



EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL GEN CTLA-4 Y SU ASOCIACIÓN CON LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL

Susana Godina González^a, Carlos Alberto Jasso Jasso^a, Elma Ivonne Sotelo Ham^b, Raúl Adrián Martínez Orozco^a, Marisa Hernández Barrales^c, Imelda Zapata Sosa^d, Edel Antonio Arcadia Santamaria^d y Jorge Luis Ayala Luján^c

^aUniversidad Autónoma de Zacatecas, sgodina@uaz.edu.mx, carjas2@hotmail.com

^bCoordinación de Investigación en Salud, Servicios de Salud de Zacatecas, sotham@hotmail.com

^cLaboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular, UAZ, marisahb@gmail.com; jorgeayala69@hotmail.com

^dHospital General de Zacatecas "Luz González Cosío", Servicios de Salud de Zacatecas imeldazapata200@hotmail.com, eder_arcadia_s@hotmail.com

RESUMEN

Introducción: En México, el cáncer en niños ocupó segundo lugar en población de 1 a 14 años en el 2000. Las leucemias agudas son más frecuentes en la infancia el costo de atención aproximado es de 620 mil dólares anuales.

Objetivo General: Analizar factores de riesgos ambientales y genéticos en población pediátrica del Hospital General de Zacatecas de los Servicios de Salud, con leucemia linfoblástica aguda (LLA).

Material y Métodos: Se realizó estudio Casos y Controles 1:1, los niños casos diagnosticados con LLA y los controles fueron niños que ingresaron a cirugía programada por traumatismos, sin complicaciones, residentes de Zacatecas. Bajo previo consentimiento informado a los padres/tutores, se aplicó encuesta estructurada y se tomó muestra venosa 2 ml para determinaciones de polimorfismos CTLA4, las cuales fueron procesadas en el laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Se realizó análisis estadístico con SPSS® 20 y GraphPad Prism® 6.03 y pruebas para desviación de equilibrio de Hardy-Weinberg y asociación.

Resultados: Fueron 20 casos:20 controles con un rango de edad en los casos de 2 a 18 años (media 7.9 ± 2.1) y controles de 2 a 17 años(media 6.4 ± 3.2), razón hombre-mujer 1.1:1. Los factores de riesgo con significancia clínica: antecedentes heredofamiliares de cáncer OR 4; exposición a pesticidas OR 2.6 y solventes OR 2 ($p < 0.05$). La distribución de alelos en ambos polimorfismos sin desvío (Hardy-Weinberg, $p > 0,05$). No hubo correlación con significancia estadística entre los polimorfismos genéticos evaluados. No hubo asociación entre sexo, edad o tipo de leucemia con los niveles de proteínas solubles.

Conclusiones: Los factores de riesgo con significancia fueron similares a otros reportes. Es necesario incrementar el número de individuos para obtener datos significativos.

1. INTRODUCCIÓN

El antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) es una molécula con un importante papel en la activación de los linfocitos T (1), que cuando se une a su ligando induce una señal negativa, inhibiendo la proliferación y activación de los linfocitos T a través de diferentes mecanismos. (2,3).



Existen varios polimorfismos de nucleotido simple (SNP) en el gen que codifica para la proteína CTLA-4, los cuales se han asociado a susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes y recientemente al cáncer en humanos, (4). Uno de ellos es CTLA-4 A>G (rs231775), localizado en el exon 1, el cual produce una sustitución Thr>Ala; el genotipo 49GG induce una mayor proliferación de células T que el genotipo 49AA (5) y el SNP CT60 (rs3087243), localizado en la región 3'UTR, se relaciona con un incremento en la expresión de la proteína soluble CTLA-4 para los genotipos GG y GA, con respecto al AA (6).

Hay pocos estudios en los cuales se evalúe la relación entre los polimorfismos de CTLA-4 con la leucemia linfoblástica aguda infantil, por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar esta relación y buscar otros factores de riesgo ambientales.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Casos y controles

Los pacientes participantes fueron niños entre 3 a 18 años de edad, diagnosticados con LLA y atendidos en el Hospital General de Zacatecas "Luz González Cosío", reclutados entre Octubre del 2012 a Septiembre del 2013. El estudio fué aprobado por el Comité Institucional de Ética y solo se enrolaron en el estudio pacientes cuyos padres firmaron carta de consentimiento informado. Los criterios de inclusión fueron: pacientes menores de 18 años con LLA, de acuerdo a la clasificación FAB, sin otra displasia ni enfermedad autoinmune. Los controles fueron niños de la misma edad, sin historia de malignidad, que llegaron al hospital por traumatismos y cuyos padres permitieran su inclusión en el estudio también por carta de consentimiento informado. Se aplicó encuesta a casos y controles para evaluar factores de riesgo.

Genotipo CTLA-4

Se extrajo sangre periférica y de esta se obtuvo ADN por un método de extracción comercial de columna, (Maestrogen, Inc., Nevada USA), brevemente, se recolectó el paquete celular y se añadió solución de lisis. El ADN unido se separó en una columna de afinidad, se lavó y eluyó. Se realizó PCR en tiempo real para evaluar el genotipo (TaqMan® SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems, USA), de acuerdo a los protocolos establecidos por el fabricante y se evaluaron en un 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems, USA) y se usó el Software del fabricante para el análisis (7500 Software, Applied Biosystems, USA).

Análisis Estadístico

Se realizó prueba χ^2 para comparar variables discretas y la prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg (DeFinetti program, Institut für Humangenetik, Alemania, ent <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). El análisis se realizó usando el software GraphPad Prism® 6.03 (GraphPad Software, Inc.). El análisis de los factores de riesgo se realizó usando el software SPSS Versión 20.0.

3. RESULTADOS

De los 20 casos revisados, el 80 % correspondió a LLA tipo B, una Pre-B y 3 T (15%), con una edad promedio en los casos de 7.9 ± 2.1 y en los controles de 6.4 ± 3.2 . La edad al diagnóstico fue en los menores de 4 años, el grupo de tratamiento fue de mediano riesgo en 11 (55%), los meses del tratamiento fueron 36 y en remisión el 75% (75%). (Ver Tabla 1).



Tabla 1. Características Demográficas/ Factores de Tratamiento y asociación con remisión.

Factores demográficos	Número (%)
Edad (años)	
< 3	5 (25)
4-6	6 (30)
7-9	5 (25)
>10	4 (20)
Sexo	
Masculino	11 (55)
Femenino	9 (45)
Tipo LLA	
LLA Pre-B	1 (5)
LLA-B	14 (80)
LLA-T	3 (15)
Grupo terapéutico de riesgo:	
Bajo	5 (25)
Mediano	11 (55)
Alto	4 (20)
Meses de tratamiento	
12	5 (25)
24	5 (25)
26	50 (50)
Etapas del tratamiento	
Remisión	75%
Recaída	15%

En cuanto a los factores de riesgo, una asociación a infecciones virales, no se identifican factores de riesgo asociados con significancia estadística, (tabla 2).



Tabla 2. Análisis de los factores de riesgo para las Leucemias Linfoblásticas Pediátricas del Hospital General de los Servicios de salud de Zacatecas.

Variable	Casos/Controles	OR	Intervalo Confianza 95%	p
Antecedentes heredofamiliares de cancer				
Si	10/4			
No	10/16	4.0	0.98 -16.27	0.09*
Madre añosa que curso con embarazo de paciente				
Si	10/8	1.0	0.19- 5.06	1.00*
No	10/12			
Madre con antecedentes de abortos				
Si	3/5	0.56	0.125-2.53	0.09*
No	17/15			
Exposición a Rayos X durante el embarazo				
Si	15/0	-	-	0.00*
No	5/20			
Padre con antecedente de exposición a solventes				
Si	4/2	1.5	0.42-5.24	0.75
No	16/18			
Madre con tabaquismo				
Si	2/0	-	-	0.48*
No	18/20			
Padre con tabaquismo				
Si	5/6	0.7	0.193-3.13	1.00
No	15/14			
Madre con antecedente de alcoholismo				
Si	0/2	0.56	0.068-4.75	1.00*
No	20/18			
Padre con antecedente de alcoholismo				
Si	14/12	1.5	0.42-5.40	0.74
No	6/8			
Exposición a radiaciones				
Si	15/16	0.7	0.18-3.19	1.00
No	5/4			
Exposición a virosis				
Si	5/0	-	-	0.04*
No	15/20			
Exposición a pesticidas				
Si	5/2	2.62	0.509-13.54	0.40*
No	15/18			
Exposición a solventes				
Si	4/2	2.018	0.375-10.85	0.66*
No	16/18			

Genotipo CTLA-4

La distribución alélica de ambos polimorfismos no se desvió del equilibrio calculado de acuerdo a Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). Se comparó la distribución de cada polimorfismo tanto para la presencia como la ausencia de LLA (tabla 3) y no se encontró correlación entre la incidencia de LLA con ninguno de los polimorfismos evaluados.



Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen CTLA-4 en pacientes con LLA y controles.

GENOTIPO	LLA, n (%)	CONTROL, n (%)	OR	IC (95%)	p
SNP CTLA-4 49 A/G (rs231775)					
AA	8 (28.57)	13 (32.5)	1		
AG	12 (42.86)	19 (47.5)	1.026	0.328-3.207	NS
GG	8 (28.57)	8 (20.0)	1.625	0.435-6.068	NS
A	19 (39.58)	42 (51.22)			
G	29 (60.42)	40 (48.78)	1.286	0.648-2.551	NS
SNP CT60 A/G (rs3087243)					
AA	4 (16.67)	11 (26.83)	1		
AG	11 (45.82)	20 (48.78)	1.512	0.388-5.896	NS
GG	9 (37.5)	10 (24.39)	2.475	0.577-10.617	NS
A	28 (50.0)	45 (56.25)			
G	28 (50.0)	35 (43.75)	1.603	0.778-3.301	NS

Se muestran las frecuencias (n) y porcentajes (%). Las frecuencias se compararon usando la prueba Chi cuadrada. Ambos genotipos estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg, LLA ($p=0.45$), Control ($p=0.82$), usando la prueba de Pearson. NS No significancia.

4. CONCLUSIONES

Es importante identificar los factores de riesgo asociados al desarrollo de leucemia infantil en el estado de Zacatecas, así como su probable relación con factores genéticos e inmunológicos. Los resultados muestran una probable asociación con el alelo G, tanto para el polimorfismo CTLA-4 49 y para el CT60, los cuales han sido identificados como alelos protectores en tumores sólidos, esto nos sugiere una probable inmunorregulación diferente en las neoplasias hematológicas, sin embargo, se requiere un mayor número de pacientes para poder demostrar esta asociación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(6):1595-604.
2. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Ledbetter JA, et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science*. 1992;257(5071):792-5.
3. Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *Journal of immunology*. 1999;162(10):5813-20.
4. Sun T, Zhou Y, Yang M, Hu Z, Tan W, Han X, et al. Functional genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. *Cancer research*. 2008;68(17):7025-34.
5. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes and immunity*. 2000;1(3):170-84.



6. Sun T, Hu Z, Shen H, Lin D. Genetic polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and cancer: the dialectical nature of subtle human immune dysregulation. *Cancer research*. 2009;69(15):6011-4.