

# El polimorfismo CTLA4 p.Thr17Ala (c.49A>G) se asocia con el desarrollo de inhibidor en pacientes argentinos con hemofilia A severa

CTLA4 p.Thr17Ala (c.49A>G) polymorphism associates with inhibitor development in argentine patients with severe hemophilia A

Marchione VD<sup>1</sup>, Radic CP<sup>1</sup>, Abelleyro MM<sup>1</sup>, Primiani L<sup>2</sup>, Neme D<sup>2</sup>, Candela M<sup>3</sup>, de Tezanos Pinto M<sup>2,3</sup>, De Brasi CD<sup>1,3</sup>, Rossetti LC<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Experimental (IMEX) CONICET Academia Nacional de Medicina, Argentina.

<sup>2</sup>Fundación de la Hemofilia Alfredo Pavlovsky, Argentina.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R Castex, Academia Nacional de Medicina, Argentina.

vaninamarchione@gmail.com

MEJOR COMUNICACIÓN ORAL DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MARCO DEL XII CONGRESO ARGENTINO DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS

Fecha de recepción: 31/10/2016  
Fecha de aprobación: 01/12/2016



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA  
Volumen 20 n° 3: 292 - 297  
Septiembre - Diciembre 2016

**Palabras clave:** F8, HEMA, inhibidores-FVIII, CTLA4.

**Keywords:** F8, HEMA, FVIII-inhibitors, CTLA4.

## Resumen

El desarrollo de inhibidores de FVIII en hemofilia A (HA) es considerado un rasgo complejo, ya que involucra factores genéticos y ambientales, siendo el genotipo del gen del factor VIII (*F8*) el factor condicionante más importante, seguido por factores genéticos secundarios, más débiles.

Se estimaron los riesgos de inhibidor asociados a cada genotipo-*F8* mediante un estudio de casos/controles en pacientes HA-severos (n=390), que caracteriza especialmente el estrato con la Inv22 (inversión del intrón 22). El cálculo de la prevalencia

de inhibidor (IP) y *odds-ratio* (OR) con intervalos de confianza del 95% (IC95%) permitió clasificar tres grupos de riesgo (alto, medio y bajo) asociado a cada genotipo-*F8*. La asociación de factores genéticos secundarios se investigó mediante el análisis de concordancia/discordancia en el estatus de inhibidor en 17 pares de hermanos con la Inv22 vs pares al azar mostrando un OR(IC95%) de 1,83(0,69-4,85) (p=0,33), sugiriendo una tendencia a coincidir con el estatus de inhibidor del hermano.

Se realizaron estudios tipo caso/control del riesgo de

inhibidor en polimorfismos de *IL10*, *TNFA* y *CTLA4* en los estratos Inv22-positivo (n=140-148). *IL10* c.-1117A>G, *TNFA* c.-488G>A y *CTLA4* c.-319C>T mostraron tendencias de riesgo o protección similares a las reportadas, con ORs no significativos. *CTLA4* c.49A>G p.Thr17Ala mostró un incremento significativo del riesgo de inhibidor con OR de

2,61(1,27-5,36) (p=0,0096). Nuestros resultados concuerdan con especulaciones teóricas previas acerca de diferencias regionales en los factores secundarios no modificables. *CTLA4* p.Thr17Ala contribuye a aumentar el riesgo de inhibidor en nuestra población de pacientes con HA-severa.

### Abstract

FVIII inhibitor development in hemophilia A (HA) is considered a complex trait as it involves genetic and environmental factors; the causative factor VIII gene (*F8*) genotype has been established as the most important determining factor, followed by weaker secondary genetic risks factors. Risks of inhibitor development associated with each *F8*-genotype were estimated by a case/control study in HA-severe patients (n=390), which especially characterizes strata with Inv22 (intron 22 inversion). Inhibitor prevalence (IP) and odds ratio (OR) with confidence intervals of 95% (95%CI) calculations allowed classifying three risk groups (high, medium and low) associated with each *F8*-genotype. The association of genetic factors was investigated by analyzing concordance/discordance inhibitor-status in 17 pairs of brothers with Inv22 vs random pairs

showing 1.83(0.69 to 4.85) (p=0.33), suggesting a trend to agree the inhibitor status between siblings. Case/control studies associated risk inhibitor development with *IL10*, *TNFA* and *CTLA4* polymorphisms in Inv22-positive strata (n=140-148) were performed and in *IL10* c.-1117A>G, *TNFA* c.-488G>A & *CTLA4* c.-319C>T trends of risks or protection, similar to reported ones with not significant ORs. *CTLA4* c.49A>G p.Thr17Ala showed significantly increased inhibitor risks with OR of 2.61(1.27-5.36) (p=0.0096). Our findings agree with previous theoretical speculations about regional differences in non-modifiable secondary factors. *CTLA4* p.Thr17Ala, contributes to an increased risk of inhibitor in our population of patients with HA-severe.

### Introducción

La hemofilia A (HA) es una coagulopatía hereditaria recesiva ligada al cromosoma X, caracterizada por una actividad reducida del factor VIII de coagulación (FVIII:C), causada por mutaciones deletéreas en el gen del FVIII (*F8*). La HA es tratada satisfactoriamente mediante la administración intravenosa de FVIII, sin embargo, un 20-30% de los pacientes con HA-severa (FVIII:C < 1 IU/dL) desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el FVIII exógeno (inhibidor), haciendo ineficaz la terapia de reemplazo<sup>(1)</sup>. El desarrollo de inhibidor es considerado un rasgo complejo (multifactorial), que involucra factores modificables (ambientales) y no modificables (genéticos), siendo el tipo de mutación causal en el *F8* el principal factor condicionante de desarrollo de inhibidor<sup>(2,3)</sup>, aunque también cuentan un grupo de factores de riesgo secundarios, más débiles, como:

historia familiar de inhibidores<sup>(4)</sup>, grupo étnico-geográfico<sup>(5,6)</sup>, HLA (antígeno linfocitario humano)<sup>(7)</sup> y polimorfismos (PMF) ligados a genes del sistema inmune: interleuquina-10 (*IL10*)<sup>(8)</sup>, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (*TNFA*)<sup>(9)</sup> y el antígeno-4 del linfocito T citotóxico (*CTLA4*)<sup>(10)</sup>.

La evidencia en genética humana indica que los factores predisponentes asociados con genes autosómicos, como los antes mencionados, son étnicamente dependientes y, por lo tanto, no son consistentes entre las poblaciones de todo el mundo. En este escenario, se examinaron factores de riesgo de inhibidor secundarios relevantes: concordancia del estatus de inhibidor entre hermanos vs pares al azar; polimorfismos en *IL10*, *TNFA* y *CTLA4*- en una población de pacientes argentinos con HA-severa con la Inv22.

## Materiales y métodos

### Población estudiada

Se incluyeron 390 pacientes de todo el país con HA-severa cuya mutación en el *F8* había sido caracterizada, (116 casos con inhibidor [+]) y 274 controles, inhibidor [-]). En el estudio de asociación de concordancia de estatus de inhibidor entre hermanos vs pares al azar, se consideraron 34 hermanos de 17 familias con la Inv22. Para investigar los factores genéticos adicionales se analizaron 140-148 pacientes con la Inv22. Nuestro comité de ética institucional aprobó este estudio y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada paciente. El protocolo de estudio se realizó conforme a las normas éticas de la declaración de Helsinki 1975.

**Análisis molecular:** Se extrajo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica mediante la técnica de *salting out* y precipitación con etanol. La caracterización de la mutación en *F8* fue realizada según lo descrito por Rossetti y col. (2007)<sup>(11)</sup>. Se estudiaron cuatro PMFs de nucleótido simple (SNPs) en genes inmunorregulatorios: *IL10* c.-1117A>G (rs1800896) por PCR alelo específica<sup>(12)</sup>; *TNFA* c.-488G>A (rs1800629) por PCR-*NcoI*-artificial-RFLP (PMF de longitud de fragmentos de restricción)<sup>(13)</sup>; *CTLA4* c.-319C>T (rs5742909) por PCR-*MseI*-RFLP<sup>(14)</sup> y *CTLA4* c.49A>G (rs231775) por PCR-*KpnI*-RFLP<sup>(15)</sup>.

## Estadísticas

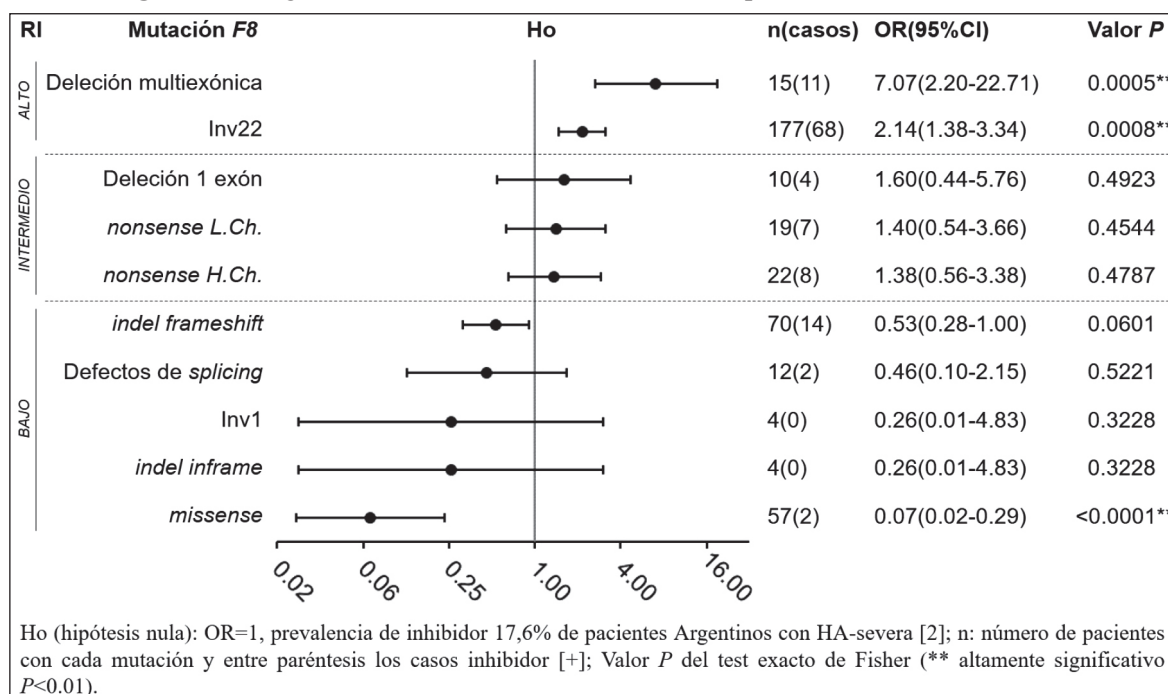
Los riesgos de inhibidor absolutos y relativos específicos del genotipo-*F8*, el análisis de estatus de concordancia/discordancia de inhibidor y la asociación del riesgo de inhibidor con PMFs en genes inmunes fueron estimados mediante estudios del tipo caso-control usando *odds ratio* (OR) e intervalos de confianza del 95% (95%CI).

## Resultados

### Riesgo de inhibidor del genotipo *F8* en pacientes con HA severa

El estudio caso-control en pacientes con HA severa, permitió estimar el riesgo relativo de inhibidor asociado a cada genotipo de *F8*, permitiendo su clasificación en mutaciones de alto riesgo de desarrollo de inhibidor a las deleciones multi-exón con OR(95%-CI) de 7,07(2,20-22,71) ( $p=0,0005$ ) y la Inv22 con 2,14(1,38-3,34) ( $p=0,0008$ ), en mutaciones de riesgo intermedio a los defectos sin sentido y deleciones de un exón, y de bajo riesgo representadas por mutaciones con sentido equivocado con 0,07(0,02-0,29) ( $p<0,0001$ ), por mencionar sólo las más frecuentes (**Figura 1**). La población informativa para la Inv22 ( $n=177$ ) mostró una prevalencia de inhibidor absoluta de 25%.

**Figura 1.** Riesgo relativo de desarrollo de inhibidor-tipo/localización mutación *F8*



**Estatus de concordancia/discordancia de inhibidor entre hermanos con la Inv22**

El estatus de concordancia vs discordancia de inhibidor entre pares de hermanos vs pares no relacionados (esperados por azar, Ho), mostró un OR(95%-CI) de 1,83(0,69-4,85) (p=0,33) que predice casi dos veces más chances de coincidir en el estatus de inhibidor entre hermanos que considerando los mismos individuos emparejados al azar.

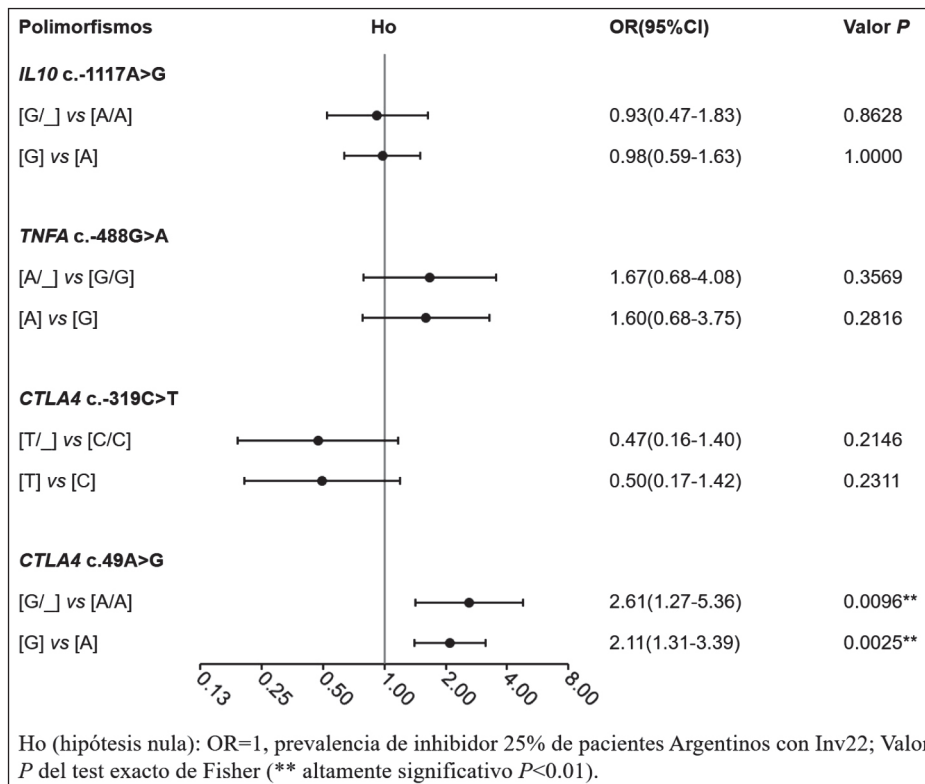
**Riesgo de inhibidor asociado a marcadores genéticos en genes inmuno-regulatorios**

El PMF en *IL10* c.-1117A>G mostró una distribución de alelos que no difirió entre pacientes con y sin inhibidores, mostrando ORs no significativos neutrales. El PMF en *TNFA* c.-488G>A mostró una

frecuencia del alelo [A] de 0,07, menor que en otras poblaciones. El genotipo heterocigota [A/G] fue algo mayor entre los pacientes con inhibidor con un OR no significativo de 1,67(0,68-4,08) (p=0,3569) (**Figura 2**).

El PMF *CTLA4* c.-319C>T presentó para el alelo [T] una tendencia protectora con un OR 0,47(0,16-1,40) (p=0,2146) no significativo. Finalmente, el PMF *CTLA4* c.49A>G p.Thr17Ala mostró un riesgo asociado a inhibidor altamente significativo asociado al alelo [G] con un OR de 2,11(1,31-3,39) (p=0,0025), que se mantiene también si se considera la combinación de genotipos [G/\_] (i.e., [G/G] y [A/G]) con un efecto dominante indicando un OR de 2,61(1,27-5,36) (p=0,0096) (**Figura 2**).

**Figura 2.** Riesgo de desarrollo de inhibidor: IL10, TNFA y CTLA4, estrato Inv22



**Discusión**

La clasificación obtenida en grupos de riesgo (alto, medio y bajo) asociado a cada genotipo-*F8*, concuerda con lo previamente publicado<sup>(2,3)</sup>, al igual que la tendencia observada de concordancia de estatus de inhibidor, tanto en estudios locales previos<sup>(2)</sup> como en lo reportado en el estudio internacional MIBS (*Malmö International Brother Study*)<sup>(4)</sup>, que sugie-

ren la presencia de factores genéticos adicionales. Estos factores adicionales han sido buscados principalmente sobre moléculas inmunomoduladores de relevancia, como PMFs en la región promotora de *IL10*, *TNFA* y *CTLA4* y el SNP en el péptido líder de *CTLA4*. El PMF *IL10* c.-1117A>G, asociado al desarrollo de inhibidor en series del norte de Europa<sup>(7)</sup>,

mostró una frecuencia de alelos similar en nuestra población, pero arrojó un comportamiento neutro (OR 0,93). El SNP c.-488G>A en *TNFA*, asociado a inhibidor en pacientes europeos<sup>(9)</sup>, mostró una tendencia moderada en heterocigosis [A/G] (no-significativa) (OR 1,67) en nuestra serie, quizás debido a la baja frecuencia del alelo [A]. El SNP *CTLA4* c.-319C>T fue reportado en series de pacientes europeos<sup>(10)</sup>, con un efecto protector para el desarrollo de inhibidor asociado al alelo [T], y en nuestra población se observó esa tendencia (OR 0,47), aunque no significativa, probablemente debido a la baja frecuencia del alelo. Por otro lado, el PMF *CTLA4* c.49A>G p.Thr17Ala ha sido asociado a susceptibilidad en enfermedades autoinmunes<sup>(17,18)</sup>, y específicamente en nuestra población, a la diabetes mellitus dependiente de insulina del adulto<sup>(16)</sup>. En el presente estudio presentó un riesgo significativo alto de asociación ( $p < 0,01$ ) entre el alelo [G] y el desarrollo de inhibidor en hemofilia con OR de 2,1, al igual que si es considerado con un efecto dominante (OR de 2,6), siendo la primera serie en la que *CTLA4* p.Thr17Ala (rs231775) se encuentra asociado significativamente con el desarrollo de inhibidor. Debido a las implicancias negativas sobre la salud y la economía del Sistema de Salud nacional, y a las diferencias en rasgos multifactoriales entre etnias y regiones geográficas<sup>(8-10)</sup>, es aconsejable desarrollar un puntaje de riesgo de inhibidor regionalmente relevante incluyendo todos los factores no modificables para ponderar la predisposición genética de cada paciente particular a desarrollar inhibidor.

#### Declaración de conflictos de interés:

**Primiani L**, declara que ha recibido honorarios por parte de Novo Nordisk en concepto de actividades educacionales en las que ha participado.

**Neme D**, declara que ha recibido honorarios por parte de Novo Nordisk, Baxter y Pfizer en concepto de conferencias y actividades educativas en las que ha participado.

**de Tezanos Pinto M**, declara que ha recibido honorarios por parte de Novo Nordisk por actividades educacionales en las que ha participado. El resto de los autores declaran no poseer conflictos de interés.

#### Bibliografía

1. Dargaud Y, Pavlova A, Lacroix-Desmazes S y col. Achievements, challenges and unmet needs for haemophilia patients with inhibitors: Report from a symposium in Paris, France on 20 November 2014. *Haemophilia*. 2016;**22** (1):1-24.
2. Rossetti LC, Szurkalo I, Radic CP y col. Factor VIII genotype characterization of haemophilia A affected patients with transient and permanent inhibitors: a comprehensive Argentine study of inhibitor risks. *Haemophilia*. 2013;**19**(4):511-8.
3. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J y col. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2012;**119**(12):2922-34.
4. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M y col. The Malmö International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica*. 2005;**90**(7):924-31.
5. Viel KR, Ameri A, Abshire TC y col. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med*. 2009;**360**(16):1618-27.
6. Gunasekera D, Ettinger RA, Nakaya S y col. Factor VIII gene variants and inhibitor risk in African American hemophilia A patients. *Blood*. 2015;**126**(7):895-904.
7. Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S y col. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2009;**7**(12):2006-15.
8. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A y col. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006;**107**(8):3167-72.
9. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J y col. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006;**108**(12):3739-45.

10. Astermark J, Wang X, Oldenburg J y col. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe HA. *J Thromb Haemost.* 2007;**5**:263-5.
11. Rossetti L, Radic C, Candela M y col. Sixteen novel HA causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica.* 2007;**92**(6):842-5.
12. Zheng C, Huang D, Liu L y col. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in multiple myeloma. *Int J Cancer.* 2001;**95**(3):184-8.
13. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI y col. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1992;**1**(5):353.
14. Deichmann K, Heinzmann A, Brüggelolte E y col. An Mse I RFLP in the human CTLA4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;**225**(3):817-8.
15. Hadj Kacem H, Bellassoued M, Bougacha N y col. CTLA-4 gene polymorphisms in Tunisian patients with Graves' disease. *Clin Immunol.* 2001;**101**(3):361-5.
16. Caputo M, Cerrone GE, López AP y col. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 heterozygous codon 49 A/G dimorphism is associated to latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Autoimmunity.* 2005;**38**(4):277-81.
17. Pavlova A, Diaz-Lacava A, Zeitler H y col. Increased frequency of the CTLA-4 49 A/G polymorphism in patients with acquired haemophilia A compared to healthy controls. *Haemophilia.* 2008;**14**(2):355-60.
18. Ueda H, Howson JM, Esposito L y col. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* 2003;**423**(6939):506-11.