

Polimorfismo G1385A del gen *RNASEL* y su asociación con el desarrollo de cáncer de próstata. Estudio preliminar.

William Zabala, Criserly Delgado, Tatiana Pardo, Lisbeth Borjas, Alicia Rojas- Atencio, Francia Reyes y José Miguel Quintero.

Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: *RNASEL*, cáncer de próstata, *HPC1*, G1385A.

Resumen. El cáncer de Próstata (CAP), es una enfermedad compleja de origen multifactorial. Se caracteriza por patrones heterogéneos de crecimiento de tejido neoplásico, que varían ampliamente en su progresión, edad de aparición y respuesta al tratamiento. Se considera la segunda causa más común de muerte por malignidad en hombres y se estima que uno de cada cinco padece de CAP en el curso de su vida. La etiología genética de la transformación neoplásica de las células prostáticas normales aún es desconocida, sin embargo, investigaciones epidemiológicas han demostrado un fuerte componente genético en su desarrollo, y sugieren tanto un patrón de herencia mendeliana como la presencia de loci de susceptibilidad a lo largo del genoma humano. Se ha descrito una región cromosómica relacionada con el CAP denominada como *HPC1*, en el locus 1q24-25, donde se ubica el gen *RNASEL*, y las mutaciones en el mismo, se han asociado con la presencia del CAP en múltiples grupos familiares. EL gen *RNASEL* codifica para una ribonucleasa que degrada ARN viral y celular y que interviene en la apoptosis. Se ha reportado disminución de la actividad enzimática de hasta tres veces en portadores del polimorfismo G1385A de este gen, y la misma se ha asociado frecuentemente con el desarrollo del CAP. Mediante la utilización de una variante de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), una amplificación alelo específica, se estudiaron 103 individuos masculinos con y sin CAP pertenecientes a la población de Maracaibo, Venezuela, evidenciándose ausencia de asociación.

G138A polymorphism of the RNASEL gene and its association with the development of prostate cancer. Preliminary study.

Invest Clin 2009; 50(3): 295 - 301

Key words: RNASEL, Prostate cancer, HPC1, G1385A.

Abstract. Prostate Cancer (CAP), is a complex disease with a multifactorial origin. It is characterized by heterogenous patterns of growth of neoplastic tissue, varying widely in its progression, age of beginning and therapy response. It is considered as the second most common cause of death by cancer in men and, it has been estimated, that one of five, suffers of CAP through the course of his life. The genetic etiology of neoplastic transformation of normal prostate cells is still not known; nevertheless, investigations in epidemiology have demonstrated a strong genetic component in its development, suggesting so much a pattern of mendelian inheritance as the presence of loci of susceptibility throughout the human genome. It has been described a cromosomic location related to the CAP in locus 1q24-25, denominated HPC1, where the gene RNASEL is located, and the seggregation of its alleles has been associated with the development of CAP in numerous familiar groups. The RNASEL gene codifies for a ribonuclease protein that degrades viral and cellular ARN and takes part in the apoptosis. A decrease of the enzymatic activity up to three times in carriers of the G1385A polymorphism of this gene has been reported, and the same has been associated frequently with the development of CAP. Using a variant of the Polymerase Chain Reaction, Allele specific amplification, this investigation had as objective to determine the association between variant G1385A and CAP, in a sample of 103 masculine individuals with and without CAP, pertaining to the population of Maracaibo, Venezuela, An association between these variants and CAP could not be demonstrated.

Recibido: 23-06-2008. Aceptado: 20-11-2008.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CAP), es la causa más común de muerte por cáncer en hombres de países desarrollados (1-3). La Sociedad Americana del Cáncer ha notificado para el año 2008 un incremento de 186.320 nuevos casos, y se estima que 28.600 serán defunciones a consecuencia del mismo (4). La prevalencia varía al comparar grupos étnicos, con el mayor número de casos en los afroamericanos y el menor en los asiáticos. El riesgo de desarrollar CAP

se incrementa hasta 3 veces al tener un familiar de primer grado afectado (2, 3, 5), con lo que se reconoce que el componente genético juega un papel importante en el desarrollo de CAP. El análisis de ligamiento y los estudios de segregación han sugerido un gran número de regiones cromosómicas portadoras de loci de susceptibilidad para el CAP (1-3, 6), sin embargo, la pérdida de consistencia entre los estudios denota que el CAP es un desorden genéticamente heterogéneo con múltiples loci y factores medioambientales involucrados en su etiología.

En el año 1996, se reportó el primer locus de susceptibilidad al CAP en la región 1q24-25, que se llamó *HPC1* (*Hereditary Prostate Cancer Locus Chromosome 1*). Estudios posteriores de ligamiento han aportado resultados mixtos sobre la relevancia o no de esta región en el CAP (5, 7-9). En un estudio multicéntrico internacional donde se analizaron 772 familias se encontró evidencia de ligamiento a esta zona en el 6% de las familias consideradas (10).

El RNASEL (NM_021133; OMIM: 180435), es un gen que se encuentra ubicado en la región HPC1, contiene 8 exones y codifica una endoribonucleasa (Ribonucleasa L) de 741 aminoácidos que se expresa constitutivamente en tejido prostático, timo, bazo, testículos, intestinos y colon. Actúa como un mediador de la actividad pro-apoptótica y de respuesta antiviral del sistema inducible por interferón 2-5A (11-13). Debido a su participación en la regulación del ciclo celular, se ha sugerido como un posible gen candidato Supresor de Tumores (8, 10).

Varias mutaciones y polimorfismos se han reportado en este gen, entre las cuales, la variante G1385A que conlleva a la sustitución Arg462Gln (R462Q), ha sido frecuentemente asociada con el incremento del riesgo a desarrollar CAP (8-10). Xiang y col., demostraron que la presencia de esta variante polimórfica se asocia con reducción de la actividad de la proteína RNase L para inducir apoptosis en respuesta de la activación de la vía 2-5A (14). De allí, surge la hipótesis que este polimorfismo u otras variantes alélicas en el gen *RNASEL* puedan provocar una actividad funcional disminuida y brindar una adaptación positiva a las células tumorales que les permita escapar de la vía apoptótica y por ende facilitar el desarrollo del proceso tumoral.

En este trabajo se presentan los datos preliminares de la evaluación del comportamiento del polimorfismo G1385A en una

muestra de población de Maracaibo, Venezuela y su valoración al asociarlo con el desarrollo de cáncer de próstata.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio descriptivo, de tipo caso-control donde se analizaron 103 individuos masculinos que acudieron al servicio de Urología del Hospital Universitario de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. Se estudiaron 51 pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata, con una edad promedio de 66 años (rango 46-84 años) y 52 individuos masculinos con una edad promedio de 63 años (rango de 45-79 años). Se consideraron en el grupo de casos aquellos varones con diagnóstico de CAP confirmados mediante mediciones de APE (Antígeno Prostático Específico) con valores inferiores a 4ng/mL, biopsia positiva, y edad mayor de 35 años. Un total de 51 individuos cumplieron con estos criterios. De igual forma se estudiaron 52 sujetos mayores de 45 años, quienes conformaron el grupo control, cuyos resultados fueron negativos para el diagnóstico de CAP. Todos los participantes en el estudio firmaron su consentimiento a participar, luego de explicarles la naturaleza del mismo. El protocolo de esta investigación fue aprobado por el comité de ética de la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia, Venezuela.

El ADN se extrajo a partir de una muestra de 3 mL de sangre periférica, por método estandarizado en la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia (15). La identificación del polimorfismo G1385A, se realizó mediante la técnica descrita por Casey y col. (3), y consistió en la aplicación de una variante de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), llamada Sistema de Amplificación de Mutación Refractaria (SAMR) y que consiste en una Amplificación Alelo Específica donde se utiliza tres iniciadores, dos de los

cuales diseñados para unirse solo con la secuencia específica del alelo a ser identificado, lográndose la amplificación efectiva sólo cuando el alelo en cuestión está presente en la muestra. La RCP se realizó en un volumen final de 15 μL conteniendo 100 ng de ADN, 3,5 μL de buffer 5x Taq ADN polimerasa, 1 μL MgCl_2 , 0,3 μL dNTPs, 0,5 U Taq polimerasa, 0,25 μL de cada iniciador. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización prolongada a 94°C por 5 minutos, seguida de una desnaturalización corta a 95°C por 50 segundos, un anillado a 55°C por 50 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos; este ciclo se repitió durante 38 veces y culminó con una extensión final a 72°C por 5 minutos. La caracterización de los genotipos se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y su posterior visualización en pantalla de luz ultravioleta (UV).

Análisis estadístico

La estimación de las frecuencias alélicas, genotípicas observadas y esperadas se realizó de forma manual. Se utilizó la prueba del Chi cuadrado (χ^2), con un nivel de significación de $p \leq 0,05$ para evaluar equilibrio de Hardy-Weimberg (EqHW), y para establecer la significancia estadística de las diferencias entre las frecuencias alélicas de los casos y controles se estimó la Razón de Posibilidades (RP), con intervalo de confianza de 95% para el cual se utilizó el paquete estadístico SAS/STAT (Sistema de Análisis Estadístico).

RESULTADOS

Los valores de APE tuvieron una media de $138,6 \pm 47$ ng/mL para los individuos con CAP y de $1,34 \pm 0,9$ ng/mL en los controles.

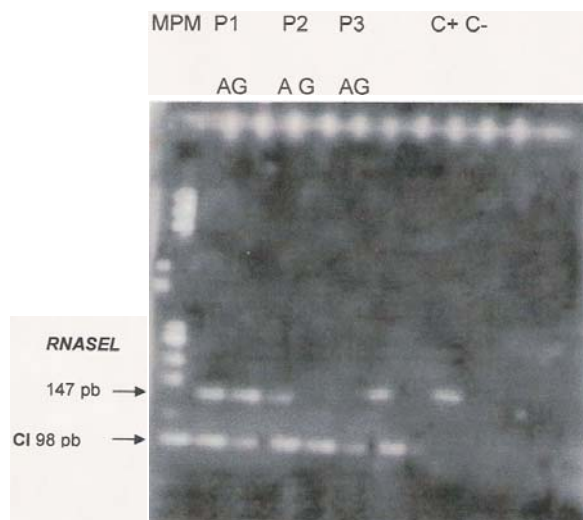
En el grupo con CAP se detectaron 4 individuos homocigotos AA (7,8%), 10 indi-

viduos heterocigotos AG (19,6%) y 37 individuos homocigotos GG (72,5%), mientras que en el grupo control se observaron: 2 individuos homocigotos AA (3,8%), 16 AG (30,8%), y 34 (65,4%) homocigotos GG. Con frecuencia de 0,1782 para el alelo A y 0,8317 para el alelo G en los casos y de 0,1923 para el alelo A y 0,8077 para el alelo G en los controles. El polimorfismo se encontró en EqHW en ambos grupos. El cálculo del RP reveló que no existen diferencias significativas que corroboren la asociación entre el polimorfismo G1385A (Arg462Gln) del gen *RNASEL* y el riesgo de desarrollar cáncer de próstata. Con relación a la presencia del alelo mutado y el alelo normal se obtuvo un valor de RP de 0,76 (IC 95% de 0,33-1,76/ $p=0,5193$), mientras que los individuos homocigotos GA presentaron un RP de 0,61 (IC 95% de 0,24-1,52) y los homocigotos mutantes (AA) un RP de 2,06 (IC 95% de 0,35-12,02) con una $p=0,3379$, igualmente no significativos estadísticamente (Tabla I).

DISCUSIÓN

El cáncer de próstata (CAP) es un tumor maligno que afecta a la glándula prostática y cuyos síntomas suelen aparecer tardíamente, cuando el paciente ya se encuentra en una etapa avanzada del mismo. La etiología permanece desconocida pero se reconoce su naturaleza compleja donde intervienen agentes genéticos y medioambientales (1, 2, 8, 10, 16).

Estudios moleculares han aportado evidencia sobre la posible presencia de un gen de susceptibilidad en la región cromosómica denominada *HPCI* (17), donde se encuentra ubicado el gen *RNASEL*. Se han descrito diversas mutaciones y polimorfismos en este gen, y su asociación con el CAP ha sido ampliamente evaluada (1-3, 5, 8, 10), encontrándose que la variante G1385A, ha mostrado un impacto importante al asociarla



MPM: marcador de peso molecular. P1: paciente 1 (heterocigoto para el polimorfismo). P2: paciente 2 (homocigoto para el polimorfismo). P3: paciente 3 (homocigoto para el alelo normal). C+: control positivo. C-: control negativo. CI: control interno (CTFR).

Fig. 1. Amplificación del polimorfismo G1385A en el gen RNASEL en un grupo de muestras analizadas. Gel de agarosa al 2%. Tinción: Bromuro de Etidio. MPM: Marcador de peso molecular Θ 174X HAE III.

con el desarrollo y evolución del CAP. Casey y col., sugirieron que aproximadamente el 13% de los CAP estudiados en su población podrían ser atribuibles a la presencia de este polimorfismo (3).

Rokman y col. (1), evaluaron variaciones del gen RNASEL en 66 pacientes finlandeses con CAP hereditario y encontraron una asociación con la presencia del polimorfismo G1385A, con un RP=1,96 el cual no fue estadísticamente significativo. Así mismo, Casey y col., estudiaron casos de CAP esporádico y hereditario y detectaron que el polimorfismo G1385A mostró una asociación significativa con el desarrollo del CAP, con un RP=2,12 (IC 1,19-3,78/ $p=0,011$) (3). En un estudio similar realizado por Wang y col. (8), se encontró una asociación significativa con esta variante pero en tendencia opuesta al estudiar 473 individuos afectados por CAP de 181 familias con un RP de 0,83 (IC 0,61-1,13) para heterocigotos y de 0,54 (IC 0,32-0,91), para homocigotos, $p=0,02$.

Los presentes resultados son similares a los publicados por Wiklund y col. (10) quienes estudiaron 1624 pacientes con CAP y 801 controles y no encontraron asociación significativa entre este polimorfismo y el CAP al ver que la distribución del mismo fue similar. De igual manera, Daugherty y col. (18) estudiaron 1317 casos de cáncer de próstata y 1842 controles, y no encontraron asociación, al comparar los

TABLA I
GENOTIPOS OBSERVADOS, FRECUENCIAS ALÉLICAS, E_qHW Y RAZÓN DE POSIBILIDADES (RP), ENTRE LA PRESENCIA DEL ALELO MUTADO DEL GEN RNASEL Y EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

	Genotipos observados	Frecuencias alélicas	E _q HW*	RP (95% IC)		
				Alelo A	GG vs GA	GG vs AA
Controles n=52	GG 34	A 0,1923 G 0,8077	0,000861
	AG 16		
	AA 2		
Casos n=51	GG 37	A 0,1782 G 0,8317	0,104271	0,76 (0,33-1,76)	0,61 (0,24-1,52)	2,06 (0,35-12,02)
	AG 10			$p=0,5193$	$p=0,3379$	
	AA 4					

* Equilibrio de Hardy-Weimberg nivel de significación de $p \leq 0,05$. No significativo.

homocigotos para el alelo mutado, los heterocigotos y los homocigotos para el alelo normal.

En este estudio preliminar la falta de asociación puede ser atribuida principalmente al tamaño de la muestra analizada, por lo que se necesita incrementar la misma para llegar a consideraciones más concretas sobre el papel del polimorfismo G1385A en el desarrollo de esta neoplasia en futuros trabajos. Por otro lado, es de considerar que la etiología del CAP no pueda ser explicada por variabilidad alélica en un solo gen, debido a su naturaleza poligénica y multifactorial, la cual resulta probablemente de interacciones complejas entre diferentes variantes genéticas y factores ambientales. Los estudios de asociación en enfermedades humanas complejas suelen presentar resultados contradictorios, estas diferencias pueden deberse a variaciones metodológicas, limitaciones del tamaño de las muestras, clasificación errónea del fenotipo, o a diferencias en las frecuencias subyacentes de alelos en los grupos poblacionales estudiados, entre otros (19).

En virtud de los hallazgos encontrados en esta investigación los autores se proponen ampliar el tamaño de la muestra, así como tomar en cuenta otras variantes alélicas que puedan estar involucradas en el amplio espectro del CAP. Además es recomendable realizar estudios epidemiológicos más amplios que permitan conocer la prevalencia real de estas enfermedades crónico-degenerativas, entre las cuales se encuentra incluido el cáncer y sus diferentes variantes, de manera que se puedan seleccionar muestras importantes en estudios multicéntricos a nivel nacional.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue subvencionado por el CONDES, bajo el número VAC-CONDES- CC-0729-06

REFERENCIAS

1. Rokman A, Ikonen T, Seppala EH, Nupponen N, Autio V, Mononen N, Bailey-Wilson J, Trent J, Carpten J, Matikainen MP, Koivisto PA, Tammela TL, Kallioniemi OP, Schleutker J. Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1299-1304.
2. Carpten J, Nupponen N, Issacs S, Sood R, Robbins C, Xu J, Faruque M, Moses T. Germiline mutations in ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet* 2002; 30:181-184.
3. Casey G, Neville P, Plummer S, Xiang Y, Krumroy L, Klein E, Catalona W, Nupponen N, Carpten JD, Trent J, Silverman R, Witte J. *RNASEL* Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nat Genet* 2002; 32:581-583.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.
5. Rennert H, Zeigler-Johnson CM, Addya K, Finley MJ, Walker AH, Spangler E, Leonard DG, Wein A, Malkowicz SB, Rebbeck TR. Association of susceptibility alleles in ELAC2/HPC2, RNASEL/HPC1, and MSR1 with prostate cancer severity in European American and African American men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 4: 949-957.
6. Li H, Tai B. *RNASEL* gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2006; 1:5713-5719.
7. Neuhausen S, Farnham J, Kort E, Tavtigian S, Skolnick M, Cannon-Albright L. Prostate cancer susceptibility locus HPC1 in utah high-risk pedigrees. *Hum Mol Genet* 1999; 13:2437-2442.
8. Wang L, McDonnell S, Elkins D, Slinger S, Christensen E, Marks A, Cunningham J, Peterson B, Jacobsen S, Cerhan J, Blute M, Schaid D, Thibodeau S. Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2002; 71:116-123.

9. Goddar K, Witte J, Soares B, Catalona W, Olson J. Model-Free linkage Analysis with covariates confirms linkage of prostate cancer to chromosomes 1 and 4. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1197-1206.
10. Wiklund F, Jonson BA, Brookes A, Adolfsson J, Emanuelsson M, Adami H, Augustsson K. Genetic analysis of the *RNASEL* gene in hereditary, familial and sporadic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7150-7156.
11. Hassel B, Zhou A, Sotomayor C, Maran A, Silverman R. A dominant negative mutant of 2-5A- dependent Rnase suppresses anti-proliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J* 1993; 12:3297- 3304.
12. Chen H, Griffin A, Q-Wu Y, Tomsho L, Zuhlke K, Lange E, Gruber S, Cooney K. *RNASEL* mutations in hereditary prostate cancer. *J Med Genet* 2003; 40:21-28.
13. Krüger S, Engel C, Bier A, Silber A, Görgens H, Mangold E, Pagenstecher C, Holinski-Feder E, Von Knebel Doeberitz M, Royer-Pokora B, Dechant S, Pox C, Nils R, Müller A, Schacker H and The German HNPCC Consortium. The additive effect of p53 Arg72Pro and *RNASEL* Arg462Gln genotypes on age of disease onset in Lynch syndrome patients with pathogenic germline mutations in MSH2 or MLH1. *Cancer Lett* 2007; 258(1):55-62.
14. Xiang Y, Wang Z, Murakami J, Plummer S, Klein EA, Carpten JD, Trent JM, Isaacs WB, Casey G, Silverman RH. Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-Oligoadenylates. *Cancer Res* 2003; 63:6795-6801.
15. Miller A, Dykes D, Polesky H. a simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988; 16:1215-1216.
16. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 8:3367-3371.
17. Smith J, Freije D, Carpten J, Gronberg H, Xu J, Isaacs S, Brownstein M, Bova G, Guo H. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 1996; 274:1371-1374.
18. Daugherty S, Hayes RB, Yeager M, Andriole GL, Chatterjee N, Isaacs WB, Platz E. *RNASEL* Arg462Gln polymorphism and prostate cancer in PLCO. *Prostate* 2007; 8:849-854.
19. Hirschhorn J, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002; 2:45-61.