

STATUS SECRETOR INFERIDO DA FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA DO SISTEMA LEWIS COMPARADO À GENOTIPAGEM FUT2.

Galbiatti, ALS; Viana, ARA; Nakashima, F; Ferreira, AIC; Mattos, CCB; Mattos, LC.
Laboratório de Imunogenética – Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto.
e-mail: luiz.carlos@famerp.br

Resumo:

Os genes fucosiltransferase 2 e 3 (*FUT2* e *FUT3*) regulam a expressão dos antígenos ABH em secreções corporais e também controlam o estado secretor do indivíduo. A interação entre eles resulta na expressão dos fenótipos eritrocitários do sistema Lewis. Os secretores positivos são fenotipados como Le(a-b+) e os secretores negativos, como Le(a+b-). O objetivo desse trabalho foi verificar a concordância entre a expressão dos fenótipos Le(a+b-) e Le(a-b+) e o status secretor definido pela genotipagem *FUT2*. Foram coletadas 70 amostras de sangue de indivíduos adultos, o DNA genômico foi extraído por um método salino, a genotipagem *FUT2* foi realizada pelo método PCR-SSP e para fenotipagem eritrocitária foi utilizado o método gel centrifugação. Dos 70 indivíduos analisados 14,3% apresentaram o fenótipo eritrocitário Le(a+b-), 61,4% o fenótipo Le(a-b+) e 24,3%, o fenótipo Le(a-b-). Com base nos resultados da genotipagem *FUT2*, 68,6% (48/70) foram classificados como secretores positivos (GG + GA) e 31,4% (22/70), como secretores negativos (AA). Houve concordância absoluta do fenótipo Le(a+b-) com o status secretor negativo definido pela genótipagem *FUT2* (AA).

Por outro lado, ocorreu alto índice de discordância (9,43%) entre o fenótipo Le(a-b+) e o status secretor positivo definido pela genotipagem *FUT2* (GG/GA). Os resultados sugerem que a fenotipagem Lewis não representa, isoladamente, um meio confiável para inferir o status secretor que um indivíduo expressa, o qual deve ser paralelamente identificado com o uso de métodos moleculares.

Palavras-chave: sistema Lewis, status secretor, *FUT2*

Trabalho realizado com apoio parcial BAP-FAMERP 2007/2008

*Artigo de Conclusão do Curso de Biologia Molecular da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – SP.

Introdução

O status secretor positivo ou negativo, controlado pelo gene *FUT2* (19q13.3), é apontado como fator de risco para doenças infecciosas (Lindesmith et al., 2003; Kindberg et al., 2006) e não infecciosas (Ronchetti et al., 2001; Chen et al., 2005). Esse marcador regula a expressão dos antígenos do sistema ABO nos tratos gastrintestinal, respiratório e nas secreções.

A interação entre os genes *FUT2* e *FUT3* (19p13.3) resulta na expressão dos fenótipos eritrocitários do sistema Lewis. Os secretores positivos são fenotipados como Le(a-b+) e os secretores negativos, como Le(a+b-). Essa relação não pode ser estabelecida apenas com o fenótipo Le(a-b-) (Schenkel-Brünner, 2000).

Devido às facilidades técnicas e de obtenção de amostras de sangue, a identificação do status secretor é inferida a partir dos fenótipos eritrocitários Lewis, mas a concordância nem sempre é absoluta (Henry, 1996; Henry, 2001). O objetivo deste trabalho foi verificar a discordância entre o status secretor positivo e negativo inferido a partir dos fenótipos eritrocitários do sistema Lewis com aquele definido pela genotipagem *FUT2*.

Material e método

Seleção da casuística

Foram selecionados 70 indivíduos não relacionados, de ambos os sexos, oriundos da região noroeste do Estado de São Paulo. Após receberem explicação detalhada sobre o objetivo do estudo e o protocolo a ser empregado, os mesmos concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (parecer 4657).

Coleta de sangue

Uma amostra de cinco mL de sangue total foi colhida em tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante. As amostras foram estocadas a 4^o C por no máximo 24 horas antes de serem realizadas as fenotipagens eritrocitárias dos sistemas ABO e Lewis.

Fenotipagem eritrocitária ABO

A fenotipagem eritrocitária do sistema ABO foi realizada pelo teste em tubos, com os anti-soros comerciais anti-A, anti-B e anti-A,B para prova direta, e as hemácias-padrão comerciais A₁ e B para a prova reversa (Fresenius-Kabi, São Paulo, Brasil). Resumidamente, foram preparadas suspensões de hemácias a 5% a partir de cada amostra de sangue total coletada. Uma gota de cada anti-soro e uma gota da suspensão de hemácias de cada doador, a 5%, foram misturadas em tubos separados, na fenotipagem reversa. Na fenotipagem direta, duas gotas do plasma sangüíneo e uma gota de cada hemácia-padrão foram utilizadas. Os tubos foram centrifugados a 3.400 rpm por 1 minuto e a leitura foi realizada com o uso de uma lupa. Os resultados foram anotados de acordo com o score: 4+, 3+, 2+, 1+ e 0.

Fenotipagem eritrocitária Lewis

Os fenótipos eritrocitários Lewis foram identificados pelo método gel-centrifugação com o uso dos anti-soros monoclonais anti-Le^a e anti-Le^b (Diamed Latino América, Lagoa

Santa, MG, Brasil). Os resultados foram anotados em graus de aglutinação, conforme utilizado na fenotipagem eritrocitária ABO e as instruções do fabricante foram rigorosamente respeitadas.

Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico, conforme protocolo de Miller e colaboradores (1988). Resumidamente, os leucócitos foram separados com o uso de Ficoll-Paque, posteriormente lavados três vezes em solução salina tamponada (PBS) e incubados a 37° C overnight com 20 µL de uma solução de proteinase K a 10%. O DNA foi precipitado em 2mL de NaCl a 6M, lavado três vezes em álcool etílico absoluto e três vezes em álcool etílico a 70%, seguido da dissolução em 300 µL água MilliQ e estocagem a -20 °C até o momento do uso.

Genotipagem FUT2

Os genótipos FUT2 resultantes da substituição G428A e que definem o status secretor positivo (GG e GA) e negativo (AA), foram identificados pelo método PCR-SSP, conforme protocolo de Procter e colaboradores (1997). Duas reações de amplificação, uma com o primer FUT2-G (Sense: 5'-CGTACCCCTGCTCCTGG-3') e outra, com o primer FUT2-A (Sense: 5'-CGGCTACCCCTGCTCCTA-3'), foram realizadas. Os primer anti-sense (5'-GGCTGCCTCTGGCTTAAAG-3') e os primers HGH-1 (Sense: 5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTT-3') e HGH-2 (Sense: 5'-TCACGGATTTCTGTTGTCTTTC-3'), para controle interno, foram incluídos em ambas as reações. Os primers FUT2-G e FUT2-A amplificaram fragmentos de 519 e 520 pares de bases, respectivamente, e os primers HGH-1 e HGH-2, fragmentos de 428 pares de base. Os amplificons foram analisados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. A figura 1 mostra os resultados da genotipagem FUT2.

Resultados

Os resultados observados encontram-se na tabela 1. As frequências dos fenótipos eritrocitários ABO dos 70 indivíduos analisados foram iguais a 38,6% para o grupo A, 15,7% para o grupo B, 4,3% para o grupo AB e 41,4% para o grupo O. Para o sistema Lewis, 14,3% apresentaram o fenótipo eritrocitário Le(a+b-), 61,4% o fenótipo Le(a-b+) e 24,3%, o fenótipo Le(a-b-).

Com base nos resultados da genotipagem *FUT2*, 68,6% (48/70) dos 70 indivíduos analisados foram classificados como secretores positivos (GG + GA) e 31,4% (22/70), como secretores negativos (AA).

Todos os 10 indivíduos fenotipados como Le(a+b-) apresentaram concordância absoluta com o genótipo *FUT2* (AA). Por outro lado, apenas 38 (88,4%) dos 43 indivíduos com fenótipo Le(a-b+) foram concordantes com o genótipo *FUT2* (GG/GA). Desses cinco indivíduos Le(a-b+) com genótipo AA (secretores negativos), quatro pertenciam ao grupo A e apenas 1, ao grupo O. O índice de discordância entre o status secretor negativo inferido da fenotipagem eritrocitária Lewis e o status secretor definido pela genotipagem *FUT2* foi igual a 9,43%.

Discussão

O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de discrepâncias entre o status secretor positivo e negativo inferido a partir dos fenótipos eritrocitários do sistema Lewis comparado àquele definido pela genotipagem *FUT2*.

As bases bioquímicas e moleculares que fundamentam importância do status secretor como fator preditivo de risco para doenças infecciosas e não infecciosas estão sendo identificadas (Ronchetti et al., 2001; Lindesmith et al., 2003; Chen et al., 2005; Kindberg et al., 2006). Paralelamente, a influência desse marcador genético na imunidade inata que opera nos tratos gastrintestinal e respiratório está se tornando clara (Lindén et al., 2008).

Lamentavelmente, a identificação do status secretor positivo e negativo ainda é, na maioria dos casos, baseada na fenotipagem eritrocitária do sistema Lewis. Entretanto, a concordância entre essas duas características nem sempre é absoluta pois a expressão dos fenótipos eritrocitários Lewis é influenciada por diferentes fatores (Henry, 1996). Além da variabilidade nas interações entre os genes *FUT2* e *FUT3*, a presença dos antígenos do sistema ABO nos tratos gastrintestinal, respiratório, nas secreções e o estado fisiológico dos indivíduos e as variações étnicas também afetam a expressão fenótipos Lewis (Mourant et al., 1978; Henry & Samuelsson, 2000). O tipo de reagente utilizado e o método de fenotipagem utilizado são fatores adicionais que podem comprometer a acurada fenotipagem eritrocitária Lewis (Henry, 1996). Portanto, a identificação do status secretor a partir da fenotipagem eritrocitária Lewis pode fornecer resultados imprecisos com taxas de discordância que atingem 20% dos casos em indivíduos normais, até valores maiores na presença de doenças.

As freqüências gerais dos fenótipos eritrocitários ABO e Lewis relatadas neste estudo foram semelhantes àquelas previamente descritas no noroeste do Estado de São Paulo e indicam que a causística é representativa da região (Mattos et al., 2001; Cintra & Mattos, 2006).

A concordância absoluta entre o status secretor negativo inferido do fenótipo eritrocitário Le(a+b-) e aquele definido pela genotipagem *FUT2* pode ser resultante da qualidade dos anti-soros anti-Le^a (Oriol, 1995). De fato, tem sido verificado que a afinidade e a avides dos anti-soros Lewis é variável mas que aqueles com especificidade Le^a apresentam melhor padrão de reação em testes de aglutinação e menor risco de reações cruzadas (Henry, 1996). Por outro lado, a discordância entre o status secretor positivo das cinco amostras fenotipadas como Le(a-b+), mas genotipadas como AA pode refletir o comportamento variável dos anti-soros anti-Le^b. A estrutura dos antígenos Lewis resulta da fucosilação do oligossacarídeo precursor do tipo 1 (Gal α 1 \rightarrow 3NAcGlc-R) pelas fucosiltransferases codificadas pelos genes *FUT2* e *FUT3* (Schenkel-Brunner, 2000). A fucosiltransferase Lewis adiciona uma molécula de fucose ao carbono 2 da NacGlu,

gerando o antígeno Le^a (Gal α 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 2]NAcGlc-R). A fucosiltransferase secretora adiciona uma molécula de fucose ao carbono 2 da galactose terminal do oligossacarídeo precursor, dando origem ao antígeno H tipo 1 (Fuc α 1 \rightarrow 2Gal α 1 \rightarrow 3NAcGlc-R). A fucosiltransferase Lewis adiciona outra molécula de fucose ao carbono 2 da NAcGlc, gerando o antígeno Le^b (Fuc α 1 \rightarrow 2Gal α 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 2]NAcGlc-R). (Oriol et al, 1981). Portanto, o antígeno Le^b possui epítomos que podem estar presentes no antígeno Le^b bem como no H tipo 1, os quais podem reagir de forma cruzada com anticorpos anti-Le^a e anti-H (Oriol, 1995).

As semelhanças estruturais entre os antígenos Le^a, Le^b, e H tipo aliada à reatividade variável dos anti-soros Lewis são fatores que contribuem para a definição imprecisa dos fenótipos eritrocitários Lewis e do status secretor. As divergências resultantes podem ser evitadas com o uso simultâneo de métodos sorológicos e moleculares na definição do perfil antigênico que cada indivíduo expressa de acordo com os polimorfismos dos genes *FUT2* e *FUT3* (Henry, 1996).

Conclusões

A fenotipagem eritrocitária Lewis isoladamente não constitui um procedimento confiável para se inferir o status secretor que um indivíduo expressa, o qual deve ser paralelamente identificado com o uso de métodos moleculares.

Referências bibliográficas

Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Hum Mutat*, 2004; 23:8-16.

Kindberg Elin, Hejdeman Bo, Bratt Goran, Wahren Britta, Lindblom Bertil, Hinkula Jorma, Svensson Lennart. A nonsense mutation (428 G \rightarrow A) in the fucosyltransferase *FUT2* gene affects the progression of HIV-1 infection. *AIDS*, 2006; 20:685-89.

Ronchetti F, Villa MP, Ronchetti R et al. ABO/Secretor genetic complex and susceptibility to asthma in childhood. *Eur Respir J* 2001; 17:1236-8.

Chen Y-L, Chen J-C, Lin T-M, Huang T-J, Wang S-T, Lee MF and Wang JY. ABO/secretor genetic complex is associated with the susceptibility of childhood asthma in Taiwan. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:926-32.

Schenkel-Brunner H. *Human Blood Groups – Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity*. Viena: Springer Wien New York, 2000.

Henry SM. Review: Phenotyping for Lewis and secretor histo-blood group antigens. *Immunohematology* 1996; 12: 51-61.

Henry SM. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood group related chart microorganism receptors. *Transf Clin Biol*, 2001; 8:226-30.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16(3):1215.

Procter J et al A rapid molecular method (PCR) to genotype ABO and Secretor status in potential organ transplants *Tissue Antigens*, 1997; 50: 475-83.

Lindén S, Mahdavi J, Semino-Mora C, Olsen C, Carlstedt I, Borén T et al. Role of ABO secretor status in mucosal innate immunity and *H. pylori* Infection. *PLoS Pathog* 2008;4(1):e2.

Mourant AE *et al*. *Blood groups and diseases. A study of associations of diseases with blood groups and others polymorphism*. London: Oxford University Press, 1978; 328p.

Henry SM, Samuelsson BE. ABO polymorphisms and their putative biological relationships with disease. In: King M-J, E. *Human blood cells: consequences of genetic polymorphisms and variations*. London: Imperial College Press, 2000. 15-103.

Mattos, LC, Cintra JR, Sanches FE, et al. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. Rev Bras Hematol Hemoter 2001; 23(1):15-22.

Cintra JR; Mattos LC. Freqüência relativa da substituição G428A no gene FUT2. Rev Bras Hemat Hemoter, 2006; 28:335.

Oriol R. ABO Hh, Lewis and Secretion: serology, genetics and tissue distribution. In: Cartron JP, Rouger P. Blood cell biochemistry: molecular basis of human blood group antigens. New York: Plenum; 1995; 37-73.

Oriol R, Danilovs J, Hawkins BR. A new genetic model proposing that the Se gene is a structural gene closely linked to the H gene. Am J Hum Genet 1981; 33: 421-31.

Figura1. M. Marcador de peso molecular de 100 pb. Indivíduo 01. Genótipo GG – No primeiro poço observa-se um fragmento de 519 pb (alelo G), no segundo poço, o fragmento do alelo A de 520 pb não amplificou. Indivíduo 02. Genótipo AA – Somente o fragmento de 519 pb amplificou (alelo A). Genótipo GA – Os dois fragmentos amplificaram (alelo G e alelo A). A banda de 428 pb do hormônio de crescimento está presente em todas as amostras (controle interno).

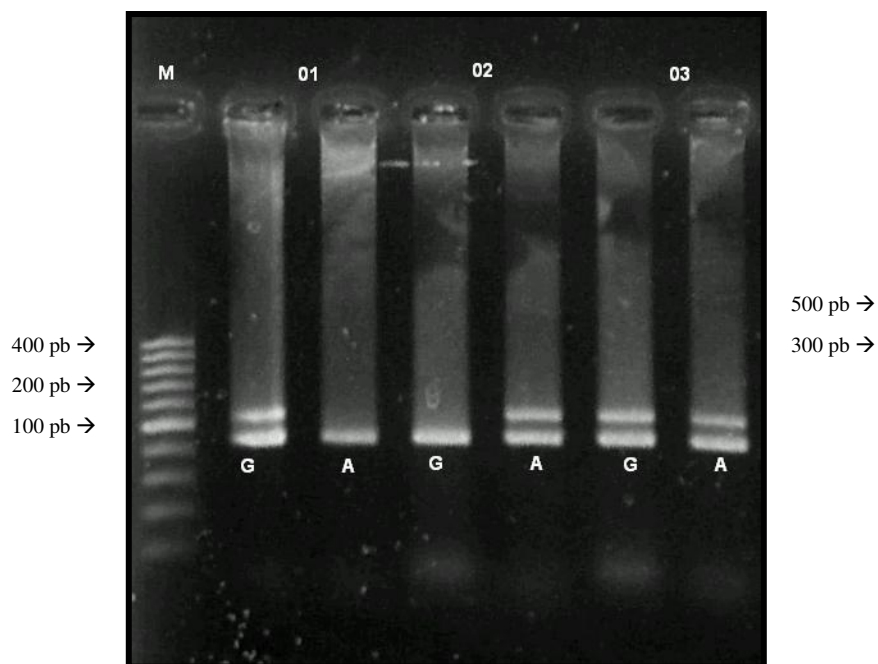


Tabela 1. Frequências dos fenótipos eritrocitários ABO e Lewis de acordo com o status secretor positivo (GG + GA) e negativo (AA).

ABO	Secretor positivo (GG + GA)		Secretor negativo (AA)		Total	
	N	%	N	%	N	%
A	19	39,5	8	36,4	27	38,6
B	8	16,7	3	13,6	11	15,7
AB	1	2,1	2	9,1	3	4,3
O	20	41,7	9	40,9	29	41,4
Lewis						
Le(a+b-)	0	0,0	10	45,5	10	14,3
Le(a-b+)	38	79,2	5	22,7	43	61,4
Le(a-b-)	10	20,8	7	31,8	17	24,3
Total	48	68,6	22	31,4	70	100,0