

Avances en hemofilia

Advances in haemophilia

## Alteraciones genéticas en hemofilia A. Implicancias en el desarrollo de inhibidores

Haemophilia A genetic alterations.  
Implications in inhibitor development

Rossetti LC

Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-  
Academia Nacional de Medicina

rossetti@hematologia.anm.edu.ar



SIMPOSIO 5

HEMATOLOGÍA  
Volumen 20 • Número Extraordinario  
XII Congreso del Grupo CAHT: 180-184  
Septiembre 2016

**Palabras clave:** Hemofilia A,  
Genotipo-F8,  
Inhibidor.

**Keywords:** Haemophilia A,  
F8-genotype,  
Inhibitor.

La hemofilia es una coagulopatía hereditaria monogénica recesiva, ligada al cromosoma X, que se manifiesta en el varón hemicigota (46,XY) con una prevalencia de 1 en 5.000 en todas las poblaciones humanas, mientras que la mujer heterocigota (46,XX), portadora, no suele expresar síntomas de la enfermedad en la mayoría de los casos.

La hemofilia A (HA) se caracteriza por la presencia de mutaciones deletéreas en el gen del factor VIII de coagulación (*F8*) y la hemofilia B (HB) debida a mutaciones en el gen del factor IX (*F9*).

Clínicamente resultan indistinguibles, y los niveles de actividad del factor de coagulación en plasma se correlacionan con la severidad clínica de la hemofilia (desarrollo de artropatías, frecuencia de sangrados espontáneos internos y externos, etc.) por lo que la HA y la HB pueden clasificarse en severa, con actividad del FVIII:C o FIX:C menor a 1 UI/dl, moderada, entre 1 y 5 UI/dl, y leve, entre 5 y 30 UI/dl.

A pesar de estas similitudes, y quizás debido a las diferencias asociadas a la estructura molecular de los genes involucrados y a la heterogeneidad de las mutaciones que los afectan, la HA es 4-5 veces más frecuente que la HB.

El *F8* tiene 26 exones y abarca 187 kilobases (kb) en Xq28<sup>(1)</sup>. El *F8* codifica para un RNA mensajero (mRNA) de 9 kb. Entre los intrones del *F8* se destaca por su gran tamaño el intrón 22 (32 kb). El mRNA del *F8* codifica para un polipéptido de 2351 aminoácidos (aa) incluyendo un péptido señal de 19 aa y un FVIII maduro con una región triplicada de 330 aa (dominios A), una región única de 980 aa (dominio B) y una región duplicada de 150 aa (dominios C) en el orden: NH<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>-a<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-a<sub>2</sub>-B-a<sub>3</sub>-A<sub>3</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-COOH (a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> y a<sub>3</sub> son pequeños dominios ácidos). Localizado en Xq27.1, el *F9* presenta ocho exones (A-H) y abarca 33 kb<sup>(2)</sup>. El mRNA del *F9* (2,8 kb) codifica para una pre-pro-proteína de 27 y 19 aa, que incluyen el péptido señal y

el propéptido, respectivamente, y un FIX maduro de 415 aa, compuesto por los dominios NH<sub>2</sub>-Gla-EGF1-EGF2-pA-Cat.Ser.proteasa.COOH que es activado a FIXa por liberación del péptido (pA) y conformación de una cadena liviana y otra pesada.

### **Análisis molecular diagnóstico. Detección de mutaciones**

La HA es causada por un espectro heterogéneo de defectos moleculares en el *F8*, y debido a la compleja estructura de 26 exones distribuidos en 187 kb de ADN genómico en Xq28, la caracterización de la mutación causal en este gen, constituye aún hoy un gran desafío en muchos laboratorios, y en particular en los países en desarrollo. La inversión del intrón 22 y del intrón 1 son las únicas mutaciones recurrentes reconocibles, causando el 45% de las HA severas. En todo el resto de las hemofilias (HA y HB) encontramos todo tipo de mutaciones incluyendo grandes y pequeñas deleciones o inserciones y mutaciones puntuales asociadas a cambios deletéreos tipo mutación con sentido equivocado (*missense*), mutación sin sentido (*nonsense*) y alteración del empalme (*splicing*). El análisis directo de la mutación causal constituye la ruta preferida para la obtención de información segura para el asesoramiento genético de familias con hemofilia A y B (diagnóstico de portadoras y prenatal).

Las mutaciones causales de hemofilia están compiladas y accesibles en Internet: HA-*F8* en la página HADB (*Hemophilia A Mutation Database*: <http://www.factorviii-db.org/>), y HB-*F9* en la HBMD (*Hemophilia B Mutation Database*, Factor IX Variant Database <http://www.factorix.org/>).

La mutación más importante en hemofilia es la inversión del intrón 22 del *F8* (Inv22)<sup>(3)</sup> causando el 42% de las HA severas sin distinciones étnicas o geográficas<sup>(4)</sup>. También es recurrente la inversión del intrón 1 (Inv1)<sup>(5)</sup> causando el 3% de las HA severas. La Inv22 resulta por recombinación no-alélica entre secuencias homólogas de 10 kb (*int22h*) ubicada una dentro del intrón 22 del *F8* (*int22h-1*) y otra de orientación opuesta, que pertenece a un grupo de dos copias fuera del *F8* (*int22h-2* e *int22h-3*) cerca del telómero Xq. La técnica de referencia para estudiar la Inv22 es el *Southern blot*<sup>(3)</sup> aunque también se desarrollaron técnicas de análisis rápido: una de ellas basada en PCR de larga distancia (LD-PCR)<sup>(6)</sup> y la otra basada en una modificación del abordaje de

PCR inversa (*inverse shifting-PCR*, IS-PCR)<sup>(7)</sup>.

En el año 2005, por liberación de la secuencia terminada del cromosoma X humano, se determinó que las copias extragénicas de *int22h* (i.e., -2 y -3) estaban orientadas inversamente entre sí (cabeza-cabeza) y que sólo una de ellas respecto a *int22h-1* podría generar inversiones, mientras que la otra estaría orientada igual a *int22h-1* (cabeza-cola) y su recombinación podría generar deleciones (Del22) y duplicaciones (Dup22), pero no inversiones. Aunque no han sido fehacientemente caracterizadas clínicamente, la eventual presencia de la Del22 y la Dup22 podrían causar errores del diagnóstico molecular con los métodos de análisis rápido. Con el objetivo de mejorar el diagnóstico rápido abarcando la detección precisa de estas variantes genómicas hipotéticas, se desarrollaron modificaciones de la técnica de LD-PCR<sup>(8)</sup> y de IS-PCR<sup>(9)</sup>, técnica también aplicable al análisis de muestras de DNA genómico extraído de vellosidades coriónicas<sup>(10)</sup> (Radic-Rossetti et al, 2009). El resto de las mutaciones causales de HA y HB en todo el rango de severidad no son recurrentes e incluyen grandes deleciones (por ejemplo las causadas por recombinación homóloga entre secuencias repetidas orientadas igual Alu<sup>(11)</sup> Rossetti et al, 2004), pequeñas Ins o Del (de 1-5 bases) asociadas generalmente a cambios en el marco de lectura (*frameshifts*), y sustituciones nucleotídicas que predicen defectos tipo *missense* (cambio de aa), *nonsense* (aparición de un codón de terminación prematuro) o del *splicing* del RNA.

Para la detección de estas mutaciones pequeñas del *F8* y *F9* algunos laboratorios utilizan algún abordaje de monitoreo (*screening*) para evitar la secuenciación directa de todas las regiones importantes del gen correspondiente. De este modo, nuestro laboratorio en Buenos Aires, integra un esquema de 38 y 12 productos PCR para el *F8* y *F9*, respectivamente, que son analizados por CSGE (*conformation sensitive gel electrophoresis*) de alta resolución indicando un segmento que es caracterizado por secuenciación<sup>(12)</sup>. Una vez determinada la mutación se estudia si el cambio observado es la causa de la hemofilia o si sólo está asociado por contingencia al probando familiar. Este análisis de la relación genotipo-fenotipo en hemofilia se realiza mediante la aplicación de criterios aceptados internacionalmente: (a) el cambio está reportado a en la literatura y/o en las bases de datos correspondientes, (b) en defectos *missense*,

la proteína es alineada con sus ortólogos, los cambios en aa conservados filogenéticamente son más severos que en aquéllos no-conservados, (c) el defecto no debe ser observado en al menos 200 cromosomas X de varones sanos de la población general correspondiente, y (d) el defecto es estudiado teóricamente *in silico* (e.g., en defectos *missense* se estudian los potenciales cambios la estructura 3D -secundaria/terciaria- de la proteína, y en eventuales defectos de *splicing* se estudia la eventual destrucción de las secuencias consenso)<sup>(12)</sup>.

### Predictores genéticos de desarrollo de inhibidor

A diferencia de los afectados por otras enfermedades genéticas, la mayoría de los pacientes con hemofilia son en la actualidad tratados eficientemente mediante la infusión intravenosa de concentrados del factor deficiente (FVIII para HA y FIX para HB), que puede realizarse, sea ante una situación clínica eventual que lo requiera -a demanda-, o en pequeñas dosis en forma regular -profilaxis-. Sin embargo, la complicación más seria asociada al tratamiento de la hemofilia es, sin duda, el desarrollo de aloanticuerpos que neutralizan el factor (FVIII/FIX) administrado (inhibidores). Aproximadamente el 20-30% de los casos severos con HA y el 5% con HB desarrollan estos anticuerpos neutralizantes haciendo ineficaz la terapia de reemplazo<sup>(13)</sup>, debiendo recurrir al uso de agentes *bypasantes* como el FVI-Ia, CCPa (concentrado del complejo protrombínico activado), para controlar las hemorragias severas. La terapia de pacientes con inhibidor suele generar problemas permanentes que afectan seriamente la salud y la calidad de vida, y requiere intervención en extremo costosa<sup>(14)</sup>.

Se ha demostrado que la patogénesis de los inhibidores contra el FVIII es un rasgo multifactorial influenciado por dos tipos de factores de riesgo: en primera línea, la composición o trasfondo (*background*) genético del paciente, considerados factores no-modificables, y en segunda instancia, y más debatidos por presentar evidencias menos concluyentes acerca de su participación, los factores ambientales o factores modificables.

Entre los factores genéticos la causa predisponente más fuerte que se ha encontrado es el tipo de mutación causal en el *F8*.

Aquellas mutaciones que previenen la síntesis endógena de factor circulante (*null mutations*), como las

inversiones, grandes deleciones y mutaciones tipo *nonsense*, son las que confieren mayor riesgo de desarrollo de inhibidor. En estos casos, el FVIII administrado en la terapia de reemplazo, es reconocido como una proteína extraña por el sistema immune, dando origen a los anticuerpos inhibidores. Aunque los reportes de riesgo absoluto y relativo de este tipo de mutaciones varían entre diversos estudios, está bien demostrado que las mutaciones con la incidencia más alta de inhibidor son las grandes deleciones, con rangos de prevalencia entre 42-74%. Estos pacientes no sólo están en mayor riesgo de desarrollar inhibidores (OR 3,57), sino que, además, la mayoría de los inhibidores son de título alto (OR 5,16). En contraste, las mutaciones asociadas a la presencia de factor circulante (*missense* o que alteran el *splicing* sin provocar grandes desarreglos en la estructura resultante) se consideran mutaciones de bajo riesgo con una frecuencia media de desarrollo de inhibidores debajo del 5%<sup>(15,16)</sup>.

Además, se ha demostrado que otros factores genéticos relacionados con el huésped influyen también en el desarrollo de inhibidores en HA, tales como el origen étnico y la historia familiar. La incidencia de inhibidores es alta en el subgrupo de pacientes de ascendencia africana, en comparación con los caucásicos (55,6% vs 27,4%). Como el espectro de mutación en *F8* no difiere entre las razas, esta diferencia podría estar basada en variantes genéticas específicas étnicas en los determinantes de la respuesta inmune, lo que resalta la importancia de realizar estudios en poblaciones específicas para así estimar los diferentes factores de riesgo en el desarrollo de inhibidores en todo el mundo. Otra hipótesis está relacionada con variantes genéticas en *F8* étnico-específicas. Cuatro, SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) comunes no sinónimos dentro del *F8* han sido identificados, que representan seis haplotipos en la población humana (H1 a H6). Tres de estos haplotipos (H3, H4, y H5) se han asociado con un mayor riesgo de desarrollo de inhibidores y se detectaron principalmente en personas de raza negra<sup>(17,18)</sup>.

El riesgo de la formación de inhibidores aumenta significativamente en pacientes con antecedentes familiares de inhibidores, donde el riesgo absoluto en estos pacientes se determina que es del 48%, mientras que el riesgo en pacientes sin antecedentes familiares sólo es del 15%<sup>(19)</sup>.

Se ha observado que algunos pacientes con mutaciones de alto riesgo no desarrollan inhibidor, poniendo en evidencia que aún faltan encontrar otros factores de predisposición involucrados.

Varios estudios indican que la respuesta inmune desencadenada por la presencia de FVIII exógeno es un evento mediado por células T *helper*. El inicio del proceso de producción de anticuerpos consiste en el procesamiento de las proteínas por las células presentadoras de antígeno y la posterior asociación de estos péptidos a moléculas del HLA<sup>(20)</sup>. La mayoría de las asociaciones con la producción de inhibidor están relacionados con HLA de clase II alelos HLA-DRB1 \* 14, DRB1 \* 15, HLA-DQB1 \* 06:02, DQB1 \* 06:03. La asociación encontrada en los tipos de HLA involucrados con el desarrollo de inhibidores fue débil, sugiriendo que la capacidad de MHC de clase II de un paciente que presente uno o más péptidos de FVIII es una condición necesaria pero no suficiente para estimular las células T *helpers* y producir anticuerpos neutralizantes<sup>(21)</sup>.

En intentos por encontrar nuevos marcadores que permitan una estratificación de los pacientes en riesgo de desarrollar inhibidores, se han estudiado SNPs en las regiones reguladoras de genes de citoquinas. Ciertos polimorfismos, localizados principalmente en las regiones promotoras, en los exones o en microsatélites de regiones de intrones, pueden afectar a la transcripción e influir en la producción de citoquinas y, posteriormente, modificar el perfil de la respuesta inmune. Se han analizado polimorfismos en genes asociados de la respuesta inmune (*IL1b*, *IL4*, *IL10*, *TNF-α* y *CTLA4*) y se ha reportado una asociación significativa entre formación de inhibidor y la presencia del genotipo 308A en el gen de *TNF-α* en varios estudios. Para la citoquina IL10 se encontró asociado a desarrollo de inhibidor el alelo -1082G y el alelo del microsatélite dinucleótido de repetición 'CA' de 134 pb ubicados en la región promotora del gen *IL10*. El SNP en el gen *CTLA4* c.318T también ubicado en la región promotora, resultó asociado a inhibidor<sup>(13,21,22)</sup> (Astermark et al, 2007). Por otra parte, se han identificado en el estudio de cohortes multicéntrico HIGS (*Haemophilia Inhibitor Genetic Study*)<sup>(23)</sup> nuevos genes candidatos potencialmente predictores para el desarrollo de inhibidor (CD44, CSF1R, DOCK2, MAPK9, y IQGAP2).

Sin embargo, cada uno de los factores mencionados ha sido encontrado significativamente asociado en

poblaciones específicas con características singulares y, en consecuencia, estos resultados no son necesariamente aplicables a otras poblaciones con diferencias étnicas y/o geográficas, por lo que cada una de ellas debe ser estudiada y sus factores caracterizados específicamente en cada población.

Como conclusión, la importancia de la información genética de la mutación causal de hemofilia en cada familia afectada radica en dos aspectos de la práctica clínica que resultan insoslayables, primero, porque constituye la ruta ideal para proveer asesoramiento genético para diagnóstico de portadoras y prenatal, y segundo, porque permite predecir las características y profundidad del fenotipo asociado a cada paciente con un genotipo específico, que permitirá diseñar un régimen de tratamiento individualizado que, por ejemplo, reduzca el riesgo de desarrollar un inhibidor en la terapia de reemplazo del factor defectuoso.

#### Declaración de conflictos de interés:

La autora declara que no posee conflictos de interés.

#### Referencias

1. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton D, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. Characterization of the Human factor VIII gene. *Nature*. 1984; 312: 326-30.
2. Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry*. 1985; 24:3736-50.
3. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Haemophilia A. *Nature Genet*. 1993; 5:236-41.
4. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, De Moerloose P, Sommer SS, et al. Factor VIII Gene Inversions in Severe Hemophilia A: Results of an International Consortium Study. *Blood*. 1995; 86: 2206-12.
5. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe Hemophilia A. *Blood*. 2002; 99: 168-74.



6. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood*. 1998; 92: 1458-9.
7. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot by use of Inverse PCR. *Clinical Chemistry*. 2005 51: 1154-8.
8. Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 591-8.
9. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the F8 gene. *J Thromb Haemost*. 2008; 6: 830-6.
10. Radic C.P., Rossetti L.C., Zuccoli J.R., Abelleiro M.M., Larripa I.B., De Brasi C.D. Inverse shifting-PCR based prenatal diagnosis of hemophilia-causative inversions involving int22h and int1h hotspots from chorionic villus samples. *Prenat. Diagn.*, 2009, Dec;29(12):1183-5. Wiley Chichester, Sussex; New York, USA. Print ISSN: 0197-3851.
11. Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Homeologous Recombination between AluSx sequences as a cause of Hemophilia. *Human Mutat*. 2004b; 24: 440.
12. Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Goodeve A et al. Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica*. 2007; 92(6): 842-5.
13. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factor VIII and IX. *Haemophilia*. 2006;12(Suppl 6):15-22.
14. Mannucci PM. Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. *Haemophilia*. 2008 Jul;14 Suppl 3:10-8.
15. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, Astermark J et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2012;22:2922-2934.
16. Rossetti LC, Szurkalo I, Radic CP, Abelleiro MM, Primiani L, Neme D et al. 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.
17. Viel KR, Ameri A, Abshire TC, Iyer RV, Watts RG, Lutcher C, et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med*. 2009; 360(16): 1618-27.
18. Gunasekera D, Ettinger RA, Nakaya Fletcher S, James EA, Liu M, Barrett JC et al. Factor VIII gene variants and inhibitor risk in African American hemophilia A patients. *Blood*. 2015; 126(7): 895-904.
19. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC 2nd, Berntorp E; Malmö International Brother Study group. The Malmö International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica*. 2005; 90(7): 924-31.
20. Reipert BM, Allacher P, Hausl C et al. Modulation of factor VIII-specific memory B cells. *Haemophilia*. 2010;16:25-30.
21. Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R et al. 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: 2006-15.
22. Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2007; 5(2): 263-5.
23. Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED, et al. Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood*. 2013;121:1446-1454.