

## **Pérdida de la expresión antigénica ABH en pacientes con lesiones orales precancerosas y cancerosas**

### **Loss of ABH antigenic expression in patients with precancerous and cancerous oral lesions**

**Dr. Carlos Campi <sup>I</sup>; Prof. Dra. Livia Escovich <sup>I</sup>; Prof. Dra. Amelia Racca <sup>II</sup>; Dra Silvia García Borrás <sup>II</sup>; Est. Liliana Racca <sup>II</sup>; Dr. Carlos Cotorruelo <sup>II</sup>; Dr. Claudia Biondi <sup>II</sup>**

<sup>I</sup> Cátedra de Estomatología. Facultad de Odontología.

<sup>II</sup> Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

---

#### **RESUMEN**

Los antígenos ABH, productos de la interacción de 2 sistemas genéticos, Hh y ABO, están sujetos a leyes de herencia y pueden estar localizados no sólo en los eritrocitos, sino también en la mayoría de las células humanas. El objetivo del este trabajo fue investigar la expresión de antígenos ABH en pacientes con lesiones orales premalignas y malignas orales. Se trabajó con muestras incluidas en tacos de parafina de pacientes con lesiones orales (n= 57). Los pacientes fueron clasificados en 2 grupos: a) lesiones premalignas y malignas diagnosticadas clínica y anatopatológicamente y b) lesiones benignas (n=93). Se investigaron los antígenos ABH por la técnica de inmunoadherencia específica modificada. Se utilizó la adherencia al tejido vascular como control positivo y al tejido adiposo como control negativo. Los resultados fueron semicuantificados desde adherencia fuertemente positiva a negativa. Se observó una significativa relación entre la expresión antigénica ABH y el grado de malignidad de las lesiones analizadas (P Yates= 0,005). La pérdida de reactividad ABH en los sitios de mayor invasividad tumoral se correlaciona con el grado del desarrollo del tumor, el grado histológico y su malignidad.

**Palabras clave:** antígenos ABH, cáncer oral, lesión oral premaligna, técnica de inmunoadherencia, técnica de inhibición de la aglutinación.

---

#### **ABSTRACT**

The ABH antigens, which are produced by the interaction of 2 genetic systems, Hh and ABO, are subjected to laws of heredity and may be located not only in the erythrocytes, but also in most of the human cells. The objective of this paper was to investigate the expression of ABH antigens in patients with premalignant and malignant oral lesions. Work was done with samples included in paraffin plugs in patients with oral lesions (n= 57). The patients were classified into 2 groups: a) clinical and anatomopathologically diagnosed premalignant and malignant lesions, and b) benign lesions (n=93). The ABH antigens were investigated by the modified specific immunoadherence technique. Adherence to the vascular tissue was used as a positive control, whereas adherence to the fat tissue was considered as a negative control. The results were semiquantified from strongly positive to negative adherence. A significant relation between the ABH antigen expression and the degree of malignancy of the analyzed lesions (P Yates= 0.005) was observed. The loss of ABH reactivity in the sites of greater tumoral invasiveness is correlated with the tumor development degree, the histological degree and its malignancy.

**Key words:** ABH antigens, oral cancer, premalignant oral lesion, immunoadherence technique, agglutination inhibition technique.

---

## INTRODUCCIÓN

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. Algunos antígenos pluritulares son productos secundarios de genes que codifican glucosiltransferasas específicas y su expresión está bajo regulación sinérgica de varios sistemas genéticos, entre los que se encuentran los sistemas ABO, Hh, Ii, Lewis y los relacionados con el carácter secretor del individuo.<sup>1,2</sup>

Alteraciones en la expresión antigénica ABH en síndromes hematológicos malignos fue descrita primeramente por *van Loghem*, quien observó una expresión débil del antígeno A en un paciente con leucemia mieloide aguda. Actualmente la pérdida de la reactividad de los antígenos A, B, H de la superficie de los hematíes es reconocida como un fenómeno recurrente en procesos hematológicos malignos.<sup>3,4</sup> Se considera que la ausencia de los antígenos A, B en estas patologías es consecuencia de una alteración en los genes que codifican las glicosiltransferasas. En pacientes con pérdida de estos antígenos, una proporción variada de células rojas no son capaces de aglutinar con los reactivos específicos, dando una reacción característica de campo mixto. Igualmente este tipo de reacciones puede aparecer en individuos sanos asociados a raros alelos que codifican a los genes ABO.<sup>5</sup>

Existe amplia evidencia de que el cáncer está asociado con anomalías en la regulación génica y su expresión en la superficie de la membrana celular. Las alteraciones pueden ocurrir por bloqueo directamente de las moléculas superficiales de la célula que median la interacción, o alteraciones en su síntesis, organización del desarrollo y diferenciación.<sup>4,5</sup> En tumores, es posible encontrar cambios tanto en los glicolípidos como en las glicoproteínas.<sup>6,7</sup> La mayoría de los estudios han

investigado las alteraciones en los carbohidratos de la superficie celular. En recientes investigaciones, se ha demostrado que las modificaciones en la glicosilación participan en la mayoría de los fenotipos malignos, incluyendo señales de transducción y apoptosis.<sup>8,9</sup> Considerando que la mayoría de los cánceres humanos se originan a partir de células epiteliales, los cambios en los grupos sanguíneos constituyen un tópico importante de la inmunología tumoral.

El objetivo de este trabajo fue investigar la expresión antigénica ABH en cortes histológicos de pacientes con lesiones orales premalignas y malignas.

## **MÉTODOS**

Se trabajó con muestras de pacientes con lesiones orales premalignas y malignas (n=57) clasificados según el grado anatomopatológico, e individuos con lesiones orales benignas (n=93). También se analizó una población de individuos sin patología demostrable (n=81). Todos los pacientes estudiados fueron derivados de la Cátedra de Estomatología de la Universidad Nacional de Rosario, con consentimiento informado previo.

Los antígenos ABH en células de cortes histológicos de pacientes con lesiones orales pre-malignas y malignas fueron estudiados por la técnica de inmunoadherencia.<sup>10</sup> Las lesiones benignas fueron analizadas por la misma técnica. Se obtuvo muestra de mucosa yugal de los pacientes que fueron considerados controles normales. Se utilizó la técnica de inhibición de la aglutinación para detectar la presencia de antígenos solubles de grupo sanguíneo ABO.

*Células de mucosa yugal:* se obtuvieron por raspado de la cavidad interna de la boca y colectadas en tubo con 1mL de solución salina. Las mismas fueron sometidas a sucesivos choques térmicos (3 veces). Se centrifugaron las muestras y se trabajó con el sobrenadante.

### **Técnica de inhibición de la aglutinación<sup>11</sup>**

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

Se centrifugó a 1 000 rpm durante 1 minuto y se observó aglutinación macroscópica.

Con esta técnica se evalúa en forma indirecta la presencia de antígenos ABH solubles.

### **Técnica de inmunoadherencia<sup>10</sup>**

Las muestras de tejido proveniente de las lesiones orales premalignas y malignas (n=57) conservadas en bloque de parafina fueron sometidas a cortes con micrótopo, para obtener secciones de 4 mm de espesor, y posteriormente fueron adheridos sobre un portaobjetos. Luego se desparafinaron por cambios en solvente xilol y alcohol, se colorearon con hematoxilina y lavaron con buffer Tris-salina isotónico Ph 7, 4 durante 5 min eliminando el exceso de buffer.

Las secciones fueron cubiertas durante diez minutos, a temperatura ambiente, con antisuero monoclonal anti-A, anti-B o lectina anti-H (*Ulex europeus*), en concentración óptima de acuerdo al grupo sanguíneo específico del paciente.

Los portaobjetos colocados en un vaso de Coplic se incubaron 3 veces con buffer Tris durante 15 min para eliminar el antisuero o la lectina anti-H en exceso. Cada sección fue cubierta con una suspensión de eritrocitos isogrupo al corte en estudio, al 5 % en PBS, durante 15 min. Los glóbulos rojos pueden adherirse a la sección de tejido, desparafinado vía antisuero o lectina.

Posteriormente, se colocaron los preparados invertidos, sobre dos barras soporte, en una caja de Petri conteniendo buffer Tris, para que los eritrocitos estén en contacto con la solución buffer, lo cual permite eliminar los eritrocitos no adheridos. Se incubó durante 30 min y se observaron microscópicamente.

Se utilizaron como controles positivos el tejido vascular y como controles negativos el tejido adiposo.

### **Interpretación**

Los resultados fueron semicuantificados desde adherencia fuertemente positiva (++++) a adherencia negativa (-) de acuerdo al porcentaje de células del tejido en estudio con hematíes adheridos. Se utilizaron para designar niveles intermedios de adherencia: + equivalente al 25 % de adherencia, ++ a 50 % y +++ a 75 %.

### **Análisis estadístico**

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**

Los datos obtenidos de la expresión ABH en muestras de tejidos de lesiones orales se presentan en la tabla. Se observa una asociación significativa entre delección de los antígenos ABH en muestras de lesiones orales y grado de malignidad de las lesiones orales ( $p$  Yates= 0,005).

**Tabla.** Asociación entre histoantígenos ABH y patología oral

	PRECÁNCER/ CÁNCER		BENIGNAS	
	n	%	n	%
DELECIÓN (parcial o total)	51	89,4	36	38,7
CONSERVACIÓN	6	10,6	57	61,3

Las lesiones analizadas de precancer y cáncer oral mostraron una delección del 89,4 % en las muestras analizadas, mientras que el 10,6 % conservó la expresión antigénica ABH. En las lesiones benignas diagnosticadas anatomopatológicamente, el 38,7 % de las mismas presentaron una pérdida de la reactividad antigénica y el 61,3 % restante conservó su expresión.

Al analizar la presencia de antígenos ABH en muestras de mucosa yugal por la técnica de inhibición de la hemaglutinación en los 81 pacientes sin patología demostrable (controles normales) se observó que todas (100 %) conservaban su reactividad.

## DISCUSIÓN

Los glucoconjugados de membrana de las células epiteliales presentan carbohidratos antigénicos relacionados con las sustancias de grupo sanguíneo. Durante la progresión a la malignidad, estos oligosacáridos inmunodominantes sufren alteraciones específicas. El cambio más frecuente y destacable en las determinantes de grupo sanguíneo asociado con cáncer humano es la delección de antígenos de grupos sanguíneos A, B o H.<sup>6,7</sup>

En el diagnóstico histopatológico de rutina, la clasificación del tipo de tumor está basado en la apariencia histológica de la mayoría de las partes diferenciadas del tumor. Por otro lado, el pronóstico de la enfermedad está basado parcialmente en el grado de diferenciación del tejido. En la mayoría de los casos, el grado de diferenciación está determinado por la morfología celular del tejido analizado y por la capacidad de las células de sintetizar productos específicos tales como queratina y mucina. Previamente ha sido demostrado que la expresión de los carbohidratos sobre la superficie celular de epitelio estratificado está relacionado a la diferenciación celular.<sup>12,13</sup> En el presente trabajo, hemos utilizado la pérdida de la expresión de los antígenos ABH como marcador de diferenciación celular. Como la expresión de estos antígenos puede ser detectada a través de anticuerpos monoclonales, constituye un marcador de diferenciación más comúnmente utilizado en ensayos histológicos subjetivos. Se acepta que los tumores están compuestos por poblaciones celulares heterogéneas con distinto comportamiento biológico. Para

obtener una óptima información del pronóstico sobre el tumor, se debería estudiar todas las subpoblaciones celulares. Si la biopsia recogida no es representativa del tumor, el estudio de la reactividad ABH puede ser relacionado con el grado del tumor en estudio. Esto podría ser valor diagnóstico y pronóstico de la patología en estudio. Estudios similares de delección de antígenos ABH en cáncer de vejiga mostraron una asociación con peor pronóstico de la enfermedad.<sup>14-16</sup>

La mayoría de los estudios relacionados a la localización de los antígenos de grupo sanguíneo en los tejidos han indicado que los mismos corresponden al grupo sanguíneo eritrocitario.<sup>2,17</sup> Asimismo, la expresión de estos antígenos en tejidos normales es dependiente del tipo de diferenciación del epitelio y del grado de maduración de la célula individual en el epitelio. En epitelio estratificado, la expresión de dichos antígenos depende del grado de maduración celular presentando una elongación secuencial del carbohidrato terminal de la cadena durante su vida media.

En el presente trabajo, el análisis de los cortes de tejidos demostró que los pacientes con mayor grado de malignidad, o con lesiones pre malignas presentaron una delección total o parcial de los antígenos de grupo sanguíneo ABH. La pérdida antigénica observada en las células de lesiones pre malignas y malignas podría ser consecuencia de un paro en la maduración de los antígenos celulares. Además, la pérdida de la expresión de los antígenos en las secciones de tejido de las lesiones tumorales, se encuentra significativamente correlacionada con el grado del desarrollo del tumor y el grado de malignidad histológico.<sup>18,19</sup>

Los estudios de los pacientes con lesiones orales premalignas y malignas, mostraron que la pérdida de la expresión antigénica ABH, podría ser utilizada como marcadores de riesgo en el desarrollo de cáncer oral. Los antígenos A, B y H que están presentes en la superficie de los eritrocitos, también se encuentran en todos los tejidos epiteliales y endoteliales.<sup>12</sup> Cuando las células normales se transforman en malignas estos antígenos se pierden y por lo tanto, esta delección podría ser utilizada como una herramienta de diagnóstico para la detección y pronóstico del cáncer oral.

En conclusión, nuestros resultados indicarían que al mismo tiempo que ocurren cambios morfológicos durante el proceso de carcinogénesis oral, ocurren otras series de eventos. De todos modos, son requeridos mayores estudios para clarificar el rol de los marcadores predictivos en lesiones precursoras de cáncer oral.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mollison PI, Engelfriet CP, Contreras P. Blood Transfusion. En: Clinical Medicine. 9 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1993.
2. Salmon C. Les Groupes sanguins ou l'écriture des Genes. Paris: Editorial Masson; 1997.
3. Clausen H, Bennett EP, Grunnet N. Molecular genetics of ABO. Vox Sang 1994; 78(Suppl 2):91\_103.
4. Le Pendu J, Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Moullac-Vaidye B, Clement M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. APMIS 2001; 109:9\_31.

5. 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\_66.
6. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:10231\_3.
7. Gao S, Worm J, Guldborg P, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ. Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* (2004b);109:230\_7.
8. Mandel U, Orntoft TF, Holmes EH, Sorensen H, Clausen H, Hakomori S, et al. Lewis blood group antigens in salivary glands and stratified epithelium: lack of regulation of Lewis antigen expression in ductal and buccal mucosal lining epithelia. *Vox Sang* 1991;61:205\_4.
9. Hakomori S, Handa K. Glycosphingolipid-dependent cross-talk between glycosynapses interfacing tumor cells with their host cells: essential basis to define tumor malignancy. *FEBS Lett* 2002;531:88\_92.
10. Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* 2000;108:1\_28.
11. Walkers J. American Association of Blood Banks. Manual técnico. 13 ed. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. Buenos Aires; 2002.
12. Strauchen JA, Bergman SM, Hanson TA. Expression of A and B Tissue Isoantigens in benign and malignant lesions of the Breast. *Cancer* 1980;45:2149\_61.
13. Strauchen JA, Bergman SM, Hanson TAM (1998). Expression of A and B Tissue Isoantigens in benign and malignant lesions of the Breast. *Cancer* 45:2149\_55.
14. Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* 2000;108:1\_28.
15. 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\_66.
16. Solís E, Provenzal O, Valverde J, Biondi C, Foresto P, Muller R, et al. Comparative study of the ABH antigenic expression between urothelium and buccal desquamation cells in patients with bladder carcinoma. *Acta Urol Itál* 1997;1:187-8.
17. Foresto P, Biondi C, Racca L, Brufman A, Yaber F, Solís E, Provenzal O, Valverde J. Glicosilación anormal de antígenos ABH solubles en patologías tumorales del tracto urinario. *Arch Esp Urol* 2000;53:196-9.
18. Santos-García A, Abad-Hernández MM, Fonseca-Sánchez E, Julián-Gonzalez R, Galindo-Villardón P, Cruz-Hernández J. E-cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E100-5.
19. Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* 2000; 108:1\_28.

*Dra. Claudia Biondi.* Laboratorio de Inmunohematología Histocompatibilidad e Inmunogenética. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Alvear 696. 2000, Rosario, Argentina. Tel: 54 341 4804592, Fax: 54 341 4370765. e-mail: [cbiondi@fbioyf.unr.edu.ar](mailto:cbiondi@fbioyf.unr.edu.ar)