



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Esofagitis Eosinofilikoaren RNA
bidezko diagnostiko ez
inbaditzaileko proposamen
berria**

*Maialen Sebastian de la Cruz,
Koldo Garcia Etxebarria,
Luis Manuel Mendoza, Carol Julyssa
Cobian, Sonsoles Tamarit, J
ose Ramon Bilbao, Luis Bujanda,
Alfredo J. Lucendo eta
Ainara Castellanos Rubio*

131-136 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.17>



Esofagitis Eosinofilikoaren RNA bidezko diagnostiko ez inbaditzailerako proposamen berria

Sebastian-delaCruz, M.^{1,2}, Garcia-Etxebarria, K.³, Mendoza, L.M.¹, Cobian, C.J.³, Tamarit, S.⁴, Bilbao, J.R.^{1,2,5}, Lucendo, A.J.⁴, Bujanda, L.³, Castellanos-Rubio, A.^{1,2,5,6}

¹ Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalia Fisiologia Departamentua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa

² Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua, Barakaldo

³ Gastroenterologia Departamentua, Biodonostia Osasun Ikerketa Institutua, CIBERehd, Euskal Herriko Unibertsitatea, Donostia

⁴ Gastroenterologia Departamentua, Tomellosoko Ospitale Nagusia, CIBERehd, La Princesa Osasun Ikerketa Institutua, Tomelloso (Ciudad Real)

⁵ CIBERDEM, Carlos III Osasun Institutua, Madril

⁶ IKERBASQUE, Zientziarako Euskal Fundazioa, Bilbo
maialen.sebastian@ehu.eus

Laburpena

Esofagitis Eosinofilikoa (EoE) gaixotasun inflamatorio kronikoa da, eta bere diagnostikoa esofagoko biopsien eskuratzean eta hauen analisisan oinarritzen da. Endoskopia metodo inbaditzailea izanik, lan honen helburua mRNA adierazpenean oinarritutako diagnostikorako metodo ez inbaditzaile berria proposatzea da. Horretarako, 68 gene hautagaien mRNA adierazpena aztertu genuen EoE gaixoen eta kontrolen ahoko mukosa laginetan, eta *HIPK3* eta *PRR15L* geneek aurkeztu zituzten emaitza onenak. Haien mRNA adierazpen balioak kontuan izanik EoE gaixo aktiboak eta kontrolak bereizteko gai izan gara, %80ko asmatze tasarekin. Beraz, ahoko mukosako mRNA adierazpen balioak EoEren diagnostiko ez inbaditzailerako biomarkatzaile egokiak izan daitezkeela uste dugu.

Hitz gakoak: EoE, diagnostiko ez inbaditzailea, aho mukosa, mRNA adierazpena, *HIPK3*, *PRR15L*

Abstract

Eosinophilic esophagitis (EoE) is a chronic inflammatory disease for which diagnosis relies on acquisition of esophageal biopsies and their analysis. Since endoscopy is an invasive procedure, the aim of this work is to propose a novel mRNA expression-based non-invasive EoE diagnostic method. To do so, mRNA expression of 68 candidate genes was analyzed in the oral cavity of EoE patients and controls. HIPK3 and PRR15L showed the best results. Taking into account these genes' mRNA expression values, we were able to distinguish EoE active patients from controls, with a predictive rate of 80%. Thus, we believe that mRNA expression analysis of the oral cavity is a good non-invasive EoE diagnostic tool.

Keywords: EoE, non-invasive diagnosis, oral cavity, mRNA expression, HIPK3, PRR15L

1. Sarrera eta motibazioa

Esofagitis eosinofilikoa gaixotasun inflamatorio kronikoa da. Eosinofiloen infiltrazioa esofagoko mukosan eta esofagoaren disfuntzioa dira bere ezaugarri nagusiak, eta diagnostikorako erabiltzen diren kriterioak. EoEren prebalentzia azkar igo da azken bi hamarkadetan, gaixotasunaren ezagutza emendatu eta diagnosirako irizpideak zehaztu ahala. Gaur egun, EoE esofagitis kronikoaren bigarren eragile nagusia da, errefluxu gastroesofagikoaren atzetik, eta disfagiaren kausa ohikoena haurren eta gazteen artean (Hirano et al., 2020; Navarro et al., 2019).

Gaixotasunaren diagnostikorako, aipatutako irizpideak konfirmatu behar dira gaixoaren esofagoan bertan. Horretarako, endoskopia egitea beharrezkoa da, esofagoaren biopsiak eskuratu eta horien analisisa egin ahal izateko. Gutxienez 6 biopsia hartzea gomendatzen da esofagoko bi toki desberdinetik (normalean goiko eta beheko erditik hiruna biopsia), eta mukosa esofagikoan

anomalia endoskopikoetan arreta jarrita (Lucendo et al, 2017). Biopsia horietan esofagoaren egitura, morfologia eta egon daitekeen eosinofiloen infiltrazioa aztertzen dira. Azken horretarako potentzia handiko eremu bakoitzeko (HPF, *High Power Field* ingelesezko hitzetatik) eosinofiloak zenbatzen dira. Kontaketa horretan 15 eosinofiloko langak %100eko sentsibilitatea eta %96ko espezifikotasuna erdiesten ditu diagnosian. Hori dela eta, bera da gehien erabiltzen den diagnostikorako irizpidea (Dellon et al., 2015).

Azkenik, endoskopia eta biopsien eskuratzeari anestesiatan egiten badira ere (nahiz eta urria izan, horrek suposatzen dezakeen arriskuarekin) prozedura desatsegin eta inbaditzaileak dira pazienteentzat, batez ere haurrentzat. Horregatik, EoEko diagnostiko metodo ez inbaditzaile baten beharra ikusten dugu, endoskopia ekidin edota kopurua murriztu ahal izateko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaixotasunaren berezko gene-adierazpen balioetan oinarritutako biomarkatzaileak tresna baliagarriak dira gaixotasuna aurreikusteko. EoEren kasuan, hainbat gene-adierazpen analisi burutu dira dagoeneko eta ezagunak dira gaixotasunean ezberdin adierazten diren geneak. Dena dela, analisi horiek EoE gaixoen biopsia laginetan burutu dira (Wen et al., 2015; Wheeler et al., 2019); beraz, oso tresna interesgarria eta baliagarria den arren, endoskopia prozedura beharrezkoa da horietan ere.

Ahoa digestio aparatuko lehen atala da, eta hori kontuan izanik ahoko mukosak digestio aparatuan beherago dauden mukosen antza izan dezakeela hipotetizatu da; beraz, esofagoan gerta daitezkeen aldaketak ahoko mukosan ere beha daitezkeela uste dugu. Izan ere, ahoak eta esofagoak epitelio ezkatatsuen patologia bera dutela eta biomarkatzaile gisa erabili ahal diren proteina eta RNA molekula ugari daudela iradoki da (Hayat et al., 2015).

Hori guztia kontuan izanik, ikerketa honen helburu nagusia EoEren diagnostikorako aho mukosaren laginetan burutzeko metodo ez inbaditzailea proposatzea da, geneen adierazpenen oinarrituta (zehazki mRNA mailetan). Horretarako, bi azpi helburu planteatu ditugu:

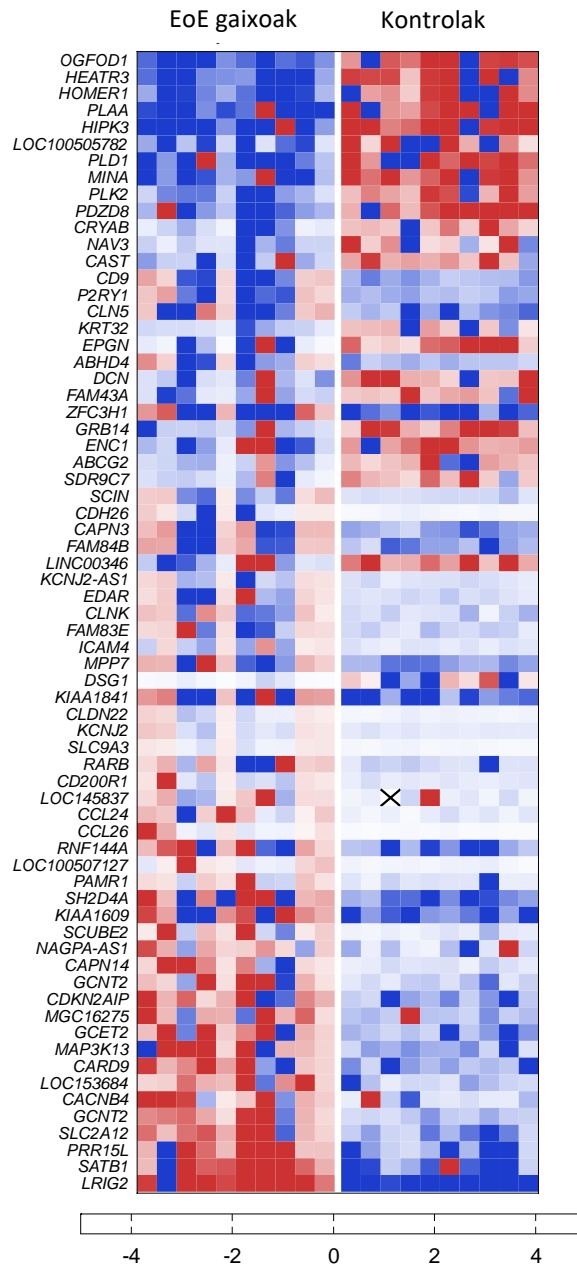
- 1) Esofagoko biopsietan adierazten diren geneak, ahoko mukosa-laginetan ere kuantifikatzeko gai garelako ziurtatzea, eta gene horien adierazpen aldaketak berrestea.
- 2) Aho mukosaren laginetatik abiatuz EoE diagnostikatzeko biomarkatzaile egokiak aurkitzea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Gene hautagaien aukeraketa eta konfirmazioa aho mukosetako laginetan

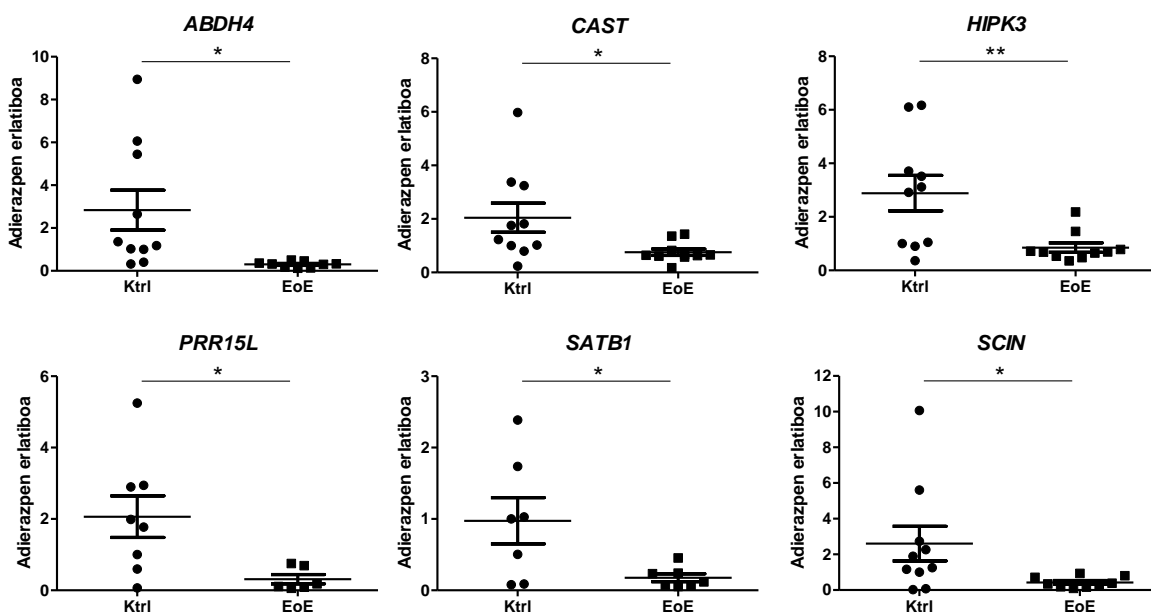
Aho mukosan aztertuko ziren gene-hautagaiak aukeratzeko, EoE pazienteen eta kontrolen biopsien adierazpena publikoki eskuragarri dagoen RNAseq esperimendu batetik (Wheeler et al., 2019) eskuratu genituen. Bertatik, EoE kasuen eta kontrolen artean adierazpen maila ezberdina zuten 68 gene hautagai aukeratu genituen; horietatik 45 gainadierazita eta 23 azpiadierazita zeuden (1. Irudia).

1. irudia. RNAseq-eko datuetan oinarritutako mRNA adierazpen balioen bero-mapa. Lerroetan geneak eta zutabeetan giza laginak irudikatu dira. Karratutxo bakoitzean, ilarako genearen adierazpen erlatiboa ikus daiteke. Kolore urdinak eta gorriak adierazpen-maila baxua eta altua adierazten dituzte, hurrenez hurren.

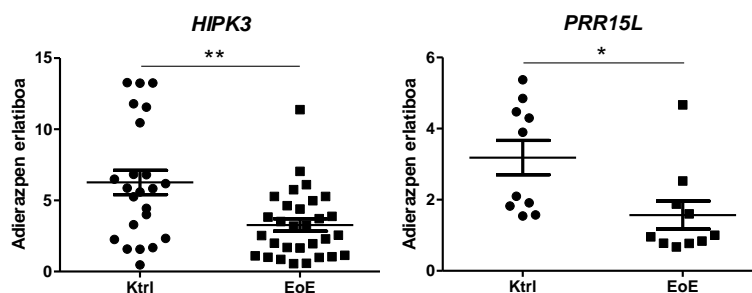


Gene hautagai horiek aho mukosan ere adierazten ote ziren aztertu genuen 10 EoE paziente eta 10 kontrolatan. Horretarako, lehendabizi RNA erauzi genuen aho mukosako laginetatik. Orokorrean RNA kantitate baxuak lortzen dira lagin mota honetatik. Hori dela eta, gene hautagaien kuantifikaziorako RT-qPCR (RNAren alderantzizko transkripzioa-PCR kuantitatiboa) teknika erabili genuen. Izan ere, RT-qPCRaren abantailetakoa bat, RNA kantitate baxuekin lan egiteko aukera eskaintzen duela da. Guztira 29 generen adierazpena kuantifikatu ahal izan genuen, erdia baino gutxiago, %43a hain zuzen. Horietatik 6 genek (*ABDH4*, *CAST*, *HIPK3*, *PRR15L*, *SATB1*, *SCIN*) taldeen arteko adierazpen aldaketa esanguratsuak aurkeztu zituzten (2. Irudia).

2. irudia. Lehenengo kohortean modu esanguratsuan ezberdin adierazitako geneen mRNA adierazpen erlatiboak. 10 kontrol (Ktrl) eta 10 EoE gaixoen (EoE) mRNA adierazpena neurtu genuen. Gene bakoitzaren adierazpen balioak *GAPDH* gene etxezainarekiko erlatibizatu ziren. Estatistika kalkuluak Student t testarekin egin ziren, * $p < 0,05$ eta ** $p < 0,01$ esan nahi dutelarik.



3. irudia. Bigarren kohortean modu esanguratsuan ezberdin adierazitako geneen mRNA adierazpen erlatiboak. 25 kontrol (Ktrl) eta 37 EoE gaixoen (EoE) mRNA adierazpena neurtu genuen. Gene bakoitzaren adierazpen balioak *GAPDH* gene etxezainarekiko erlatibizatu ziren. Estatistika kalkuluak Student t testarekin egin ziren, * $p < 0,05$ eta ** $p < 0,01$ esan nahi dutelarik.



3.2. Gene hautagaiak biomarkatzaile gisa baliozkotzea

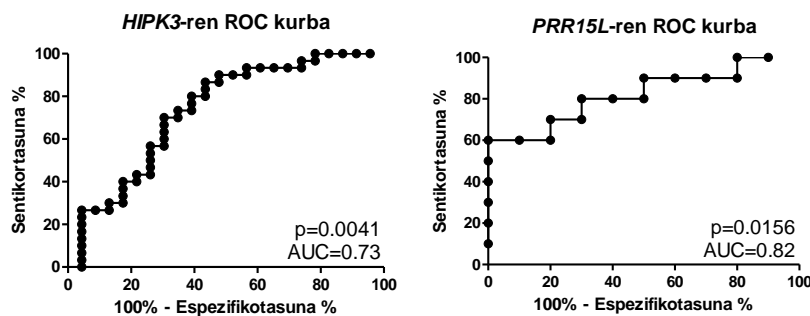
Lehenengo analisisian konfirmatutako sei geneen adierazpena 37 EoE gaixo aktiboren eta 25 kontrolen lagin multzo handiagoan aztertu ziren. Horietako bi genetako, *HIPK3* eta *PRR15L*, EoE eta kontrolen arteko adierazpen aldaketa berretsi genuen, nahiz eta *PRR15L* genearen adierazpena laginen herenean baino ez antzeman, seguruenik esperimentuan erabilitako RNA kantitatea baxua zelako (3. Irudia).

Bi gene horien adierazpenaren iragarpen ahalmena kalkulatzeko eta biomarkatzaile egokiak izan daitezkeen ebaluatzeko gene bakoitzaren ROC (*Receiver Operating Characteristic* ingelesezko hitzetatik) kurbaren analisia burutu genuen. ROC kurba balio jarraiak ematen dituzten diagnostiko-probetan ebakitze puntua aukeratzeko erabiltzen den funtzio matematikoa da. Ebakitze puntu posible desberdinekin lortutako sentikortasun eta espezifikotasun balioekin ROC izeneko kurba irudikatzen du. Gainera, ROC kurbaren azpiko area (AUC, *Area Under the Curve* ingelesezko hitzetatik) diagnostiko probaren indarraren adierazletzat hartzen da, eta

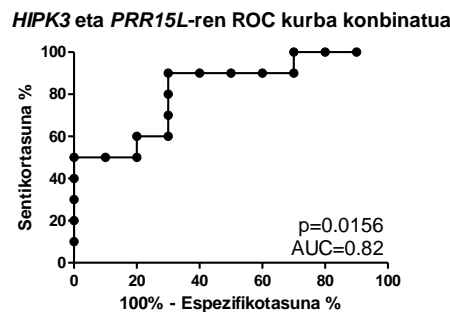
edozein paziente zuzen diagnostikatzeko probabilitatea islatzen du. *HIPK3* genearen kasuan, AUC balioa 0,73 izan zen, eta %73,3ko sentikortasuna eta %65,2ko espezifikotasuna lortu genituen. *PRR15L*ren kasuan berriz, AUC balioa 0,80 izan zen, eta %80ko sentikortasuna eta %70eko espezifikotasuna lortu genituen (4. Irudia).

Honez gain, bi geneak konbinatuta lor daitekeen iragarpen ahalmena ere kalkulatu genuen. Erregresio logistikoa erabili genuen bi geneen adierazpen balioak konbinatzeko, eta berriro burutu genuen ROC kurbaren analisia. ROC kurba konbinatua geneak bakarka aztertzea baino eraginkorragoa zela ikusi genuen. Izan ere, 0,82ko AUC balioa, %90eko sentikortasuna eta %70eko espezifikotasuna lortu genuen (5. Irudia).

4. irudia. *HIPK3* eta *PRR15L* geneen bakarkako ROC kurbak. ROC kurbaren puntu bakoitza (zirkulu beltzak) diagnostiko probaren ebakitze puntu posible bati dagokio, eta dagokion sentikortasuna (Y ardatza) eta espezifikotasuna (X ardatza) jakinarazten dizkigu. AUC=Kurbaren azpiko area.



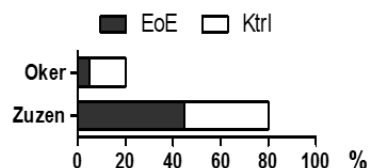
5. irudia. *HIPK3* eta *PRR15L* gene konbinazioaren ROC kurba. ROC kurbaren puntu bakoitza (zirkulu beltzak) diagnostiko probaren ebakitze puntu posible bati dagokio, eta dagokion sentikortasuna (Y ardatza) eta espezifikotasuna (X ardatza) jakinarazten dizkigu. AUC=Kurbaren azpiko area.



4. Ondorioak

HIPK3 eta *PRR15L* geneen mRNA adierazpen balioetan oinarrituta EoE gaixo aktiboak eta kontrolak bereizteko gai izan gara, %80ko asmatze tasarekin (6. Irudia). Beraz, ahoko mukosetako mRNA adierazpen balioak EoEren diagnostiko ez inbaditzaileako biomarkatzaile egokiak izan daitezkeela uste dugu. Izan ere, sentikortasun eta espezifikotasun balio altuak lortu ditugu ere, eta ondorioz iragarpen ahalmen handiko diagnostiko proba garatzeko aukera egon daitekeela aurreikusten dugu, %100ean asmatu ez arren, metodo tradizional eta inbaditzailearen aldean merkeagoa eta erosoagoa izango litzatekeena.

6. irudia. HIPK3 eta PRR15L gene konbinazioaren diagnostikorako iragarpen ahalmena. Gris ilunez EoE gaixoak adierazi dira (EoE), eta zuriz kontrolak (Ktrl). Bi taldeak kontuan hartuta, kasu guztien %80an, EoE gaixoak edota kontrolak ondo diagnostikatuak izan dira.



5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Alde batetik *PRR15L* mRNA adierazpenaren kuantifikatzeko ahalmena emendatu beharko genukeela uste dugu. Izan ere, bigarren kohorteko laginen herenean soilik kuantifikatu ahal izan dugu *PRR15L* genearen adierazpena. Beraz, kuantifikazio ahalmena hobetuz gero, RNA kantitate gehiago erabiliz adibidez, etorkizunean lagin gehiagoren adierazpen datuak izango genituzke eta ondorioz, emaitzak osatuagoak lortuko genituzke.

Bestetik, ikerketa honetan EoE gaixo aktiboak baino ez ditugu kontuan izan, hau da, laginketa momentuan tratamendurik jasotzen ez zutenak eta gaixotasunaren irizpideak betetzen zituztenak soilik erabili genituen. Etorkizunean, ikerketa hau gaixoen talde desberdinetara ere zabaldu nahi dugu, gaixotasunaren egoeraren arabera burutu ahal izateko.

6. Erreferentziak

- Dellon ES, Speck O, Woodward K, et al. (2015), Distribution and variability of esophageal eosinophilia in patients undergoing upper endoscopy, *Mod Pathol*, 28, 383–390.
- Hayat JO, Gabieta-Somnez S, Yazaki E. et al. (2015), Pepsin in saliva for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease, *Gut*, 64(3), 373-380.
- Hirano I, Chan ES, Rank MA et al. (2020), AGA Institute and the Joint Task Force on Allergy-Immunology Practice Parameters Clinical Guidelines for the Management of Eosinophilic Esophagitis. *Gastroenterology*, 158(6), 1776-1786.
- Lucendo AJ, Molina-Infante J, Arias Á et al. (2017), Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults, *United European Gastroenterol J*, 5(3), 335-358.
- Navarro P, Arias Á, Arias-González L et al. (2019), Systematic review with meta-analysis: the growing incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis in children and adults in population-based studies, *Aliment Pharmacol Ther*, 49(9), 1116-1125.
- Wen T, Stucke EM, Grotjan TM, et al. (2013), Molecular diagnosis of eosinophilic esophagitis by gene expression profiling, *Gastroenterology*, 145(6), 1289-1299.
- Wheeler JC, Vanoni S, Zeng C, et al. (2019), 17β-Estradiol protects the esophageal epithelium from IL-13-induced barrier dysfunction and remodeling, *J Allergy Clin Immunol*, 143(6), 2131-2146.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honek ACRri emandako Espainiako Zientzia, Unibertsitate eta Berrikuntza Ministerioaren (SAF2017-91873 - EXP), Eusko Jaurlaritzako Osasun Sailaren (EJ-2017111082) eta Madrileko Asociación de Celiacos y Sensibles al Gluten erakundearen beken laguntza izan du. MSdIC doktoradutza burutzen ari da Euskal Herriko Unibertsitateko doktorego aurreko beka bati esker. Honez gain, alde batetik, nire lankideak eta zuzendariak, eta bestetik, laginak jaso dituzten medikuak ere eskertu nahi nituzke.