ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis del gen *FUT 2* y el carácter secretor en pacientes con tumores urogenitales

Ensinck, M.A¹; Racca, L¹.; García Borrás, S. ¹; Provenzal, O.²; Cotorruelo, C.^{1,3}; Biondi, C^{1*}.

¹ Área Inmunología; Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina

² Cátedra de Urología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina.

³ C.O.N.I.C.E.T.

Contacto: Biondi, C.; cbiondi@fbioyf.unr.edu.ar

RESUMEN

El desarrollo de las neoplasias se asocia generalmente a la alteración de la glicosilación de las proteínas y lípidos de las membranas celulares. Se ha reportado que en la mayoría de los carcinomas humanos, incluido los carcinoma urogenitales, existe una disminución de la expresión de los antígenos del sistema ABO. Los mecanismos implicados en esta manifestación aberrante de los epitopes antigénicos de algunos grupos sanguíneos, no han sido totalmente determinados. El objetivo fue investigar el estado secretor, en pacientes con tumores urogenitales, utilizando métodos bioquímicos y de biología molecular. Para ello se estudiaron 104 individuos, de los cuales la mitad presentó diferentes tumores urogenitales, mientras que en el resto no se observaron alteraciones, constituyendo el grupo control. Se investigaron los fenotipos Lewis en muestras de sangre periférica a través de técnicas de hemaglutinación. Se determinó el carácter secretor a partir de muestras de salivas por el método de inhibición de la hemaglutinación. Se analizó el polimorfismo del gen *FUT2* por ASO-PCR (oligonucleótido alelo específico) con cebadores específicos para el alelo G428 y para el alelo de tipo salvaje de este gen. Los resultados obtenidos mostraron un mayor grado de malignidad de las enfermedades urogenitales en el grupo no secretor OR=3.44. El 51% de los pacientes con lesiones potencialmente cancerosas y cancerosas fueron no secretores con fenotipo Le [a+b-]. En cambio, en la población control predominó el carácter secretor (78,2%). Se observó una asociación marginal entre el estado secretor y estas lesiones. Los estudios moleculares mostraron en los pacientes con lesiones cancerosas la ausencia del alelo salvaje *FUT2*, mientras que en el grupo control predominó la frecuencia de este alelo. Estos hallazgos indican que las variantes genéticas analizadas podrían ser consideradas como marcadores de riesgo en pacientes que presentan tumores urogenitales.

Palabras clave: Carácter secretor, *FUT2*, tumores, urogenital.

ABSTRACT

The mechanisms of aberrant expression of blood-group antigens are not clear in all cases. The *FUT2* gene has a significant polymorphism with typical ethnic specificity. The aim of this work was to investigate the polymorphism of the *FUT2* gene and secretor status by using biochemical and molecular biological methods in patients with urogenital tumours. We studied 104 subjects. Half of them had urogenital tumours, while the other half were the healthy control group. We determined the secretor status in saliva with the haemagglutination inhibition technique using monoclonal antibodies anti-A, anti-B and lectin *ulex europaeus*. We also investigated the Lewis phenotypes of fresh blood samples by a haemagglutination method. We analyzed the *FUT 2* polymorphism by allele specific oligonucleotide–polymerase chain reaction (ASO-PCR) with specific primers for the G428 allele and the wild type allele of *FUT2* gene. We found higher intensity of oral disease in the non-secretor group (OR = 3.44). In contrast with the healthy population, 51% of the patients with potential malignant urogenital lesions and cancerous lesions were non-secretors [Le a+ b-]. We observed a marginal association between the secretor status and these lesions. In conclusion, the presence of urogenital tumors, in which the non-secretor status predominates, appears to be an associated risk marker for the development for oral cancer.

Key words: secretor status, *FUT 2*, tumours, urogenital.

Introducción

El cáncer es, sin duda, una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor fuerza en el panorama epidemiológico del país desde finales del siglo XX, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial por sus graves manifestaciones clínicas, costos, alta letalidad y su relación con una gran variedad de factores de riesgo^[1]. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, esta situación se ha tornado crítica y de no implementarse mejores estrategias de prevención, para el año 2030 se estima que se presentarán mundialmente 11,8 millones de muertes por esa causa.^[2]

La patología urogenital masculina es muy amplia. Entre los tumores génito-uritarios, los más frecuentes son los que se originan en la próstata y la vejiga, seguidos por los que se alojan en el riñón^[3]. El conocimiento de factores moleculares de influencia decisiva en la formación, desarrollo y progresión del cáncer vesical, obliga a valorar el papel que tienen o tendrán en la evolución y supervivencia de este tumor.^[4,5]

Una línea de investigación dedicada al estudio de enfermedades, ha proporcionado información sobre la función fisiopatológica de los grupos sanguíneos y de su estrecha relación con determinadas patologías que afectan al hombre. Existe una amplia evidencia de que el cáncer está asociado con anomalías en la regulación génica, que se manifiestan en la superficie de la membrana celular. Recientemente, se ha demostrado que modificaciones en la glicosilación participan en la mayoría de los fenotipos malignos, incluyendo señales de transducción y apoptosis. Considerando que la mayoría de los cánceres humanos se originan a partir de células epiteliales, las deleciones de los antígenos de grupos sanguíneos, constituyen un tópico importante en la inmunología tumoral^[6].

La expresión de los antígenos del grupo sanguíneo ABO, no está limitada a los glóbulos rojos, también están presentes en la superficie de otras células del organismo y en las secreciones. Estos antígenos confieren propiedades biológicas esenciales, participan en el recambio y el tráfico transcelular y tienen gran importancia para la interacción celular durante el desarrollo y crecimiento. Aproximadamente el 80% de los individuos caucásicos son capaces de secretar los antígenos del sistema ABH en saliva, leche y otras secreciones. Este fenómeno está codificado por un gen, *FUT-2*, que puede adoptar dos formas alélicas: *Se* (dominante) y *se* (recesiva). El gen *Se* no actuaría solamente en la capacidad de secretar antígenos ABH, sino que también contribuiría a la regulación de su expresión en los distintos tejidos^[7,8].

Los antígenos Lewis son estructuras de carbohidratos que forman epitopes sobre glicolípidos y glicoproteínas^[9]. Dos genes independientes determinan el fenotipo Lewis, el gen Lewis (*Le* y *le*), y el gen secretor (*Se* y *se*). Los esfingolípidos plasmáticos son adsorbidos por la membrana eritrocitaria; si hay presencia de actividad Lewis, esta adsorción confiere reactividad Lewis a las células circulantes. El antígeno *Le^b* es adsorbido preferentemente por sobre *Le^a*, de modo que el individuo que posea ambos genes *Le*

y *Se* tendrá eritrocitos que expresarán *Le^b* pero no *Le^a*. Los glóbulos rojos de personas con el gen *Le* pero no con *Se*, expresarán *Le^a*. El individuo homocigota para el alelo amorfo *le* no tendrá reactividad Lewis en los glóbulos rojos o en los oligosacáridos de tipo 1 en otros sitios del cuerpo^[10,11].

Los individuos secretores generalmente presentan el fenotipo *Le* (*a-b+*), y *Le* (*a+b-*) en los individuos no secretores^[9].

Es de importancia destacar que la presencia o ausencia de los antígenos *Le* en individuos secretores y no secretores, guarda estrecha relación con los procesos neoplásicos. Estos antígenos están relacionados fundamentalmente con su participación en la formación de metástasis. Los antígenos *Le^b* y *Le^y*, cuando están presentes en grandes cantidades, como sucede en la mayoría de los cánceres humanos, son capaces de inducir un efecto de adherencia que permite que las células tumorales se introduzcan en los vasos sanguíneos y se desplacen por ellos^[11,12].

El objetivo de este trabajo fue investigar el gen *FUT 2* y el carácter secretor en pacientes con tumores urogenitales.

Materiales y Métodos

Se examinaron 104 sujetos, la mitad de los cuales presentaron tumores de próstata y vejiga, mientras que la otra mitad era el grupo control sano.

Todos los pacientes estudiados fueron derivados de la Cátedra de Urología de la Universidad Nacional de Rosario, con consentimiento informado previo. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas éticas establecidas por dicha Universidad. Se trabajó con muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA y de saliva, perteneciente a estos pacientes.

En todos los casos se respetaron las cláusulas de la Declaración de Helsinki propuesta por la International Medical Association.

Por otra parte se controlaron al máximo las normas de bioseguridad en las actividades experimentales desarrolladas por los integrantes del grupo. Además, todos los pacientes fueron sometidos a exámenes clínicos.

Estudios inmunohematológicos

Para los estudios serológicos se utilizaron muestras de sangre anticoagulada con EDTA. Además, se trabajó con muestras de saliva provenientes de los mismos pacientes para la detección de antígenos ABH solubles y extracción de ADN.

El carácter secretor

Se determinó analizando muestras de saliva para los pacientes y muestras de sangre remanente para los controles, por la técnica de inhibición de la hemaglutinación^[13]. Para llevarla a cabo, se colectaron de 2 a 3 ml de saliva, en tubos de centrífugas.

Las muestras fueron sometidas a choque térmico de congelamiento y descongelamiento, con el fin de eliminar la mucina. Posteriormente se separó el sobrenadante por centrifugación.

Paralelamente, fue separado el plasma de las muestras de sangre de los individuos controles.

Se realizaron 3 baterías de diluciones geométricas al medio, del material en estudio en Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7,4. Se enfrentó cada batería con igual volumen de antisueños de distinta especificidad: anti-A, anti-B y lectina *Ulex europaeus*, convenientemente diluidos. Los tubos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se revelaron con una suspensión de glóbulos rojos isogrupo al 5% en PBS.

Se centrifugó a 1000 RPM durante 1 minuto y se observó aglutinación macroscópica.

Con esta técnica se evalúa en forma indirecta el carácter secretor del paciente. Si presenta antígenos solubles, es secretor. Si carece de antígenos solubles, no lo es.

Grupo sanguíneo Lewis

Se determinó el fenotipo Lewis eritrocitario utilizando la prueba de hemoaglutinación, en la que se enfrentaron 50 µl de suspensión al 5% V/V de glóbulos rojos lavados en PBS de cada muestra de sangre con 50 µl del anticuerpo monoclonal anti-Le^a (Laboratorio DiaMed Argentina S.A.) y en forma paralela con el anti-Le^b (Laboratorio DiaMed Argentina S.A.). Luego, las reacciones se centrifugaron durante 1 minuto a una velocidad de 2000g para ser leídas.

Métodos moleculares [17]

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN a partir de muestras de saliva se realizó por la técnica de CTAB modificada. En esta técnica, se adicionó directamente CTAB omitiendo el agregado de tampón TE. Los pasos subsiguientes no fueron modificados.

La calidad de ADN genómico extraído fue examinada por electroforesis en geles de agarosa al 1% P/V en solución amortiguadora TBE con bromuro de etidio. La concentración de ADN fue medida espectrofotométricamente a 260 nm y diluido con agua estéril a 100 ng/µL.^[14]

Análisis del polimorfismo G428A por ASA-PCR^[14]

Las muestras de ADN fueron analizadas por ASO-PCR con cebadores específicos para el alelo G428 y para el alelo *wild type* (Tabla I). Se amplificó un fragmento de 132 pb como lo describe Henry et al.^[18], excepto por modificaciones realizadas en la temperatura de hibridación de acuerdo al Tm de los cebadores.

Estudios estadísticos

Se aplicó el test de chi cuadrado para el análisis de posibles asociaciones entre las variables predictivas y de impacto en el estudio. Se calcularon razones de Odds y se estimaron los

intervalos de confianza.

Resultados

En la población control, el 76,9 % de los individuos resultaron ser secretores (coincidiendo con la bibliografía para la población caucásica) expresando los antígenos ABH de acuerdo a su grupo sanguíneo eritrocitario.

En la tabla II se presentan los resultados correspondientes a los valores obtenidos en salivas de los pacientes con tumores de próstata y vejiga. En los mismos se observa un incremento del carácter no secretor (51.3%) respecto de la población control (26,1%).

El análisis molecular mostró que un 23,1 % de los pacientes fueron homocigotas para la mutación G428A, presentándose ésta en los dos alelos; los otros pacientes fueron homocigotas para el estado secretor, ninguno de ellos presentó el alelo G428A, o secretor heterocigota, mostrando solo un alelo con la mutación G428A.

El 76,9% de los individuos controles estudiados poseen el gen Se (*FUT 2*), el cual gobierna la secreción de antígenos ABH solubles. Estos antígenos secretados pueden ser demostrados en saliva por la técnica de inhibición de la hemaglutinación con anticuerpos específicos y por biología molecular a través del análisis del gen *FUT 2*. El 51% (n=27) de los pacientes con tumores urogenitales fueron no secretores con un fenotipo (Le a+ b-), OR = 2,44; II 95% [0.7836; 7.5534] en contraste con la población normal.

Discusión

Los patrones de glicosilación, incluidos los antígenos de grupo sanguíneo ABO, cambian durante el desarrollo embrionario, maduración de las células y en la transformación maligna. Los sistemas ABO, Hh y Lewis están relacionados fenotípicamente y bioquímicamente. La expresión de sus antígenos, sobre los glóbulos rojos y en las secreciones está controlada por una interacción compleja de genes de varios loci^[4].

Los estudios de los antígenos del sistema Lewis y carácter secretor son muy variados y generalmente no han aportado conclusiones definitivas. Los análisis críticos de los mismos, revelan que en diversas instancias, la serología resulta inadecuada, principalmente como resultado de las dificultades en la fenotipificación de individuos con diversas patologías o aquellos provenientes de diversos grupos étnicos. Las bases genéticas de los fenotipos Lewis y su asociación con el carácter secretor no son aún bien conocidas.

El gen *FUT2* codifica una enzima α ^[1,2] fucosiltransfera-

Tabla I. Secuencia de cebadores para el análisis de la mutación G428A.

Cebadores	Tm	Secuencia	Especificidad
FUT2-Se-428-s	68,8 °C	5'-CCGGTACCCTGCTCGTG-3'	Se (directo)
FUT2-se-428-f	66,6 °C	5'-ACCGGTACCCTGCTCGTA-3'	se (directo)
FUT2-all-523-as	66,7 °C	5'-CCGGCTCCCGTTCACCTG-3'	No específico (reverso)

Tabla II. Estado Secretor en pacientes con tumores urogenitales y controles.

	Controles	Tumores urogenitales
<i>FUT2</i> –Se (Estado Secretor)	40	25
<i>FUT2</i> –se (Estado noSecretor)	12	27

sa, la cual es responsable de la presencia de antígenos ABH en las secreciones del cuerpo. La determinación del carácter secretor de un individuo puede llevarse a cabo a partir de la evaluación de la presencia de estos antígenos solubles en las secreciones. Sin embargo, el precursor H tipo-1 es el precursor común en la vía de síntesis de los antígenos ABH y Le^b, por lo tanto, la determinación del antígeno Le^b también puede ser utilizado para caracterizar el estado secretor del individuo^[2].

El fenotipo Le{a-b+} de eritrocitos usualmente concuerda con el estado secretor en saliva, mientras que el fenotipo Le{a+b-} representa al estado no secretor. Ocasionalmente puede observarse inconsistencia entre el fenotipo Le{a-b+} y fenotipo secretor o entre el fenotipo Le{a+b-} y fenotipo no secretor, esto podría deberse a una hemoaglutinación ambigua de eritrocitos en la prueba o a una falla en la detección de antígenos ABH en las secreciones del organismo^[11]. En este estudio se obtuvo una total concordancia entre fenotipo Lewis y carácter secretor, ya que todos los individuos que dieron negativo en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, fenotipo secretor, fueron Lewis Le{a-b+} y todos los individuos que dieron positivo en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, fenotipo no secretor, fueron Lewis Le{a+b-}.

Durante los ensayos serológicos que se han realizado, se observó que el 76,9% de los individuos fueron secretores, este valor se encuentra dentro del rango hallado entre individuos caucásicos de otros países. En este trabajo también evaluó la asociación entre pacientes con tumores urogenitales y polimorfismos de los genes *Se* y el estado secretor. Se encontró que los individuos con tumores urogenitales se correspondían al estado no-secretor y presentando la mutación 428G → A (Trp143 → stop). Se demostró además que la expresión del antígeno Le {a+b-} estaba presente en la población de mayor riesgo.

Los estudios de pacientes con tumores urogenitales, en las que el estado no secretor predomina, muestran que este estado parece ser un marcador de riesgo asociado a la patología.

En resumen, los resultados muestran que los genotipos *Se/Se* o *Se/se* afectan el riesgo de desarrollar la enfermedad, definido por el estado secretor. Se requieren más estudios de seguimiento para aclarar el papel de los marcadores predictivos de riesgo en las lesiones precursoras de este tipo de cáncer.

Referencias bibliográficas

1. OMS-Ten statistical highlights in global public health, www.who.int/whosis/whostat2007_10highlights.pdf.
2. Jemal A.; Thomas A; Murray T; Thun M. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52(1): 23-47
3. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, Year of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, Year 2004
4. Hanahan D., Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000.100: 57-70.
5. Zeng L., Kyprianou N. Apoptotic regulators in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): value in prostate cancer detection and prevention. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005, 8: 7-13.
6. Dabelsteen E. Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J. Pathology* 1996; 179, 358- 369
7. Cartron J., Rouger P. Bases moléculaires des antigènes des groupes sanguins. De l'immunogénétique à la biologie cellulaire. 3^o Ed. 2001
8. Yamamoto F. Review: ABO Blood Group System. ABH oligosaccharide Antigens, Anti – A y Anti –B, A and B Glycosyl Transferases, and ABO Genes. *Immunohematology*, 2004; 20 (1) 3-17.
- 9- Henry L., Oriol R., Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*; 1995. 69:166-182.
10. Ørntoft TF, Holmes EH, Johnson PH, Hakomori S-I, Clausen H. Differential tissue expression of the Lewis blood group antigens: Enzymatic, immunohistologic, and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen expression in Le{a2b2} individuals. *Blood* 1991; 77:1389-1396.
11. Le Pendu J., Marionneau S., Cailleau-Thomas A, Rocher J., Mouillac-Vaidye B., Clement M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2001; 109:9-31.
12. Hakomori S. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: Their changes associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:247-266.
13. Brecher M. Butch S., Calhoun A., Fiebig E., et al. Manual Técnico Asociación Americana de bancos de sangre. 17^a Ed. 2012.
14. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. *Biología Celular y Molecular* Ed. Médica Panamericana. 4^o Ed. 2002.