MI
n° pazienti	22	34	34	10
Sesso (% donne)	100%	85.3%	94.1%	80%
Età	55 (27-75)	62 (25-85)	53 (25-79)	47 (34-69)
Età esordio (anni)	36 (14-70)	50 (14-76)	39 (17-69)	44 (27-66)
Durata malattia (anni)	9 (2-40)	8,5 (0,3-51)	14,5 (2-39)	4,5 (2-15)
Articolazioni tumefatte	21 (6-55)	1 (0-3)	9 (6-22)	1 (0-3)
Articolazioni dolenti	31 (3-68)	2 (0-30)	12 (1-28)	1 (0-3)
Manifestazioni extrarticolari	31.8%	44%	64%	assenti
Classe funzionale	18.2%	82,3%	29,4%	90%
Durata terapia (anni)	9 (1.5-40)	6,5 (0,1-27)	12 (2-30)	3,5 (1-10)
FR positività	59%	41.2%	70,5%	70%
VES	66 (21-131)	22 (5-77)	60 (10-93)	19,5 (10-58)
PCR	31.7 (7-137)	3 (0,3-43)	22,5 (1-181)	5 (1-33)
Analisi genotipica TNF- α				
-238	100% GG	94,1% GG	100% GG	100% GG
+489	81.8% GG	70,6% GG	58,9% GG	70% GG

ficazione funzionale sono sovrapponibili. Da rilevare una più cospicua presenza di manifestazioni extra-articolari nei TNF-T di MI rispetto al corrispondente gruppo di UD.

Dopo aver suddiviso ulteriormente i 4 gruppi di pazienti sulla base del genotipo del polimorfismo +489 del TNF- α in soggetti GG e soggetti AG/AA, sono state rianalizzate le stesse variabili cliniche (Tabb. IV-V): i soggetti portatori di almeno un allele A mostrano un'età d'esordio della malattia tendenzialmente inferiore rispetto agli individui omozigoti GG, tuttavia rispondono alle terapie più a lungo e presentano un migliore indice funzionale. Anche la presenza del fattore reumatoide (FR) è tendenzialmente inferiore nei soggetti AG/AA rispetto ai GG, ma nessuna delle differenze osservate raggiunge la significatività statistica. Possiamo pertanto rilevare una tendenza verso un'associa-

zione tra allele A, esordio precoce e malattia più a lungo controllabile. Se suddividiamo i due gruppi di soggetti TNF-T di MI e UD sulla base della durata della malattia (cut-off 10 anni) ed analizziamo genotipo ed età d'esordio nei sottogruppi così individuati (Tab. VI), troviamo che i pazienti di MI sono per il 76% nella fascia >10 anni, contro un 41% dei pazienti di UD e che sorprendentemente in entrambi i casi i soggetti AG/AA si concentrano nei gruppi con maggiore durata di malattia, che mostrano, come già detto, un'età d'esordio più bassa. Si può dunque ipotizzare che la maggior frequenza di soggetti AG per il +489 sia dovuta alla maggiore prevalenza di pazienti con fenotipo meno aggressivo, carente negli altri gruppi presi in esame. A conferma di una maggiore controllabilità della malattia nei soggetti TNF-T di MI rispetto a quelli di UD, ci sono il minor numero di articula-

Tabella IV-V - Caratteristiche demografiche, cliniche e serologiche dei pazienti dei diversi gruppi distinti sulla base del genotipo del polimorfismo +489 del TNF- α .

Classe di pazienti genotipo +489 TNF- α	TNF-T UD		MTX-R UD	
	GG	AG/AA	GG	AG/AA
n° pazienti	18	4	24	10
SESSO (% donne)	100%	100%	91,7%	67%
ETA' (anni)	59 (27-75)	48,5 (40-58)	58,5 (28-80)	64,5 (25-85)
ETA' ESORDIO (anni)	40 (27-70)	28,5 (14-43)	50 (25-71)	51 (14-75)
DURATA MALATTIA	7,5 (2-40)	23 (9-26)	7,5 (1-23)	11 (0,3-51)
ARTIC. TUM.	23 (7-55)	24 (10-42)	0,5 (0-3)	1 (0-3)
ARTIC. DOL.	36 (3-68)	28,5 (13-31)	1 (0-20)	3 (0-30)
MAN. EXTRART.	23,3%	75%	41,6%	33%
CLASSE FUNZIONALE	16,6% I cl.	25% I cl.	87,5% I cl.	66% I cl.
DURATA TERAPIA	8 (1,5-40)	14,5 (9-23)	6 (1-23)	11 (0,1-27)
FR positività	66%	50%	50%	40%
VES mm/h	68 (21-131)	48 (21-104)	17 (5-70)	23,5 (15-60)
PCR mg/L	39 (7-137,4)	28 (15-105)	3,5 (0,3-43)	3,2 (0,4-33)
Classe di pazienti genotipo +489 TNF- α	TNF-T MI		MTX-R MI	
	GG	AG/AA	GG	AG/AA
n° pazienti	20	14	7	3
SESSO (% donne)	90%	100	100%	33%
ETA' (anni)	52,5 (31-72)	53,5 (25-79)	47 (34-68)	40 (37-69)
ETA' ESORDIO (anni)	38 (19-69)	28,5 (17-58)	45 (27-57)	34 (32-66)
DURATA MALATTIA	14 (2-29)	15 (6-39)	5 (2-15)	3 (3-8)
ARTIC. TUM.	10 (7-22)	8 (6-18)	0 (0-1)	3 (1-3)
ARTIC. DOL.	13 (1-27)	10 (3-28)	0 (0-1)	1 (1-3)
MAN. EXTRART.	75%	50%	assenti	assenti
CLASSE FUNZIONALE	25% I cl.	35,7% I cl.	100% I cl.	66% I cl.
DURATA TERAPIA	13 (2-25)	10,5 (5-30)	4 (1-10)	3 (1-6)
FR positività	75%	64%	71,4%	66%
VES mm/h	60 (16-84)	61,5 (10-93)	21 (10-58)	18 (15-42)
PCR mg/L	21,5 (3-104)	34 (1-131)	4 (1-18)	15 (4-33)

Tabella VI - Frequenza del genotipo AG/AA del polimorfismo +489 nei pazienti TNF-T di UD e MI distinti in base alla durata di malattia maggiore o minore/uguale a 10 anni. L'età d'esordio è espressa sotto forma di mediana, tra parentesi il minimo ed il massimo.

Durata Malattia	TNF-T UD (n)		TNF-T MI (n)	
>10 anni	41% (9)		76% (23)	
	Età esordio	27 (14-56)	Età esordio	38 (19-69)
	AG/AA +489	33.3%	AG +489	43%
≤10 anni	59% (13)		24% (11)	
	Età esordio	49 (25-70)	Età esordio	45 (17-69)
	AG/AA +489	7.6%	AG +489	36%

zioni tumefatte (9-range 6/22- versus 21- range 6-55) e la maggior durata globale della terapia progressiva (12 anni – range 2/30- versus 9 – range 1.5/40).

DISCUSSIONE

In letteratura numerosi dati suggeriscono un possibile ruolo dell'omozigosi GG dei polimorfismi –238 e +489 del gene del TNF- α nell'espressione fenotipica radiologicamente aggressiva della malattia reumatoide (14-19). Il nostro studio ha affrontato il problema dal punto di vista clinico complessivo. Tra i pazienti con AR afferenti rispettivamente alle Cliniche Reumatologiche di Udine e Milano, sono stati selezionati quei soggetti che, avendo dimostrato una totale non responsività alle terapie convenzionali di combinazione, sono stati indirizzati verso una terapia di rescue con agenti anti-TNF- α (7). Questi pazienti sono stati messi a confronto con un gruppo di pazienti ottimamente responsivi alle terapie di combinazione. La risposta clinica è stata definita sulla base della persistente remissione, secondo i criteri proposti da Scott et al. (22). Tutti i pazienti con fenotipo aggressivo-non responsivo (siglati TNF-T) hanno dimostrato una totale segregazione del genotipo GG del polimorfismo –238, mentre tra i pazienti responsivi (MTX-R) si è riscontrata una percentuale di soggetti eterozigoti (4.5%), anche se inferiore al gruppo dei controlli (8.8%). Il dato conferma che l'assetto omozigote GG nel sito –238 del promotore del TNF- α , già più prevalente del normale nella popolazione reumatoide complessiva, sia in qualche modo legato ad una malattia più severa ed aggressiva. I risultati concernenti il polimorfismo +489 sono invece di più difficile interpretazione. La più recente letteratura mette in luce una significativa associazione tra progressione radiologica del

danno articolare ed omozigosi GG del +489, concludendo per un effetto protettivo dell'allele A nei confronti dell'erosione sinoviale (14-16). I nostri risultati supportano solo in parte queste conclusioni. Mentre l'analisi della sola popolazione udinese mostra un netto trend verso una prevalenza dell'omozigosi GG nel gruppo di pazienti TNF-T rispetto ai pazienti responsivi (81.8% versus 70.6%), che non si discostano molto dai controlli sani (68.9%), i dati ottenuti sui pazienti di Milano controvertono questo risultato, in quanto i soggetti non responsivi mostrano una percentuale di GG (58.9%) inferiore a quella dei responsivi (70%). Probabilmente il significato di questa considerevole differenza dal punto di vista genetico è da ricercarsi nelle caratteristiche clinico-patologiche dei due gruppi TNF-T di UD e MI, che appaiono sicuramente diversi per quanto riguarda soprattutto il numero di articolazioni tumefatte e dolenti, la durata della malattia, la durata della terapia prima dell'ultimo inquadramento terapeutico e la presenza di manifestazioni extra-articolari. I pazienti di UD mostrano mediamente un'attività di malattia più importante di quelli di MI, come testimonia il maggior numero di articolazioni tumefatte e dolenti. Per contro, nel gruppo milanese c'è una più consistente presenza di manifestazioni extra-articolari. Ma più interessante è ciò che si scopre suddividendo i due gruppi di pazienti sulla base della durata della malattia, (cut-off: 10 anni), infatti la maggior parte dei pazienti di UD ha una durata di malattia inferiore ai 10 anni (59%), mentre la maggior parte dei pazienti TNF-T di MI (76%) ha una durata di malattia superiore ai 10 anni. Tuttavia in entrambi i casi i soggetti con genotipo AG/AA si concentrano nel sottogruppo con maggiore durata di malattia. Quindi, sulla base di queste ultime considerazioni, si può concludere che:

1) la popolazione severa-aggressiva di UD è stata giudicata tale più precocemente di quella di MI,

ossia il fenotipo aggressivo-severo è comparso più rapidamente nei pazienti di UD che in quelli milanesi;

- 2) la presenza di almeno un allele A del polimorfismo +489 sembra associarsi ad una insorgenza più precoce, ma anche ad una progressione più lenta e terapeutamente controllabile della malattia reumatoide;
- 3) le differenze genetiche sono almeno in parte imputabili alla prevalenza di soggetti con diverso decorso clinico.

Se dunque le differenze nei parametri clinici valutati nei due gruppi di pazienti possono suggerire una possibile interpretazione dei risultati genetici, appare chiaro che, quale che sia l'evoluzione della malattia, il polimorfismo +489 sembra essere estremamente meno significativo del polimorfismo -238 nel predire l'outcome della malattia reumatoide.

I dati riportati in letteratura riguardo il meccanismo con cui le varianti polimorfiche considerate in questo studio possano influenzare il fenotipo della malattia reumatoide sono controversi (17-20), ma i ri-

sultati del presente lavoro sembrano nuovamente suggerire che il polimorfismo -238 giochi un ruolo, seppure parziale, nell'esacerbazione dell'aggressività dell'AR, configurandosi come uno dei marcatori più interessanti della forma più grave di questa affezione. L'interpretazione funzionale più immediata è certamente la correlazione della variante allelica G con una maggiore produzione della proteina TNF- α , ma, come già detto, i dati finora riportati in proposito sono molto discordanti. In alternativa, si può supporre che l'allele G sia parte di una più vasto contesto genetico, responsabile globalmente dell'alterazione della sinovia reumatoide. In altre parole, qualora collegato alla presenza di altre variazioni genetiche in loci importanti nell'ambito della biologia della progressione patologica, potrebbe partecipare all'estrinsecarsi del fenotipo più severo ed aggressivo della malattia. Studi ulteriori sono in corso in entrambe le direzioni, al fine di chiarire se il polimorfismo del gene del TNF- α sia direttamente o indirettamente coinvolto nel determinare il decorso clinico del paziente con AR.

RIASSUNTO

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare la prevalenza dei polimorfismi -238 e +489 del TNF- α nella popolazione reumatoide con malattia più severa e non responsiva alle terapie convenzionali. I pazienti non-responsivi (TNF-T) sono stati confrontati con un gruppo di pazienti responsivi al MTX o ad altri DMARDs convenzionali (MTX-R). Il genotipo GG del polimorfismo -238 ha dimostrato di segregare in modo assoluto nel gruppo TNF-T, mentre i soggetti MTX-R mostrano una percentuale di AG simile alla popolazione di controllo. Il polimorfismo +489 non mostra differenze significative nelle diverse popolazioni esaminate, anche se l'allele A, seppur associato ad un esordio più precoce, sembra predisporre ad una malattia più a lungo controllabile. In conclusione, il genotipo GG del -238 può essere considerato un importante cofattore nel determinare un decorso clinico più severo e resistente nell'ambito dell'AR.

Parole chiave: TNF- α , gene, fattori di suscettibilità, artrite reumatoide.

Key words: TNF- α , gene, disease susceptibility, rheumatoid arthritis.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferraccioli GF, Bartoli E. Xenobiotics or biological response modifiers? Methotrexate remains the anchor drug for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 662-66.
2. Kremer JM. Methotrexate and emerging therapies. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17 (Suppl.18): S43-46.
3. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. TNF-alpha - a pivotal role in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1992; 31: 293-8.
4. Elliot MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Bijl H et al. Treatment with a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor suppresses disease activity in rheumatoid arthritis: results of a multicenter randomized, double blind trial. *Lancet* 1994; 344: 1105-10.
5. Lipsky PE, van der Heijde DMFM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR. Infliximab and methotrexate in the treatment of RA. *N Engl J Med* 2000; 343: 1594-602.
6. Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1586-93.
7. Furst DE, Breedveld FC, Burmester GR, Crofford JJ, Emery P, Feldmann M et al. Updated consensus statement on tumor necrosis factor blocking agents for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59 Suppl.1: 1-2.

8. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF-alpha therapy of Rheumatoid Arthritis: What have we learned? *Ann Rev Immunol* 2001; 19: 163-96.
9. Van Zeben D, Breedveld FC. Prognostic factors in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 44: 31-3.
10. Van der Heyde DM, van Riel PL, Van Leeuwen MA, Vant'Hof MA, van Rijswijk MH, Van de Putte LB. Prognostic factors for radiographic damage and physical disability in early rheumatoid arthritis: a prospective follow-up study of 147 patients. *Br J Rheumatol* 1993; 31: 519-25.
11. Albani S, Carson DA, Roudier J. Genetic and environmental factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 229-40.
12. Campbell RD, Trowsdale J, Raqoussis J. Map of the human major histocompatibility complex. *Immunol Today* 1993; 14: 439-352.
13. Allen RD. Polymorphism of the human TNF- α promoter – random variation or functional diversity? *Mol Immunol* 1999; 36: 1017-27.
14. Verweij CL. Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 Suppl.1: 20-26.
15. Brinkman BMN, Huizinga TWJ, Kurban SS, Van der Velde EA, Schreuder GMTh, Hazes JMW, et al. Tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol* 1997; 36: 516-21.
16. Van Krugten MV, Huizinga TWJ, Kaijzel EL, Zanelli E, Drossaers-bakker KWJ, Van de Linde P, et al.. Association of the TNF +489 polymorphism with susceptibility and radiographic damage in rheumatoid arthritis. *Genes and Immunity* 1999; 1: 91-6.
17. Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol* 1995; 42: 501-4.
18. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HL, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor- α on transcription activation. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3195-9.
19. Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BMN, Huizinga TWJ, Van der Straaten T, Hazes JMN, et al. Functional analysis of a human tumor necrosis factor- α (TNF- α) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 1998; 4: 724-33.
20. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf, RE et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriatic patients carrying the TNF- α 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 1180-3.
21. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
22. Scott DL, Panaji GS, Van Riel PLCM, Smolen J, Van de Putte LBA and the consensus study group of the European Workshop for Rheumatology. Disease activity in Rheumatoid Arthritis: preliminary report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 521-5.