

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS DE ARARAQUARA**

**POLIMORFISMOS DOS GENES *ABO*, *LEWIS* E *SECRETOR*  
CORRELACIONADOS COM O CÂNCER DE MAMA**

***DÉBORA BARRETO TERESA GRADELLA***

**ARARAQUARA-SP**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS DE ARARAQUARA**

***DÉBORA BARRETO TERESA***

**POLIMORFISMOS DOS GENES *ABO*, *LEWIS* E *SECRETOR*  
CORRELACIONADOS COM O CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação  
em Análises Clínicas da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas – UNESP –  
Araraquara como pré-requisito para obtenção  
do título de doutor

***ORIENTADORA: Dra. CHRISTIANE PIENNA SOARES***

**ARARAQUARA-SP**

**2007**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**UNESP – Campus de Araraquara**

Gradella, Débora Barreto Teresa

G732p Polimorfismos dos genes *ABO*, *Lewis* e *Secretor* correlacionados com o câncer de mama. / Débora Barreto Teresa Gradella . – Araraquara, 2007. 127 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Christiane Pienna Soares

1. Gene ABO. 2. Gene Lewis. 3. Gene Secretor. 4. Câncer de mama. 5. Polimorfismo. I. Soares, Christiane Pienna, orient. II. Título.

**CDD: 612.11825**

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Christiane Pienna Soares – Orientadora e Presidente

Profa. Dra. Sílvia Regina Rogatto – Membro Titular

Profa. Dra. Lílian Maria de Castilho – Membro Titular

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos – Membro Titular

Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira – Membro Titular

*Tenha **coragem** para mudar o que  
pode ser mudado, **paciência** para  
aceitar o que não pode ser mudado e  
**sabedoria** para diferenciar uma coisa  
da outra.*

*Ditado Chinês*

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho à minha  
amada filha Heloisa, a maior  
razão da minha vida.*

## *Agradecimentos Especiais*

*Ao meu querido marido*

*Alexandre, por toda sua compreensão, amor, paciência, apoio, pelo exemplo de pai e marido e pela nossa maravilhosa filha.*

*À minha mãe amada*

*Maria Luíza, exemplo de mãe, por tudo fez e faz pelos seus filhos, não medindo esforços para que nossa felicidade venha sempre em primeiro lugar. Obrigada pelo amor, dedicação, apoio, paciência, por cuidar da nossa nenezinha, enfim, por tudo...*

*Ao meu amado pai*

*José, pelo amor, paciência, apoio e por me oferecer todas as condições para que eu pudesse chegar até aqui.*

*Aos meus queridos irmãos*

*Amanda e Fabrício, pelos bons momentos que passamos juntos, pelos conselhos, pelo amor. Vocês me enchem de orgulho e alegria.*

*Aos meus padrinhos queridos*

*Maria do Carmo e Neto pela participação sempre constante na minha vida, pela amizade, carinho e apoio.*

## *Agradecimentos*

*À Profa. Dra. Christiane Pienna Soares, pela oportunidade, confiança, amizade e formação científica.*

*Ao Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira pela amizade, confiança, paciência, apoio e por permitir o uso de seu laboratório.*

*Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, pelo auxílio e colaboração em todas as etapas deste projeto.*

*Aos membros da banca Dra. Sílvia Rogatto, Dra. Lílian Maria de Castilho, Dr. Luiz Carlos de Mattos e Dr. Haroldo Wilson Moreira pelas críticas e sugestões, contribuindo para a melhoria do trabalho.*

*Aos médicos Dr. Leonardo da Cunha, Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara e Dr. Nicolino Lía Neto por terem contribuído no recrutamento das pacientes e no diagnóstico histopatológico.*

*À Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi pela colaboração na realização deste trabalho.*

*À Profa. Dra. Maria José Mendes Gianini por permitir o uso de equipamentos do seu laboratório.*

*Ao Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite pelos cartões utilizados na fenotipagem do sistema Lewis.*

*Às queridas amigas Luciane, Paula, Sami e Roberta, pela amizade, paciência, auxílio e pelos bons momentos que passamos juntas.*

*Aos meus familiares de Pereira Barreto, pelos momentos de descontração e felicidade.*

*À Juliana Cintra e Raquel Alves Santos pela disposição, paciência e auxílio na realização deste trabalho.*

*A Lúcia e Patrícia, pela paciência e coleta de sangue das pacientes.*

*À Gisela, Maísa, Pâmela e Aline pela disposição em auxiliar nas etapas finais deste trabalho.*

*A Elza Regina, pela realização da fenotipagem ABO das mulheres doadoras de sangue.*

*Às funcionárias do Hemonúcleo Regional de Araraquara, Cristiane e Marcy pela colaboração durante a coleta de sangue das doadoras de sangue.*

*Ao Agenor por viabilizar o empréstimo da centrífuga.*

*Ao Max, Rosemira e Nancy, pelos momentos agradáveis de muitas risadas.*

*Às funcionários da Seção de Pós-Graduação, Sônia, Laura e Cláudia pela paciência e atenção.*

*À Diamed pelo fornecimento dos cartões para fenotipagem Lewis*

*Aos voluntários participantes deste trabalho, pelas amostras cedidas.*

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.*

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| Lista de Abreviaturas .....  | xii  |
| Lista de Tabelas .....   | xiv  |
| Lista de Figuras .....   | xv   |
| Resumo .....   | xvi  |
| Abstract .....   | xvii |
| 1. Introdução .....  | 01   |
| 2. Justificativa .....   | 18   |
| 3. Objetivos .....   | 20   |
| 4. Materiais e Métodos   |      |
| 4.1. Casuística  |      |
| 4.1.1. Grupo de Estudo .....   | 23   |
| 4.1.2. Grupo Controle .....  | 24   |
| 4.2. Metodologia   |      |
| 4.2.1. Coleta dos materiais.....   | 25   |
| 4.2.2. Fenotipagem sorológica dos grupos ABO e Lewis .....   | 25   |
| 4.2.3. Extração e quantificação do DNA .....   | 25   |
| 4.2.4. Amplificação gênica para verificação dos alelos do <i>locus</i><br><i>ABO</i> .....                 | 26   |
| 4.2.5. Identificação dos alelos do <i>locus ABO</i> por restrição<br>enzimática .....                      | 28   |
| 4.2.6. Amplificação gênica alelo específico para verificação de<br>mutações do gene <i>FUT3</i> .....      | 31   |
| 4.2.7. Definição e uso dos genótipos Lewis .....   | 33   |
| 4.2.8. Amplificação gênica alelo específico para verificação da<br>mutação G428A do gene <i>FUT2</i> ..... | 34   |
| 4.3. Análise estatística .....   | 35   |
| 5. Resultados .....  | 36   |
| 6. Discussão .....   | 52   |
| 7. Conclusões .....  | 60   |
| 8. Referências Bibliográficas .....  | 63   |

## 9. Anexos

|                |     |
|----------------|-----|
| Artigo 1 ..... | 83  |
| Artigo 2 ..... | 101 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

as - antisense

Ca – Carcinoma

CADI – Carcinoma Ductal Invasivo

CADIS – Carcinoma Ductal *in situ*

CALIS – Carcinoma Lobular *in situ*

CCND1 – Ciclina D1

COMT – Catecol o-metiltransferase

CYP17 – Citocromo P450 família 17

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FUT – Fucosiltransferase

Gal – Galactose

GalNAc – N-Acetilgalactosamina

GlcNAc – N-Acetilglicosamina

GSTP-1 – Glutathione S-transferase 1

H - Heterozigoto

hGH – Hormônio do crescimento

Le – Lewis

M – Mutante homozigoto

MTHFR – metilnotetrahidrofolato redutase

pb – pares de base

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

PCR-AE - Reação de Polimerase em Cadeia – Alelo Específico

S - Selvagem

SDS – Dodecil Sulfato de sódio

Se – Secretor

TE – Tampão Tris-EDTA

XPD – Xeroderma Pigmentosum D

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - <i>Primers</i> utilizados para caracterização dos genótipos do grupo sanguíneo ABO.....   | 27 |
| <b>Tabela 2</b> - Condições de reação utilizadas na amplificação dos fragmentos por PCR.....  | 27 |
| <b>Tabela 3</b> - Sequência de primers <i>sense</i> e <i>anti-sense</i> e os alelos correspondentes à ligação de cada primer. ....  | 32 |
| <b>Tabela 4</b> - Tamanho dos produtos obtidos por PCR-AE para determinação das mutações T59G, T1067A, T202C e C314T do gene <i>Lewis (FUT3)</i> .....  | 33 |
| <b>Tabela 5</b> - Sequência de <i>primers sense</i> e <i>anti-sense</i> utilizados para determinação da mutação G428A no gene <i>FUT2</i> .....   | 34 |
| <b>Tabela 6</b> – Frequência de fenótipos e genótipos do grupo sanguíneo ABO nas pacientes portadoras de câncer de mama e no grupo controle .....   | 40 |
| <b>Tabela 7</b> – Características clinicopatológicas das pacientes portadoras de câncer de mama associadas com o grupo sanguíneo ABO .....  | 42 |
| <b>Tabela 8</b> – Frequência das mutações e dos alelos do gene <i>FUT3</i> em pacientes portadoras de câncer de mama e doadoras de sangue .....   | 44 |
| <b>Tabela 9</b> – Genótipos obtidos a partir da associação de quatro polimorfismos do gene <i>FUT3</i> (T59G, T1067A, T202C e C314T) em pacientes portadoras de câncer de mama (grupo em estudo) e doadoras de sangue (grupo controle)..... | 47 |
| <b>Tabela 10</b> - Mutações do gene <i>FUT3</i> (T59G, T1067A, T202C e C314T) encontradas nos indivíduos fenotipados como Lewis negativo: Le(a-b-).....   | 48 |
| <b>Tabela 11</b> – Características clinicopatológicas das pacientes portadoras de câncer de mama associadas com os genótipos dos grupos Lewis e Secretor.....   | 51 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Síntese dos antígenos ABH e Lewis.....   | 04 |
| <b>Figura 2</b> – Modelo Genético para o desenvolvimento do câncer de mama.....  | 14 |
| <b>Figura 3</b> - Representação dos exons 6 e 7 do gene <i>ABO</i> e as mutações selecionadas para diferenciar os alelos <i>A</i> , <i>B</i> , e <i>O</i> .....  | 26 |
| <b>Figura 4</b> - Estratégia de análise e interpretação para caracterização dos alelos do locus <i>ABO</i> . .....   | 29 |
| <b>Figura 5</b> – Padrão de bandas obtido com a digestão do fragmento de 249pb com a enzima <i>KpnI</i> . Genótipos do grupo A ( <i>AA</i> , <i>AO<sup>1</sup></i> , <i>AO<sub>2</sub></i> ), genótipos do grupo B ( <i>BO<sup>1</sup></i> , <i>BO<sup>2</sup></i> , <i>BB</i> ) e genótipos do grupo O ( <i>O<sup>1</sup>O<sup>1</sup></i> , <i>O<sup>1</sup>O<sup>2</sup></i> e <i>O<sup>2</sup>O<sup>2</sup></i> )..... | 30 |
| <b>Figura 6</b> - Padrão de bandas de diferentes genótipos obtidos após digestão do fragmento de 249pb com a enzima <i>KpnI</i> . .....  | 37 |
| <b>Figura 7</b> - Padrão de bandas de diferentes genótipos obtidos após digestão do fragmento de 467pb com enzima <i>MspI</i> . .....  | 38 |
| <b>Figura 8</b> - Padrão de bandas obtido pela digestão com <i>NarI</i> do fragmento de 467pb amplificado do exon 7. ....  | 39 |
| <b>Figura 9</b> - Padrão de bandas obtido pela reação de amplificação alelo específico (PCR-AE) para as mutações T59G, T1067A, T202C e C314T do gene <i>FUT3</i> . .....   | 45 |
| <b>Figura 10</b> - Padrão de bandas obtido pela PCR-AE para a mutação G428A do gene <i>FUT2</i> que amplifica um fragmento de 519/520pb. ....  | 49 |

## RESUMO

A expressão de antígenos ABH e Lewis tem sido associada com o desenvolvimento e prognóstico do câncer, diferenciação tumoral e metástase. Considerando que o carcinoma ductal invasivo (CADI) de mama apresenta múltiplas alterações, o objetivo deste estudo foi avaliar se o polimorfismo dos genes *ABO*, *Lewis* e *Secretor*, bem como a fenotipagem ABO podem estar associados ao câncer de mama e com parâmetros anatomoclinicos do tumor. Foram avaliadas 76 mulheres portadoras de CADI e 78 mulheres doadoras de sangue para a fenotipagem/genotipagem ABO e genotipagem Lewis e Secretor. Fenotipagem foi realizada por método de hemaglutinação, a genotipagem ABO por PCR seguida de restrição enzimática e a genotipagem dos grupos Lewis e Secretor por PCR alelo específico (PCR-AE). A genotipagem foi realizada considerando o polimorfismo dos genes em um único nucleotídeo, sendo que para o gene Lewis nas posições 59, 1067, 202 e 314, para o gene Secretor na posição 428 e para o gene ABO nas posições 261 (alelo O1), 526 (alelos O2 e B) e 703 (alelo B). Os genótipos Lewis foram classificados em Lewis positivo (tipo selvagem ou com duas/três mutações) e Lewis negativo (duas a quatro mutações). O genótipo secretor foi classificado em Secretor (selvagem ou com a mutação em heterozigose) e Não-secretor (homozigoto mutante). Nenhuma associação foi encontrada entre as pacientes com câncer de mama e o fenótipo ( $P=0,9323$ ) e genótipo ( $P=0,9356$ ) ABO. Mulheres com genótipo Lewis negativo foram associadas com CADI ( $P=0,0126$ ), mas não foram associadas com os parâmetros anatomoclinicos (tamanho tumor, estadiamento TNM e metástase em linfonodos axilares). Genótipo Não-secretor foi associado com metástase em linfonodos axilares ( $P=0,0149$ ). Em conclusão, os genótipos Lewis e Secretor podem ser úteis para predizer, respectivamente suscetibilidade e metástase em linfonodos axilares.

## ABSTRACT

ABH and Lewis antigens expression have been associated with cancer development, prognosis, tumor differentiation and metastasis. Considering that invasive ductal breast carcinoma (IDC) present multiple molecular alterations, the aim of the present study was evaluated if the polymorphism of ABO, Lewis and secretor genes, as well as ABO phenotyping could be associated to breast cancer and anatomoclinical parameters of the tumor. In 76 women with IDC and 78 health women blood donors, ABO phenotyping/genotyping, Lewis and Secretor genotyping were evaluated. Phenotyping was performed by hemmagglutination method and genotyping by Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers (PCR-SSP). ABO, Lewis and Secretor were classified by individual single nucleotide polymorphism (SNP) at sites 59, 1067, 202 and 314 of the *Lewis* gene, 428 of the *Secretor* gene and 261 (O1 allele), 526 (O2 and B allele) and 703 (B allele). Lewis genotype was classified in Lewis positive (wild-type or two/three SNPs) or Lewis negative (two to four different SNPs). The Secretor genotype was classified in Secretor (wild type or SNP in heterozygotes) and Non-secretor (SNP in homozygotes). No association was found between patients with breast cancer and ABO antigen expression ( $P=0.9323$ ) and genotypes ( $P=0.9356$ ). Lewis negative was associated with IDC ( $P=0.0126$ ), but were not associated with anatomoclinical parameters (tumor size, TNM staging and axillary lymph nodes metastasis). Non-secretor genotype was associated with axillary lymph nodes metastasis ( $P=0.0149$ ). In conclusion, the Lewis and Secretor genotyping could be useful to predict, respectively, of breast cancer susceptibility and axillary lymph nodes metastasis.

## *1. Introdução*

O sistema de grupo sanguíneo ABO foi descoberto por Karl Landsteiner no início do século XX. Os antígenos ABH foram inicialmente descobertos em eritrócitos, entretanto sua distribuição tecidual em humanos é muito grande, sendo encontrados em muitos tipos celulares, principalmente nas células epiteliais, mas não no músculo e tecido conjuntivo (RAVN & DABELSTEEN, 2000; LE PENDU et al., 2001). Esses antígenos são moléculas de carboidratos de glicoproteínas e glicolipídios presentes na superfície de eritrócitos, células epiteliais e endoteliais, que podem estar presentes também nos fluídos biológicos (YAMAMOTO et al., 1990a; YAMAMOTO & HAKOMORI, 1990). Inicialmente, três fenótipos, A, B e O, foram caracterizados e definidos por reações de aglutinação com eritrócitos e um quarto fenótipo AB foi descoberto por De Castello e Sturli em 1902. Em 1924, ao analisar dados familiares, Bernstein propôs um modelo de herança genética do sistema sanguíneo ABO contendo três alelos, *A*, *B* e *O*, os quais são formas alternativas do mesmo *locus* gênico, herdados de forma mendeliana. Através desse modelo permitiu-se a descrição de um polimorfismo genotípico, compreendendo inicialmente seis genótipos (*AA*, *AO*, *BB*, *BO*, *AB*, *OO*) (SALMON et al., 1984).

Os antígenos ABH são sintetizados em várias etapas, pela adição de monossacarídeos pela ação de glicosiltransferases, a partir de cinco tipos de precursores dissacarídeos: tipo 1, Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-R; tipo 2, Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R; tipo 3, Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-R; tipo 4, Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-R e tipo 5, Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-R. Os precursores tipo 1 e 2 podem fazer parte tanto de O ou N-glicoproteínas como de glicolipídeos. Tipo 3 é encontrado exclusivamente em O-glicanas, tipo 4 em glicolipídeos das séries globo e ganglio e tipo 5 corresponde ao glicolipídeo de lactoceramida ou ceramida (MARIONNEAU et al., 2001). A adição nos precursores de uma unidade de fucose em ligação  $\alpha$ 1,2 origina o antígeno H. Em humanos, o antígeno

H é determinado por dois tipos de  $\alpha$ 1,2-fucosiltransferases (enzimas H e Se) codificadas pelos genes *FUT1* (ou *H*) e *FUT2* (ou *Se*) respectivamente. A enzima H regula a expressão do antígeno H principalmente nas membranas de eritrócitos e em células do endotélio vascular, agindo no precursor tipo 2. Já a enzima Se regula a expressão do antígeno H principalmente em células do epitélio gastrointestinal e nos fluidos como saliva, agindo tanto no precursor tipo 1 como no tipo 2, entretanto com preferência pelo tipo 1 (LIU et al., 1998a ; LIU et al., 1999).

A perda funcional do alelo *FUT1* e *FUT2* leva ao fenótipo Bombay, caracterizado pela ausência de antígenos ABH nos eritrócitos, enquanto a perda funcional do alelo *FUT2* é responsável pelo fenótipo não secretor, caracterizado pela ausência dos antígenos ABH na saliva e em vários tipos de células epiteliais (WATKINS, 2001). Uma vez o antígeno H formado, a biossíntese pode continuar pela adição de uma N-acetilgalactosamina ou uma galactose, formando os antígenos A ou B respectivamente. Esta etapa é catalisada pelas glicosiltransferases A ou B que são codificadas por diferentes alelos no *locus ABO* do cromossomo 9. Uma série de alelos deste *locus* foram descritos, alguns codificando variantes das enzimas A e B, outros sendo inativados por várias mutações correspondendo ao alelo *O* (HAKOMORI, 1999). A estrutura dos antígenos ABH e sua relação com outros antígenos, como, por exemplo, antígenos Lewis presentes nos tecidos e adsorvidos aos eritrócitos, já é bem caracterizada (WATKINS, 1995). A síntese dos antígenos ABH e Lewis está demonstrada na figura 1.

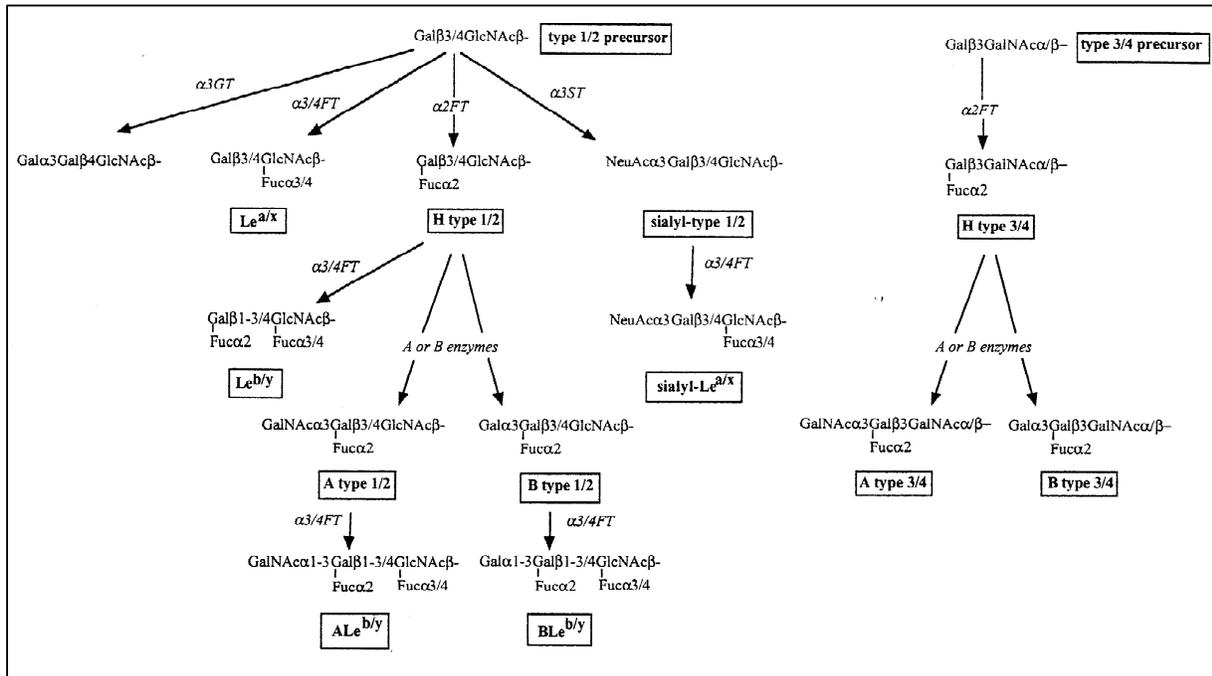


Figura 1 – Síntese dos antígenos ABH e Lewis.  $\alpha 3GT$  –  $\alpha 1,3$ galactosiltransferase;  $\alpha 3/4FT$  –  $\alpha 1,3$  ou  $\alpha 1,4$ fucosiltransferase;  $\alpha 2FT$  –  $\alpha 1,2$ fucosiltransferase;  $\alpha 3ST$  –  $\alpha 2,3$ sialiltransferase; enzimas A ou B são  $\alpha 1,3N$ -acetilgalactosaminil e  $\alpha 1,3$ galactosiltransferases respectivamente. Extraído de MARIONNEAU et al., 2001.

Os antígenos Lewis fazem parte do esqueleto de proteínas (glicoproteínas) ou lipídeos (glicolipídeos). As glicoproteínas Lewis podem ser encontradas nas secreções tais como, leite, saliva ou plasma. Glicolipídeos, ao contrário, são encontrados ou em complexos com lipoproteínas circulantes no plasma, ou inseridos em membranas celulares com a porção glicídica voltada para o ambiente extracelular. Os antígenos Lewis presentes nos eritrócitos, plaquetas e macrófagos são adquiridos secundariamente do plasma (HENRY, 1996). A expressão dos antígenos Lewis requer duas diferentes fucosiltransferases (enzimas Se e Lewis), produtos de dois diferentes genes (*FUT2* e *FUT3*). A enzima Lewis pode usar como substrato tanto o precursor tipo 1 como o precursor tipo 2. A enzima Lewis adiciona uma fucose, em ligação  $\alpha(1,4)$ , no precursor

tipo 1 produzindo o antígeno  $Le^a$  que não pode ser posteriormente glicosilado. O antígeno  $Le^b$  é sintetizado quando o antígeno H, gerado pela enzima Se a partir do precursor tipo 1, é usado como substrato pela enzima Lewis (SOEJIMA; KODA, 2005).

O termo ABH secretor, como é usado nos bancos de sangue, refere-se à secreção dos antígenos de indivíduos do sistema ABO em fluidos como, saliva, suor, lágrima, sêmem e soro, de acordo com o seu grupo sanguíneo. Por exemplo, um indivíduo do grupo O secreta, nesses fluídos, o antígeno H, enquanto os indivíduos do grupo A secretam antígenos A e H e assim sucessivamente (D'ADAMO; KELLY, 2001). Assim, indivíduos Lewis-positivo e ABH não-secretorees são fenotipados como  $Le(a+b-)$  e indivíduos Lewis-positivo e ABH secretorees como  $Le(a-b+)$ . O fenótipo  $Le(a+b+)$  pode ocorrer em indivíduos que expressam o antígeno H de maneira diminuída e indivíduos que perderam o alelo funcional *FUT3* são chamados Lewis negativo e são caracterizados por eritrócitos com fenótipo  $Le(a-b-)$  (LE PENDU et al., 2001; MARIONNEAU et al., 2001). Os antígenos sialil- $Le^a$  e sialil- $Le^x$  são obtidos pela adição de um ácido siálico seguido pela adição de uma fucose nos precursores tipo 1 e 2 respectivamente (MARIONNEAU et al., 2001).

O *locus ABO* estende-se por uma região de 18/20kb, no cromossomo 9, consistindo de 7 exons e 6 introns (YAMAMOTO et al., 1995; OLSSON; CHESTER, 2001). A análise da seqüência de nucleotídeos do cDNA da glicosiltransferase A1 revelou uma região codificadora de 1062pb, produzindo um polipeptídeo de 354 aminoácidos (YAMAMOTO et al., 1990b; OLSSON; CHESTER, 2001;). Esta enzima possui três domínios: região N-terminal curta, região transmembrana hidrofóbica e um longo domínio C-terminal responsável pela atividade catalítica. Como os exons 6 e 7 do gene *ABO* são responsáveis pela tradução do domínio C-terminal das glicosiltransferases, pesquisadores focaram nas diferenças destes exons para discriminar

os alelos *ABO* (LEE & REID, 2000) A seqüência do alelo  $A^1$  (A101) é tomada como base de comparação em relação a todos os outros alelos do gene *ABO* diferenciando-se do *B* em sete mutações: A297G, C526G, C657T, G703A, C796A, G803C e G930A, das quais apenas 4 são responsáveis pela substituição de aminoácidos (YAMAMOTO, et al., 1990a; LEE; REID, 2000). O alelo  $A^2$  (A201) é caracterizado pela mutação C467T (uma substituição que não altera a atividade da transferase) e uma deleção em um dos três resíduos consecutivos de citosina, no nucleotídeo 1059 – 1061, próximo à carboxila terminal. Em consequência disso, são adicionados à transferase A mais 21 aminoácidos, diminuindo entre 30 a 50 vezes a atividade da enzima e levando a um espectro limitado de substrato acceptor (LEE; REID, 2000; YIP, 2000). Outros alelos *A* foram descobertos, entre eles:  $A^{1v}$ ,  $A^3$ ,  $A^x$ ,  $A^{el}$ , variando na seqüência de nucleotídeos em diferentes posições (YAMAMOTO et al., 1993; HANSEN et al., 1998; BARJAS-CASTRO, et al., 2000; LEE; REID, 2000; OLSON; CHESTER, 2001;).

Foi nomeado como  $O^1$  (O01), o primeiro alelo *O* descrito, o qual difere do alelo  $A^1$  em apenas uma posição: deleção de uma guanina no nucleotídeo 261 do exon 6. Essa deleção é responsável pela criação de um códon de parada, ou seja, uma mutação sem sentido, ocasionando a parada prematura na leitura do RNAm e a produção de uma transferase de apenas 117 aminoácidos enzimaticamente inativa (YAMAMOTO, et al., 1990a; YIP, 2000). Uma variação do alelo de  $O^1$ , denominado  $O^{1v}$  (O02) foi descoberto posteriormente e, além de apresentar a deleção de uma única base no nucleotídeo 261, possui também outras nove substituições de nucleotídeos (G106T, G188A, C189T, C220T, A297G, T646A, G681A, C771T e G829A). Posteriormente foi determinado um alelo *O* mutante, no qual a deleção na posição 261 estava ausente. Este alelo foi denominado de  $O^2$  (O03) e se diferencia do alelo  $A^1$  em quatro substituições de nucleotídeos: A297G, C526G, G802A e G1096A. A mutação responsável pela perda da

atividade enzimática é a G802A, uma vez que a alteração do aminoácido glicina pela arginina, na posição 268, está localizada na região da glicosiltransferase envolvida com a atividade enzimática (YAMAMOTO, et al., 1990a; LEE; REID, 2000). Ainda, outros alelos *O* foram descobertos:  $O^3$ ,  $O^4$  e  $O^5$  (OLSSON; CHESTER, 1996; OLSSON; CHESTER, 2001).

O fragmento de DNA genômico que contém a região codificadora do gene *FUT2* (*Se*) responsável pela codificação da enzima secretora (*Se*) foi isolado em 1995 (KELLY et al., 1995; ROUQUIER et al., 1995). O DNA genômico completo e o cDNA foram identificados em 1997 demonstrando que o cDNA corresponde a um simples transcrito de 3,35kb e codifica uma proteína de 343 aminoácidos (KODA et al., 1997). O gene *FUT2* é formado por dois exons separados por um íntron (7kb). O primeiro exon é um exon não-codificante, enquanto que o segundo exon contém a região codificadora completa (KODA et al., 2000). A análise molecular deste gene demonstrou uma grande variedade de alelos que levam à incapacidade funcional da enzima responsável pela secreção dos antígenos ABH nas secreções (alelo *se*). A mutação sem sentido G428A causa um alelo não secretor em Caucásios sendo também freqüente em Africanos (KELLY et al., 1995), enquanto que a substituição A385T produz um alelo não funcional responsável pela produção de uma enzima deficiente na população oriental (YU et al., 1995; HENRY, et al., 1996; KODA et al., 1996). Outras três mutações sem sentido que tornam a enzima inativa (C571T, C628T e G849A) foram encontradas também na região asiática (YU et al., 1995; HENRY, et al., 1996; KODA et al., 1996). Muitas mutações inativadoras ou não tem sido descobertas, mas estudos em diferentes populações têm demonstrado que a variedade de alelos produzida por estas mutações está relacionada com a etnia (YU et al., 1995; HENRY, et al., 1996; KODA et al., 1996; LIU et al., 1998; PANG et al., 1998b; PENG et al., 1999; YU et al., 1999).

O gene *FUT3* (*Le*) está localizado no cromossomo 19 e o isolamento de seu cDNA demonstrou uma região codificadora de 1083pb que codifica uma proteína de 361 aminoácidos (KUKOWSKA-LATALLO et al., 1990). O alelo funcional *Le* codifica uma  $\alpha(1,3/1,4)$ fucosiltransferase funcional e o alelo *le* codifica uma enzima não-funcional. Indivíduos homocigotos para *le* não expressam tanto o antígeno  $Le^a$  quanto o  $Le^b$ , expressando o fenótipo  $Le(a-b-)$  nos eritrócitos (KODA, et al., 2001). Várias mutações têm sido encontradas em indivíduos  $Le(a-b-)$ : T59G, G508A, T1067A, T202C, C314T, C445T, G484A, G667A, G808A, G760A, G16A, G1022T e G47C (ELMGREN et al., 1993; KODA et al., 1993; LIU, et al., 1996; ELMGREN et al., 1997; PANG, et al., 1998a; PANG, et al., 1998b; LIU et al., 1999; COOLING et al., 2003; SOEJIMA et al., 2004). O tipo e a frequência dos diferentes alelos do gene *FUT3* mostram diferenças em diferentes populações e grupos étnicos e, a correspondência genótipo/fenótipo nem sempre é obtida (ELMGREEN et al., 1996; PANG et al., 1998b; SALOMAA et al., 2000). Em estudos de populações com caucasianos, foi verificado que 90 a 95% dos indivíduos Lewis negativo podem ser identificados pelo polimorfismo em T59G, T1067A, T202C e C314T, e essas quatro mutações parecem ser comuns na população em geral (SALOMAA et al., 2000). Estudos *in vitro* indicam que as mutações T202C, G508A, C445T, G484A, G667A, G808A e T1067A são mutações responsáveis pelo fenótipo Lewis negativo, enquanto que a mutação T59G, a qual reside no domínio transmembrana, deve impedir a localização correta da enzima alterando a especificidade do substrato (NISHIHARA et al., 1999; SOEJIMA; KODA, 2005).

A existência de associação entre os antígenos dos grupos sanguíneos e doenças tem sido muito pesquisada e, significantes associações foram reportadas como infecções

microbianas, doenças cardiovasculares, doenças psiquiátricas e câncer (MARIONNEAU et al., 2001).

Durante a transformação neoplásica, a expressão de antígenos dos grupos sanguíneos se alteram profundamente, sendo que a expressão alterada de antígenos ABH e Lewis tem sido encontrada em muitos tipos de carcinomas e está frequentemente associada com o prognóstico (HAKAMORI, 1985; MARTENSSON et al., 1995; HAKOMORI, 1996; SKOVLUND, 1997; NAKAGOE et al., 1998; XIE et al., 1999; MARIANO et al., 2000; MOLDVAY et al., 2000). A presença de sialil-Le<sup>a</sup> e sialil-Le<sup>x</sup> está associada com mau prognóstico em vários tipos de tumores, além disso, foi demonstrado que esses antígenos permitem adesão de células cancerosas ao endotélio vascular via reconhecimento por seletinas, podendo favorecer o processo metastático (MARIONNEAU et al., 2001).

Estudos relatam que indivíduos dos grupos A e B podem ter probabilidade um pouco maior de desenvolver um câncer do sistema digestivo que indivíduos do grupo O (MOURANT et al., 1978). Isto pode ser explicado pelo aumento da resistência a apoptose de células epiteliais que apresentam os antígenos A e B (LE PENDU et al., 2001). Em contraste, indivíduos com grupo sanguíneo O que desenvolveram carcinoma pulmonar possuem menor probabilidade de sobrevivência quando comparado aos do grupo sanguíneo A e B (MOLDVAY et al., 2000). Este fato pode ser explicado considerando que as células cancerosas de pacientes do grupo sanguíneo O, desprovidas dos antígenos A e B, teriam uma maior motilidade, sendo mais facilmente propensas à invasão aos vasos sanguíneos e linfáticos. Ainda, uma maior resistência basal a morte celular aumenta a probabilidade de sobrevivência de células que acumularam alterações genéticas e que deveriam ser eliminadas. Entretanto, num estágio mais avançado, quando o fenótipo de "resistência a apoptose", torna-se estabelecido pela aquisição de

mecanismos mais potentes (mutações de p53, alterações da expressão de membros da família Bcl-2 ou de proteínas de stress como hsp70), a perda da expressão dos antígenos A, B e possivelmente H, facilitariam o processo metastático pelo aumento da motilidade celular. Passado este estágio, as células que expressam antígenos sialil-Le<sup>a</sup> ou sialil-Le<sup>x</sup> podem ser selecionadas, uma vez que possuem uma capacidade aumentada de se manter em microvasos. Assim, a importância dos vários antígenos ABH e Lewis depende do estágio de progressão do tumor (LE PENDU et al., 2001).

O câncer de mama é uma neoplasia extremamente incidente e associada a morbidade e mortalidade entre as mulheres (KOIFMAN et al., 1998; BERSTEIN et al., 1999; FERRINI et al., 2001; SILVA et al., 2002). Este tipo de doença aparece com maior frequência em certos países Europeus, na América do Norte e alguns países Sul Americanos (SILVA et al., 2002). Os estados mais desenvolvidos e mais industrializados como São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, apresentam maior incidência desta doença (PAIVA et al., 2002; SILVA et al., 2002). De acordo com o Instituto Nacional do câncer (INCA), a estimativa de incidência para 2006 será de 48.930 novos casos (BRASIL, 2007). A alta incidência está relacionada a diferentes fatores como, por exemplo, o diagnóstico tardio entre as mulheres pertencentes às classes de menor poder aquisitivo (ABREU e KOIFMAN, 2002).

Vários são os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama e embora heterogeneidade da história natural do câncer de mama seja razoavelmente conhecida, seus determinantes ainda permanecem desconhecidos (BERSTEIN et al., 1999; ABREU; KOIFMAN, 2002). A etiologia envolve a interação de diversos fatores de risco, e, além dos fatores endógenos (idade, história familiar, fatores reprodutivos, obesidade, doença benigna da mama, lactação, abortos, paridade), os fatores exógenos (dieta, fumo, exposição à radiação ionizantes, inseticidas organoclorados e atividade

física) também têm sido associados ao câncer de mama (KOIFMAN et al., 1998; BERSTEIN et al. 1999).

Dentre os fatores endógenos, a história familiar está relacionada, em aproximadamente 5 a 10% das pacientes com câncer de mama. Parece ser consenso que o desenvolvimento do câncer de mama é mais comum nos países desenvolvidos, em pacientes brancas e de classe social mais elevada. Entretanto, essa relação não constitui, uma regra, podendo não se observar, algumas vezes, essas associações na dependência da população amostrada (PAIVA et al., 2002).

A condição sócio-econômica pode refletir o prognóstico do câncer de mama como consequência das dificuldades de acesso aos programas de prevenção e aos cuidados médicos que as classes menos favorecidas encontram mesmo nos países desenvolvidos, sendo o diagnóstico estabelecido numa fase já avançada da doença (ABREU; KOIFFMAN, 2002).

Outro fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama bastante controverso na literatura é o uso de contraceptivo oral ou reposição hormonal. Resultados de estudos epidemiológicos têm demonstrado que o uso de contraceptivos orais ou a terapia de reposição hormonal tem sido relacionado com o aumento do risco de câncer de mama, inclusive nas pacientes que fazem uso do contraceptivo entre 5 a 10 anos (HANKINSON; STAMPER, 1997; TESSARO et al, 2001; LUKKAINEN, 2003). Desta forma, a exposição de estrógeno pode promover um ambiente seletivo para o crescimento clonal de células que já contenham mutações somáticas. Ainda, um longo período de vida reprodutiva, bem como, fatores endógenos como a menarca precoce, menopausa tardia e idade avançada para o primeiro filho, podem contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias na mama (KOIFMAN et al., 1998; BERNSTEIN et al., 1999). A intensa atividade proliferativa ocasionada pela ação do

estrógeno pode resultar na replicação de células que contenham danos de DNA e cujos supressores de tumor não consigam realizar reparo ou a indução de apoptose. Embora o estrógeno possua ação de agente carcinogênico fraco, segundo *The International Agency for Research on Cancer* (IARC), a terapia estrogênica pode ocasionar danos de DNA por formação de radicais livres nas células epiteliais mamárias (KENEMANS e BOSMAN, 2003).

Com relação à idade, o câncer de mama parece estar relacionado à faixa etária entre 45 a 50 anos, com dois picos incidência: aos 50 e aos 70 anos (TESSARO et al., 2001). Assim, o risco do desenvolvimento da doença aumenta gradualmente com a idade, tendo um rápido aumento nos anos que proximamente antecedem a menopausa, seguido de lenta elevação na menopausa, possivelmente em função do declínio na liberação estrógeno do ovariano. Embora o desenvolvimento de câncer de mama em pacientes com idade inferior a 35 anos seja considerado incomum, em média, 5% das pacientes portadoras de câncer de mama apresentam idade inferior a 30 anos (MAGGARD et al, 2003), estudos epidemiológicos têm documentado uma pior evolução e um prognóstico desfavorável para essas pacientes (MAGGARD et al., 2003; SIDONI et al., 2003). A influência da idade no momento do diagnóstico e para o prognóstico de sobrevida do câncer de mama permanece ainda controversa. Estes conflitos são resultantes da diversidade observada entre os diferentes estudos: pequeno número de pacientes, diferença na estratificação das idades e da correção dos óbitos ocorridos por outras causas (ABREU; KOIFMAN, 2002). Apesar das discordâncias apresentadas, vários estudos destacam que pacientes com câncer de mama a partir quinta década de vida, apresentam melhor prognóstico (JARVIS et al., 1998; SIDONI et al., 2003).

Dentre as neoplasias malignas de mama, o carcinoma ductal invasivo (CADI) é o mais comumente observado na rotina histopatológica, não pertencente a nenhuma das outras categorias ou subtipos especiais de carcinoma invasivo. Sua prevalência varia de 45-75% de todos os carcinomas invasivos da mama e a classificação morfológica baseia-se na histogênese e aspectos histopatológico (HANBY, 2005). O carcinoma ductal invasivo é designado como um tumor infiltrativo, que mostra formação de um ou mais túbulos ou lumens, compostos por células atípicas, organizados em agrupamentos celulares sólidos pequenos ou grandes, geralmente pouco coesos, de forma irregular ou angulada (BRASIL, 2002). No entanto, podem apresentar vários padrões morfológicos diferentes e combinações de mais de um subtipo histológico pode estar presente em um mesmo tumor. A adequada classificação ou tipagem histológica tumoral tem implicações clínicas, pois um prognóstico especial é conferido apenas as formas puras dos tipos especiais e os tumores mistos tendem a se comportar de forma intermediária entre o carcinoma ductal que têm pior prognóstico e os tipos especiais de excelente prognóstico (BRASIL, 2002; HANBY, 2005). O CADI é mais freqüente em mulheres de meia idade ou depois dos 50 anos. O tumor apresenta-se, como uma massa detectada na palpação ou mamografia, geralmente de 2-3 cm ou ocupando uma porção significativa da mama. A pele pode estar comprometida com edema, “peau d’orange” (como casca de laranja), retração do mamilo e/ou descarga mamilar, doença de Paget e ulceração, significando doença avançada (TAVASOLI, 1992; HANBY, 2005).

Um modelo de carcinogênese de mama sugere que o carcinoma invasivo origina de uma série de lesões hiperplásicas intermediárias através de vários graus de atipia que evoluem ao carcinoma ductal *in situ* (CADIS) e deste até o carcinoma ductal invasivo (KURBEL, 2005; PLATET et al., 2004). Um modelo genético faz algumas proposições para o desenvolvimento do câncer de mama: 1) o carcinoma lobular (CAL) desenvolve-

se por um caminho genético que envolve inativação de caderina E; 2) mutações nos genes *p53* e *HER2* estão associadas com câncer pobremente diferenciado; 3) mutações nos genes *BRCA1/2* em células germinativas levam ao desenvolvimento do carcinoma ductal invasivo (VAN DE VIJVER, 2000).

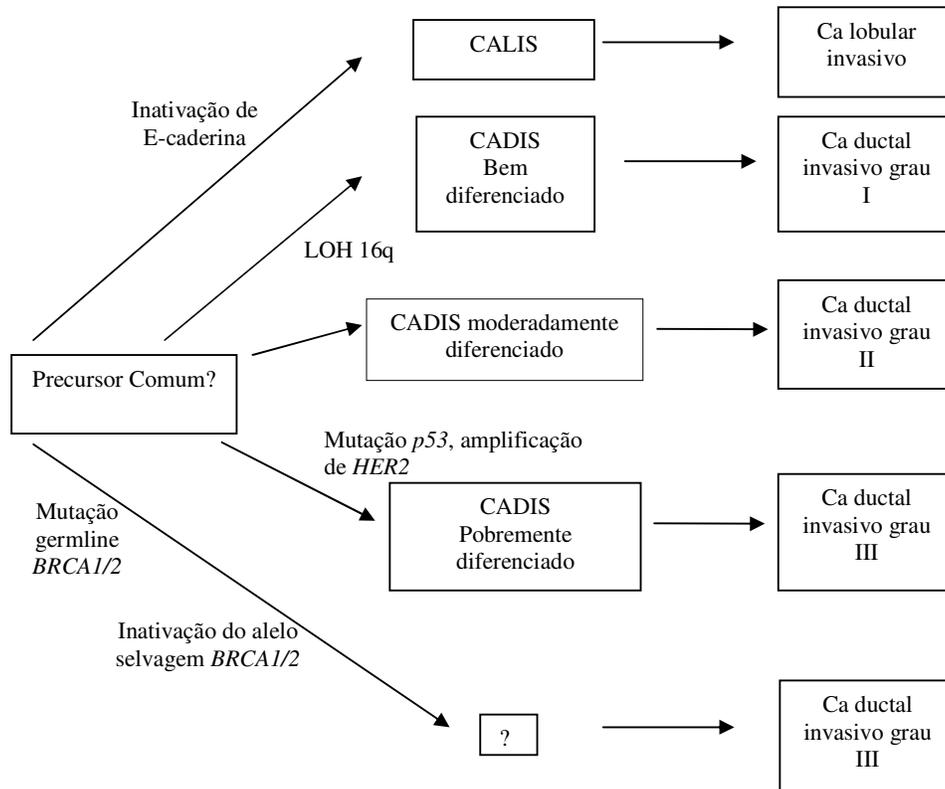


Figura 2 – Modelo Genético para o desenvolvimento do câncer de mama.

Extraído de VAN DE VIJVER. *Cur.Diagn.Pathol.* v.6: p.271-281, 2000.

Recentes estudos têm procurado elucidar quais os mecanismos de carcinogênese do tecido mamário, buscando marcadores de susceptibilidade ao câncer, permitindo o diagnóstico precoce e o estabelecimento de conduta terapêutica apropriada. Diversos estudos têm demonstrado associação entre polimorfismos de diversos genes com risco

de suscetibilidade ao câncer de mama. Um estudo realizado em Nova Iorque demonstrou que indivíduos expostos a hidrocarbonetos aromáticos e indivíduos fumantes podem ter um risco maior ao desenvolvimento do câncer de mama se apresentar um alelo variante do gene *XPD*, um gene envolvido no reparo do DNA por excisão de nucleotídeos (TERRY et al., 2004). Também houve maior risco de desenvolvimento de câncer de mama em indivíduos que apresentam um alelo variante do gene *COMT*, responsável pelo metabolismo do metabólito do estrógeno, o estrógeno catecol (CHENG et al., 2005).

Polimorfismos de outros genes também foram associados ao risco de câncer de mama, tais como: 1) *GSTP-I*, que codifica a enzima glutationa S-transferase P1 que possui importante função na detoxificação de carcinógenos (EGAN et al., 2004); 2) o gene *Aurora A* que atua na regulação da duplicação do centróssomo (LO et al., 2005); 3) *MTHFR* responsável pela codificação da enzima metilenotetrahidrofolato redutase envolvida no metabolismo do ácido fólico (CAMPBELL et al., 2002; CHOU et al., 2006); 4) *CCND1* que codifica a proteína ciclina D1, importante na regulação do ciclo celular (CESCHI et al., 2005, SHU et al., 2005); 5) *p53*, que codifica a proteína p53, uma proteína supressora de tumor envolvida no controle do ciclo celular e apoptose (FRANEKOVA et al., 2007); 6) o gene *CYP17* que codifica uma enzima envolvida na biosíntese do estrógeno (MITRUNEN ; HIRVONEN, 2003).

Recentes avanços nos métodos em biologia molecular identificaram vários fatores prognósticos que revelam mudanças inesperadas na progressão do câncer de mama (SILVA et al., 2002, TAKASHIMA et al., 2002). Alguns biomarcadores são reconhecidos como fatores prognósticos característicos como avaliação da expressão de produtos protéicos de alguns genes supressores de tumor, oncogenes, marcadores de

proliferação celular e antígenos dos grupos sanguíneos (VAN DE VIJVER, 2000; MOURÃO-NETO et al., 2001; NAKAGOE et al., 2002).

Trabalhos sobre a associação dos antígenos ABH e Lewis com o câncer de mama são escassos na literatura, entretanto, há estudos que observaram a perda da expressão dos antígenos A e B (VOWDEN et al., 1986; NAKAGOE et al., 1991; INAI et al., 1992; URA et al., 1992) diminuição da expressão dos antígenos Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup> (INAI et al., 1992; URA et al., 1992), expressão de H e Le<sup>y</sup> (VOWDEN et al., 1986) e aumento dos antígenos sialil-Le<sup>x</sup> e sialil-Le<sup>a</sup> nesses tumores (JESCHKE et al., 2005). Além disso, foi observado que a perda da expressão dos antígenos A e B, correlaciona-se com o aumento na expressão do antígeno H (VOWDEN et al., 1986). Ainda, o comportamento metastático do tumor possivelmente se relaciona com a expressão de antígenos do grupo sanguíneo (NAKAGOE et al., 1998), a expressão do antígeno sialil-Le<sup>x</sup> em células tumorais está associada com mau prognóstico (NAKAGOE et al., 2002) e a alta expressão de Ley/b relaciona-se com diminuição de sobrevida de pacientes com nódulos linfáticos negativos (MADJD et al., 2005).

Os métodos sorológicos, amplamente empregados na investigação das especificidades ABO e Lewis, permitem apenas a identificação dos fenótipos eritrocitário, secretor e não secretor. A definição dos respectivos genótipos necessita de estudos familiares, que muitas vezes são de difícil realização, bem como podem ser inconclusivos em função da recente descrição dos diversos alelos silenciosos (JOHNSON & HOPKINSON, 1992; GRUNETT et al., 1994; YU et al., 1997). O uso da técnica de PCR seguido pela verificação da existência ou não de sítios de restrição e a PCR alelo específico tem mostrado ser de grande utilidade na definição dos genótipos dos Sistemas ABO, Lewis e Secretor, principalmente aqueles que não podem ser detectados pelos métodos sorológicos (CHANG et al., 1992; LEE; CHANG, 1992;

GRUNNET et al., 1994;). Portanto, estas metodologias podem ser amplamente empregadas quando se pretende realizar estudos moleculares em sistemas polimórficos associados a doenças, à medicina forense, ao monitoramento da evolução dos transplantes de medula, à investigação dos subgrupos sanguíneos (YAMAMOTO et al., 1993; CHANG et al., 1995; CROUSE & VINCEK, 1995; LIECHTI-GALLATI; NEESER, 1996).

## *2. Justificativa*

O câncer de mama é o tumor de maior incidência e mortalidade no mundo, apresentando alta frequência nos países europeus, América do Norte e alguns países Sul Americanos. Recentes estudos têm procurado elucidar quais os mecanismos de carcinogênese do tecido mamário, buscando marcadores de susceptibilidade ao câncer que permitiriam o diagnóstico precoce e o estabelecimento de conduta terapêutica apropriada, minimizando a morbi-mortalidade por esta neoplasia. Trabalhos sobre a associação dos antígenos ABH e Lewis com o câncer de mama são escassos na literatura, entretanto, alguns estudos observaram a perda da expressão dos antígenos A e B, diminuição da expressão dos antígenos Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup> e aumento dos antígenos Le<sup>x</sup>, sialil-Le<sup>x</sup> e sialil-Le<sup>a</sup> nesses tumores. O comportamento metastático do tumor possivelmente relaciona-se com a expressão de antígenos do grupo sanguíneo, e, em especial, a expressão do antígeno sialil-Le<sup>x</sup> está relacionado a lesões mamárias de pior prognóstico. Até o momento, segundo nosso conhecimento, não existem estudos de genotipagem de grupos sanguíneos (ABO, Lewis e secretor) e sua possível associação com câncer de mama e suas características clinicopatológicas, tais como tamanho tumoral, metástase em linfonodo. Com o presente estudo espera-se encontrar associação positiva entre essa neoplasia e grupo (s) sanguíneo(s) específico(s) e seu potencial como marcador da carcinogênese em mama.

### ***3. Objetivos***

## **OBJETIVO GERAL**

Verificar associação entre o carcinoma ductal invasivo de mama e os sistemas ABO, Lewis e secretor e ainda, associação destes grupos sanguíneos com características clinicopatológicas dos tumores

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Caracterizar o fenótipo do sistema ABO, bem como os polimorfismos dos genes *ABO*, *Lewis* e *Secretor* em sangue periférico de pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo e de mulheres doadoras de sangue, consideradas controle.
- 2) Verificar as correlações existentes dos resultados observados no grupo em estudo frente ao grupo controle.
- 3) Verificar associação entre os polimorfismos dos genes *ABO*, *Lewis* e *Secretor* e características clinicopatológicas dos tumores.

## *4. Materiais e Métodos*

## 4.1. CASUÍSTICA

### 4.1.1. Grupo de Estudo

Após consentimento informado e de conformidade com o Comitê de Ética em Pesquisa, foram avaliadas 76 pacientes, do sexo feminino, portadoras de carcinoma ductal invasivo de mama (Grupo de Estudo). Destas, 49 pacientes foram recrutadas pelo Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Escola de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e 27 pacientes pelo Dr. Leonardo Cunha no Centro de Oncologia da Cidade de Araraquara (CORA). A idade média destas pacientes foi 54,1 anos (mínimo de 30 e máximo de 84 anos) e quando a cor ou raça, 81,6% foram da cor branca, 11,8% preta, 6,6% parda e 0% amarela.

Ainda, para avaliação de associação entre os polimorfismos dos grupos ABO, Lewis e Secretor e as características clinicopatológicas dos tumores, algumas mulheres foram excluídas da avaliação, pois não apresentavam todos os dados necessários. Assim, para este parâmetro, a casuística do grupo em estudo variou entre 71 e 75 pacientes.

A classificação dos tumores foi realizada de acordo com a classificação TNM (Greene et al., 2002), sendo que T representa a extensão do tumor primário, N representa a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais e M a ausência ou presença de metástase à distância. Assim seguindo esta classificação, as seguintes definições são utilizadas: para T: TX quando o tumor primário não pode ser avaliado; T0 quando não há evidência de tumor primário; Tis Carcinoma *in situ* e T1, T2, T3, T4 refere-se ao tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário. Com relação ao N, NX quando os linfonodos regionais não podem ser avaliados; N0 na ausência de metástase em linfonodos regionais e N1, N2, N3 quando há

comprometimento crescente dos linfonodos regionais. Além disso, a extensão direta do tumor primário para o linfonodo é classificada como metástase linfonodal. Metástase em qualquer linfonodo que não seja regional é classificada como metástase à distância. Para M, MX representa que a presença de metástase à distância não pode ser avaliada. M0 indica ausência de metástase à distância e M1 metástase à distância.

Na avaliação dos dados clinicopatológicos utilizando a classificação TNM, foi utilizado como parâmetros de comparação a dimensão do tumor primário (T), comprometimento em linfonodos regionais (N), sendo considerado como negativo quando N0 e positivo os classificados como N1 e N2. O parâmetro de metástase à distância não foi avaliado, uma vez que o número de tumores com essa característica foi muito pequeno (n=4). Outro parâmetro utilizado foi classificação por estadios, sendo: estadio I: T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>; estadio IIA: T<sub>1</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> ou T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>; estadio IIB: T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> ou T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>; estadio IIIA: T<sub>1</sub>N<sub>2</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>2</sub>N<sub>2</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> ou T<sub>3</sub>N<sub>2</sub>M<sub>0</sub>; estadio IIIB: T<sub>4</sub> com qualquer NM<sub>0</sub> ou qualquer T N<sub>3</sub>M<sub>0</sub>; estadio IV qualquer TNM<sub>1</sub>.

#### **4.1.2. Grupo Controle**

O grupo controle foi composto por 78 mulheres, doadoras de sangue, sem história prévia de câncer de mama na família, recrutadas no Hemonúcleo da Regional de Araraquara Profa. Dra Clara Pechmann Mendonça, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). A média de idade foi 35,8 (mínimo de 18 e máximo de 65 anos) e quanto a raça ou cor, 80,8% branca, 3,8% preta, 9,0% parda e 6,4% amarela.

## **4.2. METODOLOGIA**

### **4.2.1. Coleta dos materiais**

De ambos os grupos foram coletados por punção venosa 5 ml de sangue total incluídos em anticoagulante EDTA, para as fenotipagens dos sistemas ABO e Lewis.

### **4.2.2. Fenotipagem sorológica dos sistemas ABO e Lewis**

Os grupos sanguíneos ABO foram definidos por métodos de hemaglutinação direta e reversa em tubos e os fenótipos Lewis determinados em gel (Diamed), utilizando-se para estas metodologias os eritrócitos do sangue periférico.

### **4.2.3. Extração e quantificação do DNA**

O DNA genômico, das pacientes do Grupo de Estudo (n=76) e do Grupo Controle (n=78), foi extraído a partir do sangue total colhido com EDTA segundo a metodologia proposta por ABDEL-RAHMAN, 1994 com algumas modificações. Os eritrócitos foram submetidos à lise com solução saturada de glicose, seguida de centrifugação a 13 000 rpm, 1 minuto e lavagem do sedimento com água Milli-Q e nova centrifugação (13 000 rpm, 1 minuto). O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi submetido à digestão com proteinase K e SDS 20%, à 37° C, *overnight*. Após a digestão, as proteínas foram precipitadas com solução de NaCl 6M, submetidas à centrifugação (13 000 rpm, 6min), o sobrenadante foi recolhido em outro tubo e o sedimento, contendo as proteínas precipitadas, foi descartado. Na seqüência, o sobrenadante foi submetido à precipitação com etanol absoluto gelado, seguido de centrifugação a 13 000 rpm, por 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento, contendo o DNA precipitado, foi lavado com etanol 70% gelado e ressuspendido em tampão TE.

O material genético foi diluído na proporção 1:100 em TE e em seguida, foi determinada a densidade ótica em 260 e em 280 nm, usando TE para zerar o espectrofotômetro.

#### 4.2.4. Amplificação gênica para verificação dos alelos do *locus* ABO

No DNA obtido do grupo controle e do grupo em estudo foi realizado a amplificação gênica por reação da polimerase em cadeia (PCR) com o objetivo de estabelecer os genótipos do *locus* ABO. A estratégia para essa genotipagem foi baseada em 2 reações, sendo que para diferenciar o alelo  $O^I$  utilizamos os *primers* Fy-46 e Fy-57 (PCR 1), os quais amplificam o exon 6 do gene *ABO*. Os demais alelos foram diferenciados na PCR 2 (figura 3 e tabela 1), utilizando os *primers* Fy-43 e Fy-31 que delimitam uma região do exon 7. Assim, foram utilizados 2 pares de *primers* de acordo com o proposto por YAMAMOTO et al (1990a) e OLSSON e CHESTER (1995).

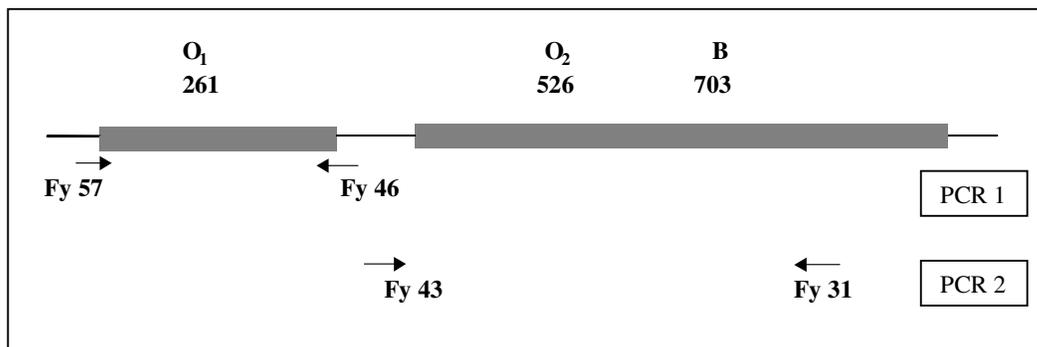


Figura 3 - Representação dos exons 6 e 7 do gene *ABO* e as mutações selecionadas para diferenciar os alelos A, B, e O.

Tabela 1- *Primers* utilizados para caracterização dos genótipos do grupo sanguíneo ABO.

| Primers | Seqüência de nucleotídeos          |
|---------|------------------------------------|
| Fy-46   | 5'-GAATTCACCTCGCCACTGCCTGGGTCTC-3' |
| Fy-57   | 5'-GAATTCATGTGGGTGGCACCCCTGCCA-3'  |
| Fy-43   | 5'-CCAGGGGTGCACGGCCGGCGGC-3'       |
| Fy-31   | 5'-GAAATCGCCCTCGTCCTT-3'           |

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl, e as condições de reação foram estabelecidas segundo OLSSON e CHESTER (1995) com algumas modificações (Tabela 2).

Tabela 2- Condições de reação utilizadas na amplificação dos fragmentos por PCR

| Componentes  | Volume  | Concentração final            |
|--|---------|-------------------------------|
| Água Milli-Q   | 16,25uL |                               |
| 5X Green GoTaq <sup>TM</sup> reaction buffer (Promega) | 5uL     | 1X (1,5mM MgCl <sub>2</sub> ) |
| Dntp   | 0,5uL   | 0,2mM                         |
| <i>Primer sense</i>                                    | 0,5uL   | 0,5uM                         |
| <i>Primer antisense</i>                                | 0,5uL   | 0,5uM                         |
| GoTaq <sup>TM</sup> DNA polymerase (Promega)           | 0,25uL  | 1,25U                         |
| DNA  | 2uL     | 200 - 400ng                   |

A amplificação do exon 6 produz um fragmento de 248/249pb (*primers* Fy46 e Fy57), utilizando-se 35 ciclos com desnaturação a 94<sup>0</sup> C por dois minutos, hibridização a 57<sup>0</sup>C por um minuto e extensão a 72<sup>0</sup> C por um minuto. Para a PCR2 as condições de amplificação foram: 35 ciclos com desnaturação a 94<sup>0</sup>C por um minuto, hibridização a 53<sup>0</sup> C por um minuto e extensão a 72<sup>0</sup>C por um minuto, amplificando um fragmento do exon 7 de 467pb (*primers* Fy43 e Fy31). Os produtos de amplificação foram separados por corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e observado em transiluminador .

#### **4.2.5. Identificação dos alelos do *locus* ABO por restrição enzimática**

Os produtos de amplificação foram submetidos à digestão com as seguintes enzimas: PCR 1 com *Kpn* I (Promega), PCR 2 com *Msp* I (Promega) e *Nar* I (Promega) e analisados em gel de agarose a 2%. As mutações características de cada alelo, os pares de *primers* para cada reação, as enzimas de restrição utilizadas, os locais de reconhecimento enzimático, os alelos identificados e os correspondentes fragmentos resultantes da digestão estão demonstrados na figura 4. A PCR1 produz um fragmento de 248pb para o alelo *O*<sup>1</sup> e 249pb para os demais alelos, enquanto que a PCR2 produz um fragmento de 467pb. O padrão de bandas obtido após a digestão enzimática por restrição do fragmento de 467pb, utilizando a enzima *Msp* I gerou múltiplos fragmentos, de acordo com o alelo presente: a banda de 129pb dos alelos *A*<sup>1</sup>, *O* e *B*, a de 209pb dos alelos *A* e *O*, enquanto que a de 223pb é comum do alelo *B*. A banda de 160pb é produzida em função da presença da mutação C467T, comum ao alelo *A*<sup>2</sup>, embora não seja específica deste alelo e por isso não a utilizamos para classificar este alelo. (figuras 4 e 5).

| PCR   | Exon | Mutação        | Primers | Enzimas<br>[Sítio Reconhecido] | Alelos      | Fragmentos da<br>digestão |
|-------|------|----------------|---------|--------------------------------|-------------|---------------------------|
| Kpn I |      |                |         |                                |             |                           |
| 1     | VI   | G261-          | Fy-57   | GGTAC / C                      | $O^I$       | <u>84</u> + <u>164</u>    |
|       |      |                | Fy-46   | GGTGACC                        | $O^2, A, B$ | 249                       |
| Msp I |      |                |         |                                |             |                           |
| 2     | VII  | C467T<br>G703A | Fy-43   | CTGG                           | $A^{2*}$    | <u>160</u> + 204          |
|       |      |                | Fy-31   | CCAG                           | $B$         | 129 + 31 + <u>223</u>     |
|       |      |                |         | C / CGG                        | $A, O$      | 129 + 204                 |
| Nar I |      |                |         |                                |             |                           |
| 2     | VII  | C526G          | Fy-43   | GG / CGCC                      | $O^2, B$    | 205 + 262                 |
|       |      |                | Fy-31   | CGCGCC                         | $O^I, A$    | 467                       |

Figura 4- Estratégia de análise e interpretação para caracterização dos alelos do locus *ABO*. \* Não é exclusiva deste alelo

Para diferenciar o alelo  $O^I$ , o fragmento de 248/249pb, produzido pela PCR1 e correspondente ao exon 6, foi digerido com a enzima de restrição *KpnI*. A presença da deleção no nucleotídeo 261 do exon 6 pode ser demonstrada pelo corte enzimático do fragmento de 248pb produzindo duas bandas, 164 e 84 pb, indicando o alelo  $O^I$  (Figuras 3 e 4).

| Fenótipos | A                     |                       | B                     |                       | O                                 |                                   |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|           |                       |                       |                       |                       |                                   |                                   |
| 249       | -----                 |                       | -----                 |                       | -----                             |                                   |
| 164       | -----                 |                       | -----                 | -----                 | -----                             |                                   |
| 84        | -----                 |                       | -----                 | -----                 | -----                             |                                   |
| Genótipos | <i>AA</i>             | <i>AO<sup>1</sup></i> | <i>BB</i>             | <i>BO<sup>1</sup></i> | <i>O<sup>1</sup>O<sup>1</sup></i> | <i>O<sup>1</sup>O<sup>2</sup></i> |
|           | <i>AO<sup>2</sup></i> |                       | <i>BO<sup>2</sup></i> |                       |                                   | <i>O<sup>2</sup>O<sup>2</sup></i> |

Figura 5 – Padrão de bandas obtido com a digestão do fragmento de 249pb com a enzima *KpnI*. Genótipos do grupo A (*AA*, *AO<sup>1</sup>*, *AO<sub>2</sub>*), genótipos do grupo B (*BO<sup>1</sup>*, *BO<sup>2</sup>*, *BB*) e genótipos do grupo O (*O<sup>1</sup>O<sup>1</sup>*, *O<sup>1</sup>O<sup>2</sup>* e *O<sup>2</sup>O<sup>2</sup>*)

Todas as amostras foram testadas para a mutação G261del, a fim de avaliar a presença do alelo *O<sup>1</sup>* e todas as amostras, com exceção das caracterizadas como *O<sup>1</sup>O<sup>1</sup>* foram submetidas à amplificação pela PCR2 e corte enzimático com *MspI* para verificação das mutações C467T e G703A (alelo *B*). Para demonstração do alelo *O<sup>2</sup>*, o fragmento de 467pb do exon 7, amplificado pela PCR2 foi submetido à restrição enzimática com *Nar I*. A presença dos fragmentos de 262 e 205pb demonstra a mutação C526G, característica dos alelos *O<sup>2</sup>* e *B*.

#### 4.2.6. Amplificação gênica alelo específica para verificação de alelos do gene *FUT3*

A genotipagem foi baseada na amplificação alelo específico (PCR-AE) para a determinação de quatro mutações: T59G, T1067A, T202C e C314T e um fragmento do gene do hormônio de crescimento foi usado como controle interno em cada amplificação produzindo um fragmento de 428pb (GRAHN, et al., 2001). Para cada mutação foram realizadas duas reações de amplificação sendo que no primeiro tubo coloca-se o *primer sense* (Tabela 3), para o alelo selvagem, no segundo tubo o *primer sense* para o alelo mutante e em ambos os tubos o *primer anti-sense* e o par de *primers* do controle interno (hGH-1 e hGH-2).

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 12,5 µl nas seguintes condições: 10 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 50 mM de KCl; 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 25 pmol/µL de cada *primer*; 0,25 U de Taq polimerase e 100 - 200ng do DNA genômico. Os ciclos utilizados foram: para as mutações T59G, T202C e C314T – 5 ciclos a 96° C 20s, 70° C 45s, 72° C 25s; 21 ciclos a 96° C 25s, 65° C 50s, 72° C 30s; 4 ciclos a 96° C 30s, 55° C 60s, 72° C 90s – para a mutação T1067A - 35 ciclos a 94° C, 60° C e 72° C, todos por 1 minuto. Os produtos das amplificações (Tabela 4) foram analisados em gel de agarose a 1%.

Tabela 3: Sequência de primers *sense* e *anti-sense* e os alelos correspondentes à ligação de cada primer.

| Primers  | Alelo                                     | Sequência*                    |
|----------|---|-------------------------------|
| III-48s  | Lewis selvagem – <i>Le</i>                | 5'-CGCTGTCTGGCCGCACT-3'       |
| III-47s  | Lewis mutante – <i>Le</i> <sup>59</sup>   | 5'-GCTGTCTGGCCGCACgG-3'       |
| III-54s  | Lewis selvagem – <i>Le</i>                | 5'-CCAGACGGTGCGCAGCAT-3'      |
| III-53s  | Lewis mutante – <i>le</i> <sup>1067</sup> | 5'-CCAGACGGTGCGCAGCAa-3'      |
| III-50s  | Lewis selvagem – <i>Le</i>                | 5'- CCCTCCTGATCCTGCTATG -3'   |
| III-49s  | Lewis mutante – <i>le</i> <sup>202</sup>  | 5'- ACCCTCCTGATCCTGCTAc -3'   |
| III-52s  | Lewis selvagem – <i>Le</i>                | 5'- GTACCCACAGGCAGACACG -3'   |
| III-51s  | Lewis mutante – <i>Le</i> <sup>314</sup>  | 5'- TGTACCCACAGGCAGACAt -3'   |
| III-55as | Lewis – anti-sense                        | 5'-TTCTGGAGGGGAGAGGCT-3'      |
| hGH-1    | Hormônio de crescimento                   | 5'- GCCTTCCCAACCATTCCCTT-3'   |
| hGH-2    | Hormônio de crescimento                   | 5'- TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3' |

\* as letras minúsculas indicam os nucleotídeos mutados. hGH1 e hGH2 são controles de reação e amplificam um fragmento de 428pb.

Tabela 4: Tamanho dos produtos obtidos por PCR-AE para determinação das mutações T59G, T1067A, T202C e C314T do gene *Lewis (FUT3)*

| Mix | Mutação       | Primers sense | Primers anti-sense | Tamanho do produto (pb) |
|-----|---------------|---------------|--------------------|-------------------------|
| 1   | 59 selvagem   | III-48s       | III-55as           | 1186                    |
| 2   | 59T>G         | III-47s       | III-55as           | 1185                    |
| 3   | 1067 selvagem | III-54s       | III-55as           | 180                     |
| 4   | 1067T>A       | III-53s       | III-55as           | 180                     |
| 5   | 202 selvagem  | III-50s       | III-55as           | 1045                    |
| 6   | 202T>C        | III-49s       | III-55as           | 1044                    |
| 7   | 314 selvagem  | III-52s       | III-55as           | 932                     |
| 8   | 314C>T        | III-51s       | III-55as           | 933                     |

#### 4.2.7. Definição dos genótipos Lewis

A distribuição das mutações no gene *FUT3* foi realizada separadamente, de acordo com cada mutação em: homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutante. Para T59G foram respectivamente TT, TG e GG; para T1067A, TT, TA e AA; para T202C, TT, TC e CC e para C314T, CC, CT e TT. Além disso, as mutações foram estudadas em combinações, formando genótipos que compunham os quatro polimorfismos estudados (CAKIR et al., 2002). Assim, foram formados vários genótipos com a seguinte ordem das mutações: T59G, T1067A, T202C e C314T. Quando o indivíduo não apresentava a mutação, o alelo foi considerado como selvagem (S), quando a mutação estava presente em apenas um alelo, considerou-se heterozigoto (H) e quando a mutação estava presente nos dois alelos, homozigoto mutante (M). Dessa forma, segue-se alguns exemplos: SSSS, quando não foi encontrado nenhuma

mutação nas quatro posições estudadas do gene *FUT3*; SSMM quando apresentou apenas as mutações T202C e C314T em estado homozigoto e nas posições 59 e 1067 não foram encontradas mutações; MHSS quando a mutação T59G está presente em dois alelos (homozigoto mutante), a T1067A em apenas um alelo (heterozigoto) e as mutações nas posições 202C e 314 não foram encontradas.

Como as mutações T59G e C314T não inativam a enzima Lewis, os genótipos considerados como responsáveis pela ausência de atividade da enzima Lewis e, portanto de indivíduos genotipados como Lewis-negativo foram: SSMM, MMSS, HHHH, HSMH, MMHS, SSMH e HHMH.

#### 4.2.8. Amplificação gênica alelo específico para verificação da mutação G428A do gene *FUT2*

A determinação da mutação G428A do gene *FUT2* foi realizada por amplificação alelo específico (PCR-AE) utilizando também a amplificação de um fragmento do gene do hormônio de crescimento como controle interno de reação (428pb). Os *primers* específicos (Tabela 5) amplificam fragmentos de 519/520pb de acordo com o alelo presente (PROCTER et al., 1997).

Tabela 5: Sequência de *primers sense* e *anti-sense* utilizados para determinação da mutação G428A no gene *FUT2*.

| Primers | Alelo                                       | Sequência*                |
|---------|---|---------------------------|
| Se      | Secretor selvagem – <i>Se</i>               | 5'-GCTACCCCTGCTCCTGG-3'   |
| Se      | Secretor mutante – <i>se</i> <sup>428</sup> | 5'-CGGCTACCCCTGCTCCTa-3'  |
| Se-as   | Secretor – anti-sense                       | 5'-GGCTGCCTCTGGCTTAAAG-3' |

\* as letras minúsculas indicam os nucleotídeos mutados

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 12,5 µl nas seguintes condições: 10 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 50 mM de KCl; 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 25 pmol/µL de cada primer; 0,25 U de Taq polimerase e 100 - 200ng do DNA genômico. O ciclo de amplificação utilizado foi: 5 ciclos a 96° C 25s, 70° C 45s, 72° C 45s; 21 ciclos a 96° C 25s, 65° C 50s, 72° C 45s; 4 ciclos a 96° C 25s, 55° C 60s, 72° C 120s. Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose 2%.

### **4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) foi realizado na comparação dos polimorfismos e da fenotipagem ABO entre os grupos estudo e controle e para a associação dos dados clinicopatológicos. Para os sistemas Lewis e secretor, na avaliação dos polimorfismos entre grupo estudo e controle e para avaliação dos dados clinicopatológicos de tamanho tumoral e classificação TNM. Já o teste exato de Fisher foi utilizado para o sistema Lewis na comparação dos polimorfismos entre os grupos estudo e controle e para os dados clinicopatológicos de metástase em linfonodos. Para o Secretor, este teste foi utilizado na associação com os dados clinicopatológicos de metástase em linfonodos. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes e o software utilizado para as análises foi BioEstat 3.0.

## *5. Resultados*

A genotipagem do sistema sanguíneo ABO foi realizada pelo polimorfismo por tamanhos dos fragmentos de restrição com a realização de duas reações de PCR e a utilização de 3 enzimas de restrição: *MspI*, *KpnI* e *NarI*. Todas as amostras foram submetidas a PCR 1 para amplificação de um fragmento de 248/249pb do exon 6, seguidas da digestão enzimática com *KpnI*. A presença das bandas de 164pb e 84pb é característica da deleção no nucleotídeo 261 e, portanto do alelo  $O^I$  (Figura 6).

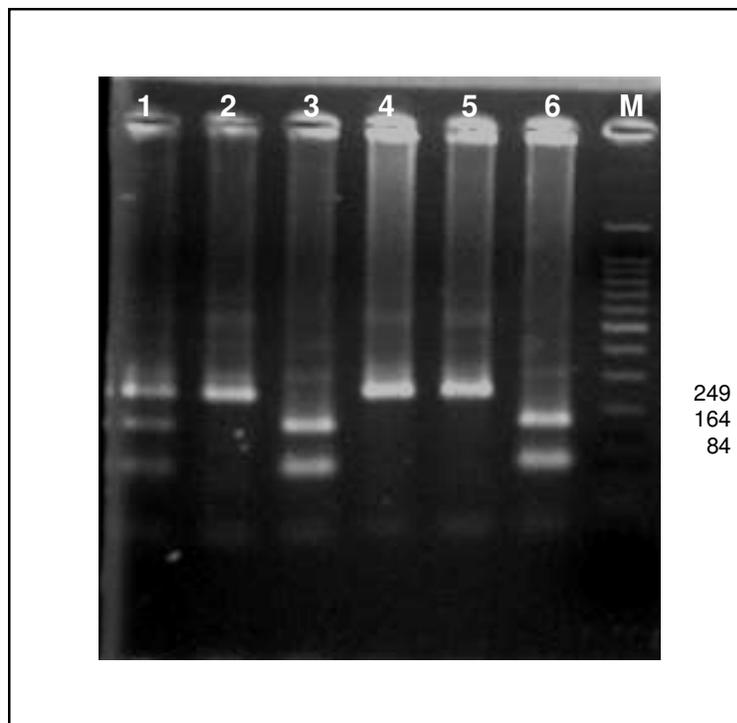


Figura 6- Padrão de bandas de diferentes genótipos obtidos após digestão do fragmento de 249pb com a enzima *KpnI*. Canaletas 1= fenótipo B, genótipo  $BO^I$ ; 2= fenótipo A, genótipo AA; 3= fenótipo O, genótipo  $O^I O^I$ ; 4= fenótipo B, genótipo BB; 5= fenótipo A, genótipo AA e 6= fenótipo O, genótipo  $O^I O^I$ ; M=massa molecular de 100pb.

Todas as amostras, com exceção das genotipadas como  $O^I O^I$  foram submetidas a PCR2 seguidas por digestão enzimática com *MspI*. A presença da banda de 223pb é característica do alelo *B* (mutação G703A) e a banda de 160pb (mutação C467T) pode ser encontrada no alelo  $A^2$ , embora esteja presente também em outros alelos, como por exemplo no alelo  $A^{Iv}$  (Figura 7).

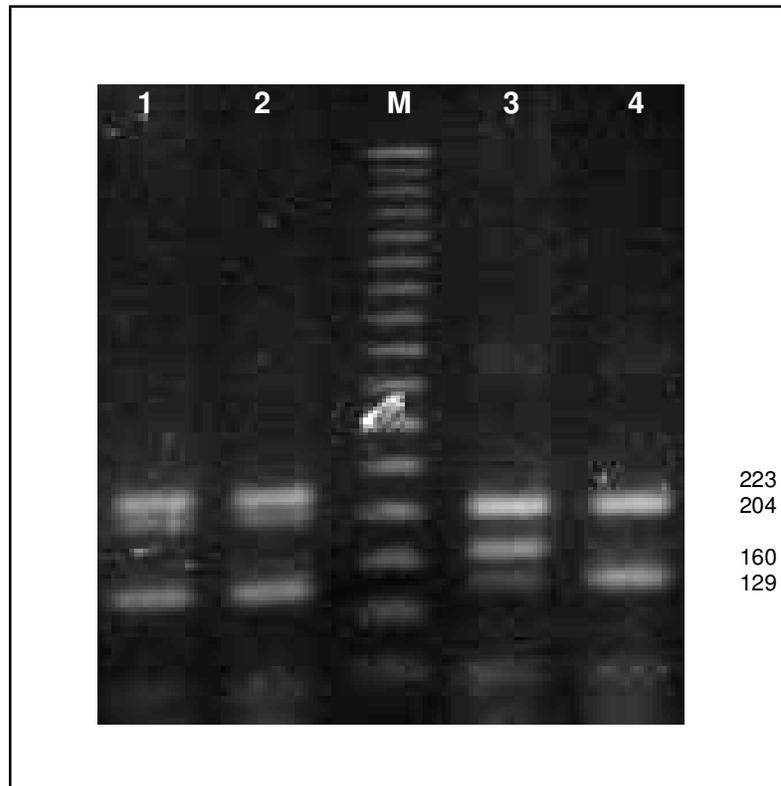


Figura 7 - Padrão de bandas de diferentes genótipos obtidos após digestão do fragmento de 467pb com enzima *MspI*. 1=fenótipo B, genótipo  $BO^I$ ; 2= fenótipo B, genótipo  $BO^I$ ; 3=presença da mutação C467T; 4=fenótipo A, genótipo  $A O^I$ ; M=massa molecular de 50pb

Entretanto, a análise da digestão dos fragmentos de 467pb com *MspI* e 249pb com *KpnI* não permitiram a identificação do alelo  $O^2$ . Assim, outra digestão foi realizada com a enzima *NarI* no fragmento de 467pb, produzindo os fragmentos de 262 e 205pb e identificando a mutação C526G, comum aos alelos *B* e  $O^2$ . Como essa digestão não foi realizada em nenhuma amostra de fenótipo B, a presença dos fragmentos digeridos foi considerada apenas como conclusiva para o alelo  $O^2$ . Portanto, um padrão de bandas composto pelos fragmentos de 262 e 205pb seria conclusiva da presença do alelo  $O^2$  (Figura 8).

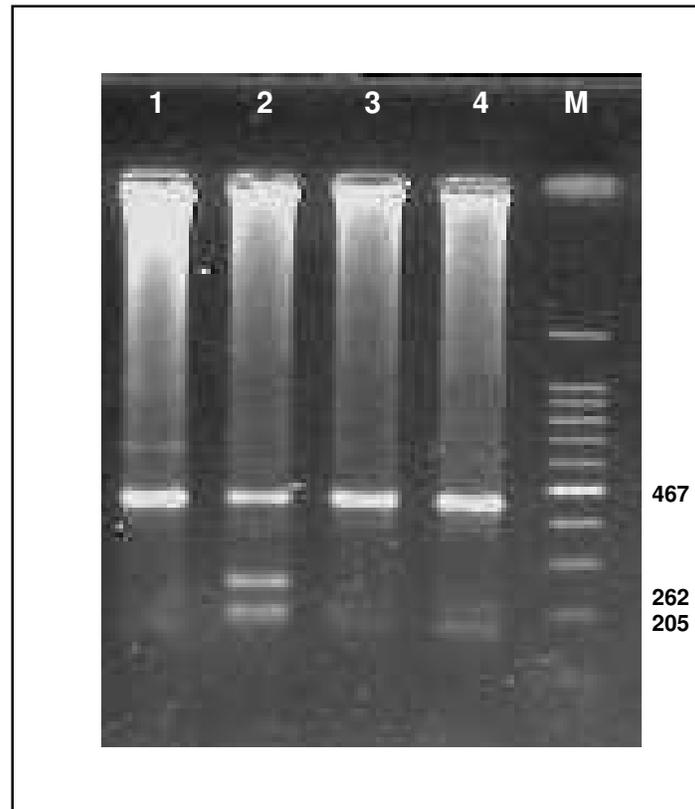


Figura 8- Padrão de bandas obtido pela digestão com *NarI* do fragmento de 467pb amplificado do exon 7. Canaletas 1= fenótipo A, genótipo AA; 2= fenótipo O, genótipo  $O^1O^2$ ; 3= fenótipo A, genótipo AA; 4= fenótipo A, genótipo AA e M= massa molecular de 100pb.

De acordo com a fenotipagem e com o padrão de bandas produzido na digestão enzimática, os genótipos mais comuns no grupo em estudo (pacientes com câncer de mama) foram  $O^1O^1$  (n=34, 44,7%),  $AO^1$  (n=20, 26,3%),  $BO^1$  (n=7, 9,2%) e  $AA$  (n=6, 7,9%). No grupo controle composto por mulheres doadoras de sangue, os genótipos mais comuns foram  $O^1O^1$  (n=32, 41,0%),  $AO^1$  (n=20, 25,6%) e  $AA$  (n=10, 12,8%) e  $BO^1$  (n=9, 11,5%). A comparação destes resultados não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 – Frequência de fenótipos e genótipos do grupo sanguíneo ABO nas pacientes portadoras de câncer de mama e no grupo controle

| Fenótipo | Genótipo | Pacientes (n=76) |      | Controle (n=78) |      |
|----------|----------|------------------|------|-----------------|------|
|          |          | N                | %    | N               | %    |
| O        | $O^1O^1$ | 34               | 44,7 | 32              | 41,0 |
|          | $O^1O^2$ | 2                | 2,6  | 1               | 1,3  |
| A        | $AA$     | 6                | 7,9  | 10              | 12,8 |
|          | $AO^1$   | 20               | 26,3 | 20              | 25,6 |
| B        | $BB$     | 3                | 3,9  | 2               | 2,6  |
|          | $BO^1$   | 7                | 9,2  | 9               | 11,5 |
| AB       | $AB$     | 4                | 5,3  | 4               | 5,1  |
| Total    |          | 76               | 100  | 78              | 100  |

Qui quadrado ( $\chi^2$ ), comparação entre os grupos teste e controle para a fenotipagem (P=0,9323) e genotipagem do grupo ABO (P=0,9356).

As características clinicopatológicas das pacientes portadoras de câncer de mama separadas por grupo sanguíneo ABO estão apresentadas na tabela 7. Os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa tanto para extensão do tumor primário (T) como para metástase em linfonodos regionais. O estadiamento do tumor seguido pela classificação TNM também não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparado com os diferentes grupos sanguíneos ABO, tanto no fenótipo (tabela 7) como no genótipo.

Tabela 7 – Características clinicopatológicas das pacientes portadoras de câncer de mama associadas com o grupo sanguíneo ABO

| Característica          | O         | A         | B        | AB       | Valor P |
|-------------------------|-----------|-----------|----------|----------|---------|
| Tumor                   | N=35 (%)  | N=26 (%)  | N=10 (%) | N=4 (%)  | 0,6128  |
| T1                      | 12 (34,3) | 4 (15,4)  | 3 (30,0) | 1 (25,0) |         |
| T2                      | 14 (40,0) | 12 (46,1) | 5 (50,0) | 2 (50,0) |         |
| T3                      | 6 (17,1)  | 4 (15,4)  | 2 (20,0) | 1 (25,0) |         |
| T4                      | 3 (8,6)   | 6 (23,1)  | 0 (0,0)  | 0 (0,0)  |         |
| Metástase em linfonodos | N=34 (%)  | N=25 (%)  | N=10 (%) | N=4 (%)  | 0,1985  |
| Positivo                | 9 (26,5)  | 11 (44,0) | 4 (40,0) | 3 (75,0) |         |
| Negativo                | 25 (73,5) | 14 (56,0) | 6 (60,0) | 1 (25,0) |         |
| Estágio TNM             | N=34 (%)  | N=24 (%)  | N=9 (%)  | N=4 (%)  | 0,3625  |
| I                       | 11 (32,3) | 4 (16,7)  | 3 (33,3) | 0 (0,0)  |         |
| IIA                     | 10 (29,4) | 7 (29,2)  | 1 (11,1) | 1 (25,0) |         |
| IIB                     | 7 (20,6)  | 5 (20,8)  | 4 (44,4) | 3 (75,0) |         |
| IIIA                    | 3 (8,8)   | 1 (4,2)   | 1 (22,2) | 0 (0,0)  |         |
| IIIB                    | 2 (5,9)   | 4 (16,7)  | 0 (0,0)  | 0 (0,0)  |         |
| IV                      | 1 (2,9)   | 3 (12,5)  | 0 (0,0)  | 0 (0,0)  |         |

Sobre o polimorfismo no gene *FUT3*, quatro mutações foram avaliadas pelo método de PCR-AE: T59G, T1067A, T202C e C314T. A banda de 1185/6pb corresponde à amplificação de parte do gene *FUT3* onde se encontra a mutação T59G, já a banda de 180pb corresponde à amplificação para verificação da mutação T1067A. As reações de amplificação para caracterização das mutações T202C e C314T produzem fragmentos de 1045/1044pb e 932/933pb respectivamente. Um fragmento do gene do hormônio de crescimento (*hGH*) foi usado como controle de reação amplificando um fragmento de 428bp (Figuras 9).

A mutação no gene *FUT3* mais freqüentemente encontrada foi T202C em ambos os grupos, com uma freqüência do alelo *C* de 25% (n=38) para o grupo em estudo e de 17,3% (n=27) para o grupo controle. Em seguida encontramos a mutação C314T com uma freqüência do alelo *T* de 20,4% (n=31) no grupo de pacientes com câncer de mama e de 16,0% (n=25) para as doadoras de sangue. A mutação menos encontrada em ambos os grupos foi T1067A, com uma freqüência do alelo *A* de 9,9% (n=15) no grupo em estudo e de 5,8% (n=9) no grupo controle. Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo e as mulheres doadoras de sangue quando essas quatro mutações foram avaliadas separadamente (Tabela 8)

Tabela 8 – Frequência das mutações e dos alelos do gene *FUT3* em pacientes portadoras de câncer de mama e doadoras de sangue

| Mutação | Alelo          | Grupo Estudo |      | Grupo Controle |      | Valor P* |
|---------|----------------|--------------|------|----------------|------|----------|
|         |                | N            | %    | N              | %    |          |
| T59G    | TT             | 56           | 73,7 | 63             | 80,8 | 0,5769   |
|         | TG             | 16           | 21,0 | 12             | 15,4 |          |
|         | GG             | 4            | 5,3  | 3              | 3,8  |          |
|         | Alelo <i>T</i> | 128          | 84,2 | 138            | 88,5 |          |
|         | alelo <i>G</i> | 24           | 15,8 | 18             | 11,5 |          |
| T1067A  | TT             | 63           | 82,9 | 70             | 89,7 | 0,4573   |
|         | TA             | 11           | 14,5 | 7              | 9,0  |          |
|         | AA             | 2            | 2,6  | 1              | 1,3  |          |
|         | Alelo <i>T</i> | 137          | 90,1 | 147            | 94,2 |          |
|         | Alelo <i>A</i> | 15           | 9,9  | 9              | 5,8  |          |
| T202C   | TT             | 44           | 57,9 | 54             | 69,3 | 0,2827   |
|         | TC             | 26           | 34,2 | 21             | 26,9 |          |
|         | CC             | 6            | 7,9  | 3              | 3,8  |          |
|         | Alelo <i>T</i> | 114          | 75,0 | 129            | 82,7 |          |
|         | Alelo <i>C</i> | 38           | 25,0 | 27             | 17,3 |          |
| C314T   | CC             | 48           | 63,2 | 56             | 71,8 | 0,4946   |
|         | CT             | 25           | 32,9 | 19             | 24,4 |          |
|         | TT             | 3            | 3,9  | 3              | 3,8  |          |
|         | Alelo <i>C</i> | 121          | 79,6 | 131            | 84,0 |          |
|         | Alelo <i>T</i> | 31           | 20,4 | 25             | 16,0 |          |

\* Valor P obtido a partir do teste de Qui-quadrado

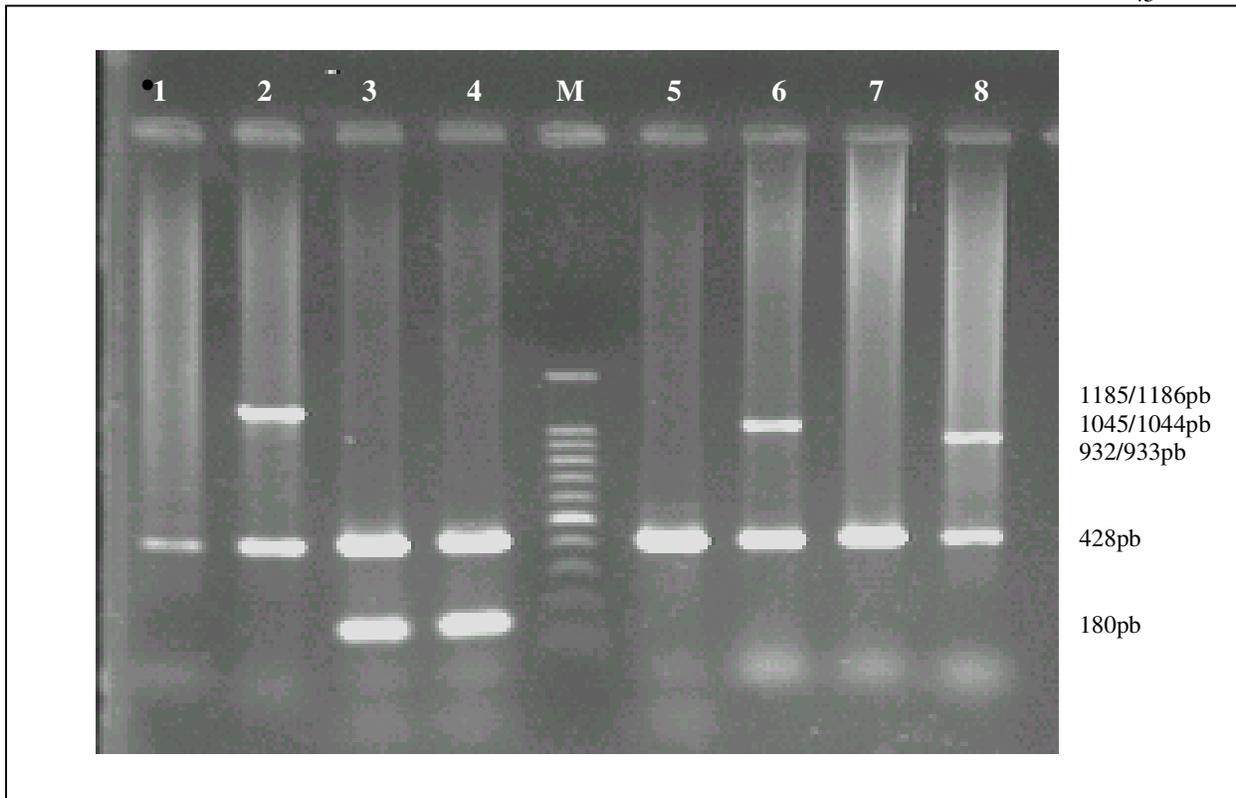


Figura 9 - Padrão de bandas obtido pela reação de amplificação alelo específico (PCR-AE) para as mutações T59G, T1067A, T202C e C314T do gene *FUT3*. Canaletas 1 e 2 representam a amplificação utilizando o *primer* III-48s (para o alelo selvagem - T na posição 59) e o *primer* III-47s (alelo mutante - G na posição 59), respectivamente - indivíduo homocigoto mutante (GG); Canaletas 3 e 4 representam a amplificação usando o *primer* III-54s (alelo selvagem - T na posição 1067) e o *primer* III-53s (alelo mutante - A na posição 1067), respectivamente - indivíduo heterocigoto (TA); Canaletas 5 e 6 representam a amplificação utilizando o *primer* III-50s (para o alelo selvagem - T na posição 202) e o *primer* III-49s (alelo mutante - C na posição 202), respectivamente - indivíduo homocigoto mutante (CC); Canaletas 7 e 8 representam a amplificação usando o *primer* III-52s (alelo selvagem - C na posição 314) e o *primer* III-51s (alelo mutante - C na posição 314), respectivamente - indivíduo homocigoto mutante (TT); Canaleta M = massa molecular de 100pb. Banda de 428pb corresponde ao controle interno de reação (hGH).

Com relação aos genótipos realizados em combinação dos polimorfismos em quatro posições do gene *FUT3* (T59G, T1067A, T202C e C314T), o genótipo mais comum em ambos os grupos foi o tipo-selvagem, SSSS, 44,7% (n=34) para o grupo em estudo e 52,6% (n=41) no grupo controle (Tabela 9). Para comparação da associação do sistema Lewis com o câncer de mama, realizou-se a análise estatística considerando os genótipos responsáveis pela inativação da enzima Lewis (SSMM, MMSS, HHHH, HSMH, MMHS, SSMH, HHMH) e os genótipos os quais não inativam a enzima. Assim, 63 pacientes com câncer de mama (82,9%) apresentaram genótipos em que a enzima Lewis é funcional (Lewis positivo) e 13 pacientes (17,1%) com genótipos responsáveis pela inativação da enzima Lewis (Lewis negativo). No grupo controle, 74 (94,9%) mulheres apresentaram genótipo para Lewis positivo e 4 (5,1%) mulheres para Lewis negativo. Dessa forma, foi observada diferença estatisticamente significativa (teste exato de Fisher) entre o grupo de pacientes portadoras de câncer de mama e o grupo controle (P=0,0126).

Indivíduos fenotipados como Lewis-negativos, Le(a-b-), refletem a ausência de atividade da enzima Lewis e deveriam, portanto, possuir alguma mutação inativadora no gene *FUT3*. Entretanto, dos 18 indivíduos da nossa casuística fenotipados como Lewis negativo - Le(a-b-), 16 (88,9%) são portadores de duas ou mais, das quatro mutações no gene *FUT3*, pesquisadas neste estudo, 1 (5,6%) é portador de apenas uma mutação e 1 (5,6%) não apresenta nenhuma das quatro mutações. Além disso, somente 10 (55,6%) dos 18 indivíduos possuem genótipos que realmente determinam a incapacidade funcional da enzima (Tabela 10).

Tabela 9 – Genótipos obtidos a partir da associação de quatro polimorfismos do gene *FUT3* (T59G, T1067A, T202C e C314T) em pacientes portadoras de câncer de mama (grupo em estudo) e doadoras de sangue (grupo controle).

| Genótipos | Grupo Estudo |      | Grupo Controle |      |
|-----------|--------------|------|----------------|------|
|           | N = 76       | %    | N = 78         | %    |
| SSSS      | 34           | 44,7 | 41             | 52,6 |
| HHSS      | 3            | 3,9  | 6              | 7,7  |
| SSHH      | 17           | 22,4 | 18             | 23,1 |
| HSSS      | 4            | 5,3  | 4              | 5,1  |
| HSHH      | 0            | 0,0  | 1              | 1,3  |
| MSSS      | 1            | 1,3  | 1              | 1,3  |
| MHSS      | 1            | 1,3  | 1              | 1,3  |
| SSHS      | 2            | 2,6  | 1              | 1,3  |
| HHHS      | 1            | 1,3  | 0              | 0,0  |
| HSHS      | 0            | 0,0  | 1              | 1,3  |
| SSMM*     | 1            | 1,3  | 3              | 3,8  |
| MMSS*     | 1            | 1,3  | 1              | 1,3  |
| HHHH*     | 5            | 6,6  | 0              | 0,0  |
| HSMH*     | 2            | 2,6  | 0              | 0,0  |
| MMHS*     | 1            | 1,3  | 0              | 0,0  |
| SSMH*     | 2            | 2,6  | 0              | 0,0  |
| HHMH*     | 1            | 1,3  | 0              | 0,0  |

\* Genótipos Lewis negativo; Teste exato de Fisher, Lewis positivo *versus* Lewis Negativo, P = 0,0126. S – Selvagem, H – Heterozigoto, M – Mutante homozigoto

Tabela 10- Mutações do gene *FUT3* (T59G, T1067A, T202C e C314T) encontradas nos indivíduos fenotipados como Lewis negativo: Le(a-b-).

| Mutação  | Indivíduos* |             |             |             |             |             |      |             |      |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|------|
|          | 05P         | 06P         | 08P         | 11P         | 28P         | 32P         | 10   | 13          | 19   |
| T59G     | TG          | TG          | TG          | TT          | TT          | TT          | TG   | TT          | TG   |
| T1067A   | TA          | TA          | TA          | TT          | TT          | TT          | TA   | TT          | TT   |
| T202C    | TC          | TC          | TC          | CC          | CC          | CC          | TT   | CC          | TC   |
| C314A    | CT          | CT          | CT          | CT          | CT          | TT          | CC   | TT          | CC   |
| Genótipo | <b>HHHH</b> | <b>HHHH</b> | <b>HHHH</b> | <b>SSMH</b> | <b>SSMH</b> | <b>SSMM</b> | HHSS | <b>SSMM</b> | HSHS |

| Mutação  | Indivíduos* |      |      |      |      |      |             |             |      |
|----------|-------------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|------|
|          | 24          | 34   | 37   | 47   | 51   | 53   | 63          | 69          | 75   |
| T59G     | TT          | GG   | TG   | TT   | TT   | TG   | GG          | TT          | GG   |
| T1067A   | TT          | TT   | TA   | TT   | TT   | TT   | AA          | TT          | TA   |
| T202C    | CC          | TT   | TT   | TC   | TT   | TC   | TT          | CC          | TT   |
| C314A    | TT          | CC   | CC   | CT   | CC   | CT   | CC          | TT          | CC   |
| Genótipo | <b>SSMM</b> | MSSS | HHSS | SSHH | SSSS | SHSH | <b>MMSS</b> | <b>SSMM</b> | MHSS |

\* 5P a 32P (indivíduos do grupo de pacientes com câncer de mama), 10 a 75 (indivíduos do grupo controle). Em negrito estão representados os genótipos responsáveis pela produção de enzima Lewis não funcional

O polimorfismo do gene *FUT2* para caracterização do estado secretor foi verificado pela técnica de PCR-AE para identificação da mutação G428A. A amplificação do gene do hormônio de crescimento (hGH) foi usada como controle interno de reação produzindo um fragmento de 428pb. A banda de 519/520pb corresponde à amplificação de parte do gene *FUT2* onde se encontra a mutação G428A de acordo com o *primer* utilizado (Figura 10).

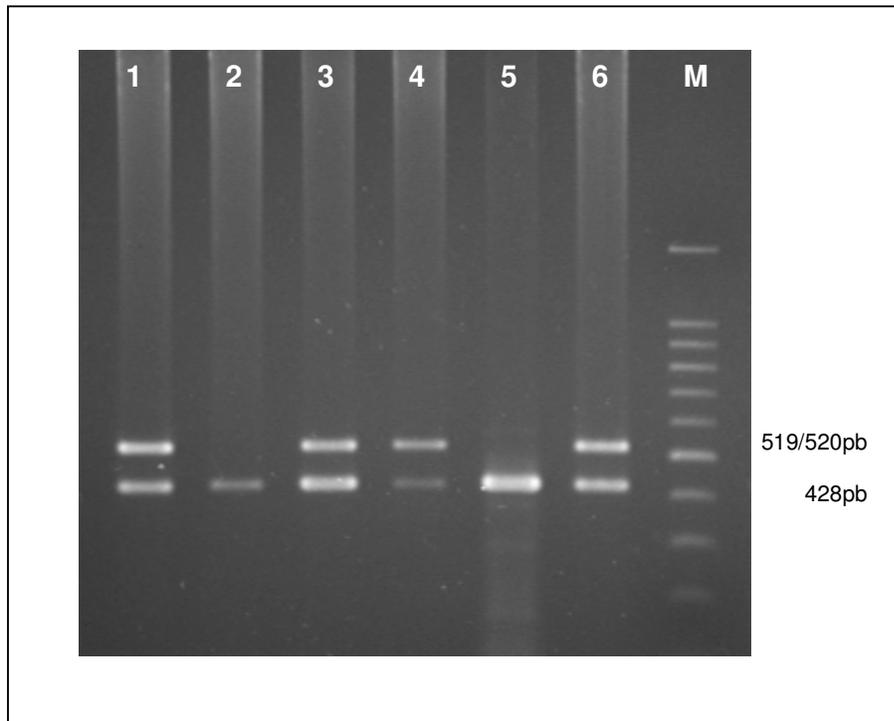


Figura 10- Padrão de bandas obtido pela PCR-AE para a mutação G428A do gene *FUT2* que amplifica um fragmento de 519/520pb. Canaletas 1,3 e 5 representam a amplificação para o alelo selvagem (G na posição 428) utilizando o *primer* Se; Canaletas 2,4 e 6 representam a amplificação do alelo mutante (A na posição 428) utilizando *primer* se. Canaletas 1 e 2 representam um indivíduo homocigoto para o alelo selvagem (GG), Canaletas 3 e 4 representam indivíduo heterocigoto (GA) e Canaletas 5 e 6 representam um indivíduo homocigoto para a mutação (AA). Canaleta M = massa molecular de 100pb. Banda de 428pb corresponde ao controle interno de reação (hGH).

A frequência da mutação G428A do gene *FUT2* encontrada em ambos os grupos foi elevada, sendo que 73,7% (n=56) das mulheres portadoras de câncer de mama apresentaram a mutação e destas, 21,1% (n=16) em estado homozigoto e 52,6% (n=40) em heterozigoto. No que se refere ao grupo controle, 56 (71,8%) mulheres apresentaram a mutação, sendo que 18 (23,1%) em homozigose e 38 (48,7%) em estado heterozigoto. Portanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (P=0,8877).

O fenótipo secretor e não-secretor pode ser determinado pela fenotipagem Lewis, quando esta é positiva, pois indivíduos Le(a-b+) são secretores, Le(a+b-) não-secretores e Le(a+b+) secretores parciais. Entre os indivíduos não-secretores (n=22) fenotipados como Le(a+b-), 95,5% (n=21) foram homozigotos para a mutação G428A e 4,5% (n=1) homozigoto para o alelo normal (GG), demonstrando que a mutação G428A é a principal causa da incapacidade funcional da enzima codificada pelo gene *FUT2* na casuística deste estudo.

Sobre a associação das características clinicopatológica dos tumores e os grupos Lewis e Secretor, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os genótipos do grupo Lewis com nenhum parâmetro clinicopatológico. Entretanto, foi observada diferença estatisticamente significante na comparação dos genótipos secretor e não-secretor, sendo que tumores de indivíduos com genótipo não-secretor, ou seja, com a mutação G428A em homozigose, estariam mais associados com a presença de metástase em linfonodos axilares (P=0,0149). Para os outros parâmetros clinicopatológicos, não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 11).

Tabela 11 – Características clinicopatológicas das pacientes portadoras de câncer de mama associadas com os genótipos dos grupos Lewis e Secretor

| Característica          | Genótipos | Genótipos            | Valor P             | Genótipo              | Genótipo                  | Valor P             |
|-------------------------|-----------|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|
|                         | Lewis +   | Lewis - <sup>a</sup> |                     | Secretor <sup>b</sup> | não-secretor <sup>c</sup> |                     |
| Tumor                   | N=62 (%)  | N=13 (%)             |                     | N=59                  | N=16 (%)                  |                     |
| T1                      | 17 (27,4) | 3 (23,1)             | 0,6089 <sup>d</sup> | 15 (25,4)             | 5 (29,4)                  | 0,7051 <sup>d</sup> |
| T2                      | 28 (45,2) | 5 (38,5)             |                     | 27 (45,8)             | 6 (35,3)                  |                     |
| T3                      | 11 (17,7) | 2 (15,4)             |                     | 11 (18,4)             | 2 (11,7)                  |                     |
| T4                      | 6 (9,7)   | 3 (23,1)             |                     | 6 (10,2)              | 3 (17,6)                  |                     |
| Metástase em linfonodos | N=61 (%)  | N=12 (%)             |                     | N=57 (%)              | N=16 (%)                  |                     |
| Positivo                | 21 (34,4) | 4 (33,3)             | 1,000 <sup>e</sup>  | 15 (26,3)             | 10 (62,5)                 | 0,0149 <sup>e</sup> |
| Negativo                | 40 (65,6) | 8 (66,7)             |                     | 42 (73,7)             | 6 (37,5)                  |                     |
| Estágio TNM             | N=59 (%)  | N=12 (%)             |                     | N=55                  | N=16 (%)                  |                     |
| I                       | 15 (25,4) | 3 (25,0)             | 0,0893 <sup>d</sup> | 14 (25,5)             | 4 (24,8)                  | 0,1187 <sup>d</sup> |
| IIA                     | 18 (30,5) | 1 (8,3)              |                     | 16 (29,1)             | 3 (18,8)                  |                     |
| IIB                     | 14 (23,7) | 5 (41,7)             |                     | 16 (29,1)             | 3 (18,8)                  |                     |
| IIIA                    | 5 (8,5)   | 0 (0,0)              |                     | 2 (3,6)               | 3 (18,8)                  |                     |
| IIIB                    | 3 (5,1)   | 3 (25,0)             |                     | 3 (5,4)               | 3 (18,8)                  |                     |
| IV                      | 4 (6,8)   | 0 (0,0)              |                     | 4 (7,3)               | 0 (0,0)                   |                     |

<sup>a</sup> Lewis – (Lewis negativo) são os genótipos responsáveis pela produção de enzima Lewis não-funcional (SSMM, MMSS, HHHH, HSMH, MMHS, SSMH, HHMH). <sup>b</sup> Genótipos obtidos pela pesquisa da mutação G428A. Genótipos considerados secretores: GG (homozigoto selvagem) e GA (heterozigoto). <sup>c</sup> Genótipos obtidos pela pesquisa da mutação G428A. Genótipos considerados não-secretores: AA (homozigoto mutante). <sup>d</sup> P obtido pelo Teste de Qui-quadrado. <sup>e</sup> P obtido pelo Teste exato de Fisher

## *6. Discussão*

Os grupos sanguíneos ABO são definidos tradicionalmente por testes de hemaglutinação com soros específicos, mas a identificação dos genótipos tornou-se possível, de maneira mais específica, com a introdução de métodos moleculares. Neste estudo, utilizou-se a técnica de PCR seguida por restrição enzimática para determinação dos genótipos, identificando os alelos *A*, *B*, *O*<sup>1</sup> e *O*<sup>2</sup> em indivíduos portadores de câncer de mama e em mulheres doadoras de sangue pertencentes à região central do Estado de São Paulo.

Os genes *ABO*, *FUT2* e *FUT3* são claramente polimórficos, pelo menos nos humanos. Seus produtos, presentes principalmente nas células epiteliais em contato com o ambiente, sugerem alguma função em nível de interação com microrganismos. A existência de associação entre os marcadores de grupos sanguíneos e doenças tem sido investigada e significantes associações foram reportadas em patologias diversas (MARIONNEAU et al., 2001). Maior risco de desenvolvimento de doença coronariana tem sido encontrada em indivíduos não-O (GARRISON et al., 1976). Uma associação entre genótipos ABO e o nível do fator de von Willebrand tem sido reportado, sendo que indivíduos OO apresentam os menores índices (SOUTO, et al., 2000).

Estudos com câncer verificaram uma associação entre o grupo sanguíneo A e mulheres com câncer de mama (VOGEL, 1970). Nenhuma associação foi encontrada entre os fenótipos do grupo sanguíneo ABO e o câncer de pele em estudo realizado por TURSEN et al (2005). Em um estudo na Armênia, foi encontrado uma associação entre mulheres do grupo AB e Rh D negativo com o carcinoma endometrial (ADAMIAN, 2005). Não houve associação entre o grupo sanguíneo ABO e carcinoma de esôfago quando considerado o tecido em geral, entretanto, houve uma associação entre os indivíduos do grupo B apresentando maior risco de desenvolvimento de carcinoma de esôfago na terceira porção do órgão (SU et al., 2001).

Estudos de culturas celulares de carcinoma de colon de rato indicam que células que expressam o antígeno A são resistentes a apoptose e contribuem para a formação de tumores (MARIONNEAU et al., 2002). Entretanto, estudos usando ratos ou camundongos como modelos experimentais têm mostrado que no epitélio estratificado a expressão de antígenos do grupo sanguíneo ABO é oposta ao que ocorre em humanos, já que células basais expressam os antígenos A ou B, enquanto que as células espinhosas expressam o antígeno precursor H. Assim, o modelo em ratos não deve ser comparado com a carcinogênese humana (MARIONNEAU et al., 2002; MACKENZIE et al., 1995). Ainda, estudos têm demonstrado que a expressão de antígenos A e B inibem a migração celular e que pacientes que mantêm a expressão destes antígenos nas células tumorais possuem um melhor prognóstico do que pacientes do grupo O (DABELSTEEN & GAO 2005).

No presente estudo, comparando-se os grupos sanguíneos ABO, Lewis e Secretor, não foi encontrada diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com câncer de mama e um grupo controle composto por mulheres doadoras de sangue para os fenótipos ABO e genótipos dos grupos sanguíneo ABO e Secretor. Entre as pacientes portadoras de câncer de mama, o fenótipo mais comum foi O com 47,3%, seguido pelo A com 34,2%, B com 13,1% e AB 5,3%. Os resultados são semelhantes para o grupo controle com 42,3% de O, 38,4% de A, 14,1% de B e 5,1% de AB. Não foi encontrado, portanto associação estatisticamente significativa entre os dois grupos. Para os genótipos, a frequência também foi semelhante nos dois grupos, sendo o  $O^1O^1$  o mais encontrado (44,7% para o grupo em estudo e 41% para o grupo controle), seguido pelo  $AO^1$  (26,3% para o grupo em estudo e 25,6 no grupo controle),  $BO^1$  no grupo em estudo (9,2%) e AA no grupo controle (12,8%), não havendo diferença significativa entre os grupos. Esses resultados de frequência do grupo sanguíneo ABO são semelhantes aos

encontrados na literatura em outras regiões do Estado de São Paulo (MATTOS, et al., 2001; NOVARETTI, et al., 2000).

Para os dados clinicopatológicos dos tumores, não houve associação estatisticamente significativa entre o grupo sanguíneo ABO e Lewis. Entretanto, houve uma associação estatisticamente significativa para o grupo secretor, sendo que a presença de linfonodos axilares comprometidos pelo tumor estaria mais relacionada com indivíduos não-secretores. Em estudos com células tumorais de pâncreas, foi verificado que a expressão de alfa(1,2)fucosiltransferase está diminuída, o que pode estar associado com as propriedades metastáticas de tumores pancreáticos, pois a redução da atividade desta enzima se relacionou com o aumento da síntese de antígenos sialil-Lex (AUBERT et al., 2000). Assim, nossos resultados sugerem que a ausência de atividade da enzima secretora poderia se relacionar com a possibilidade de metástase em linfonodos regionais.

Estudos comparando os dados clinicopatológicos de tumores e os grupos sanguíneos são raros na literatura e ainda, os mais comuns são com grupo sanguíneo ABO. Em um estudo realizado com carcinoma de esôfago, foi observada uma associação entre o grau de diferenciação do tumor, tendo uma proporção menor de tumores pobremente diferenciados entre os indivíduos do grupo sanguíneo O (NOZOE et al., 2004). Ainda neste mesmo estudo, o maior tamanho dos tumores e um estágio TNM mais alto foram significativamente associados aos indivíduos do grupo sanguíneo AB.

Outros estudos relacionando características clinicopatológicas de tumores e o grupo sanguíneo ABO, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos (MOLDVAY et al., 2000; DRESLER et al., 1995; BRYNE et al., 1991). Em estudo realizado no Sri Lanka com câncer oral e fenótipo secretor, não foi observado nenhuma

diferença estatisticamente significativa (LAMEY, et al, 1994) Em um estudo na China, também não foi encontrada associação entre indivíduos com câncer de estômago e indivíduos sem câncer para o polimorfismo do gene *FUT2* (JIANG et al., 2003b). Em um estudo de 1999, foi observado uma associação entre a ocorrência de displasia epitelial da mucosa oral, que ocorreu exclusivamente em pacientes fenotipados como não-secretores (VIDAS et al., 1999).

A expressão alterada de antígenos ABH e Lewis tem sido encontrada em muitos tipos de carcinomas e estão freqüentemente associados com o prognóstico (LE PENDU et al., 2001; HAKAMORI, 1996). A presença do antígeno H em células de carcinoma de cólon contribuem para o aumento da resistência a apoptose e, ainda, a presença de antígenos  $\alpha$ 1,2fucosilados em carcinomas de esôfago, cólon, mama, cabeça e pescoço e pulmão está associada com mau prognóstico (MARIONNEAU et al., 2001).

Os antígenos Lewis não são formados intrinsecamente nos eritrócitos, mas adsorvidos do plasma pela membrana do eritrócito (WATKINS 1995). Processos patológicos e outras condições, tais como gestação (YAZAWA et al., 1996; HAMMER et al., 1981), cirrose (STIGENDAL et al., 1984), câncer (ORNTOFT et al., 1991; ERNEST, et al., 1984) podem também alterar a expressão dos antígenos Lewis nos eritrócitos. Assim, torna-se necessário a utilização de outras metodologias para avaliação do sistema Lewis, principalmente em indivíduos com patologias. Análises moleculares do gene *FUT3* têm sido utilizadas para verificação das mutações que levam a inativação da enzima Lewis em diversas patologias e em diferentes populações (SERPA et al., 2003; CAKIR et al., 2002; MATTOS et al., 2002; LIU et al., 2000; YAZAWA et al., 1996). No presente trabalho não foi realizado uma correlação de fenótipos do sistema Lewis com o câncer de mama, pois não foi possível obter o fenótipo de todas as pacientes portadoras de câncer de mama. Ainda, a genotipagem do

sistema sanguíneo Lewis foi realizada pela metodologia de PCR-AE, para quatro mutações no gene *FUT3*. No presente estudo foi possível observar as quatro mutações pesquisadas, T59G, T1067A, T202C e C314A entre as pacientes portadoras de câncer de mama e as mulheres doadoras de sangue. Entretanto, nenhuma associação estatisticamente significativa entre as mutações, consideradas isoladamente, e o câncer de mama foi encontrada.

A mutação T59G é encontrada de forma muito comum juntamente com mutações inativadoras da enzima Lewis, como a T1067A e a G508A (YAZAWA et al., 1995; NISHIHARA et al., 1994; NISHIHARA et al., 1993). Embora não seja uma mutação que inativa a enzima, a mutação T59G parece impedir a localização correta da mesma alterando a especificidade ao substrato e levando ao fenótipo Le negativo (SOEJIMA & KODA, 2005; NISHIHARA et al., 1999). Essa mutação quando encontrada de maneira isolada no alelo causa uma diminuição de 0 a 30% nos níveis da enzima, entretanto, ela encontra-se normalmente co-localizada com a mutação T1067A e G508A (MOLICONE et al., 1994; NISHIHARA et al., 1994; NISHIHARA et al., 1993). Outra mutação também muito pesquisada em estudos de genotipagem do sistema Lewis é a T1067A, encontrada de maneira isolada (*le*<sup>1067</sup>) ou em associação com T59G (*le*<sup>59,1067</sup>). Esta mutação gera uma troca do aminoácido isoleucina por lisina na posição 365 da seqüência de aminoácidos da proteína, e quando encontrada de maneira isolada reduz a atividade da enzima para menos de 10% (NISHIHARA et al., 1994). Em estudos de transfecção, Elmgren e colaboradores (1997) reportaram que a mutação T202C sozinha possui aproximadamente 1% de atividade, possivelmente devido a alterações na estrutura tridimensional da enzima provocada pela troca do triptofano pela arginina na posição 68 da proteína. Já a mutação C314T possui atividade similar a

enzima produzida pelo alelo selvagem, entretanto, quando as mutações T202C e C314T estão presentes no mesmo alelo, a enzima produzida não tem atividade.

Em nossos resultados, a mutação mais encontrada em ambos os grupos foi a T202C com uma frequência de 25,0% do alelo mutante C para as pacientes com câncer de mama e de 17,3% para o grupo controle. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, a frequência deste alelo foi de 21,3% nos Caucasianos e de 10,8% nos Afro-Americanos (CAKIR et al., 2002). Entre os 18 indivíduos deste estudo fenotipados como Lewis negativo, Le(a-b-), somente 10 (55,6%) indivíduos possuem genótipos que realmente determinam a incapacidade funcional da enzima, 16 (88,9%) são portadores de duas ou mais, das quatro mutações no gene *FUT3*, pesquisadas neste estudo, 1 (5,6%) é portador de apenas uma mutação e 1 (5,6%) não apresenta nenhuma das quatro mutações. Esses resultados demonstram a necessidade da análise genotípica e não apenas fenotípica do sistema Lewis.

Os genótipos obtidos a partir dos quatro pontos de polimorfismos do gene *FUT3* foram agrupados e, dessa forma, houve uma associação estatisticamente significativa entre os genótipos relacionados à perda funcional da enzima Lewis (Lewis negativo) e as pacientes com câncer de mama. Os estudos de correlação com polimorfismos de genes dos grupos sanguíneos e tumores são escassos e em um estudo realizado na China, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa na incidência de câncer de estômago com a mutação T59G do gene *FUT3* (JIANG et al., 2003a).

A enzima secretora codificada pelo gene *FUT2* tem a função de fucosilar em ligação  $\alpha(1,2)$  o precursor tipo 1 e formar o antígeno H tipo 1, o qual pode ser utilizado pelas glicosiltransferases A, B e Lewis, se presente. O sistema secretor controla a formação de substância H (a qual pode ser modificada em substâncias A e/ou B) encontrada nas secreções corporais, tais como saliva, fluido seminal (HENRY, 1996). A

mutação sem sentido G428A é a principal mutação causadora da inativação da enzima secretora, produzindo um alelo não-secretor em indivíduos caucasianos (europeus e iranianos) e africanos, enquanto a mutação de sentido trocado A385T está incluída como a mutação mais comum causadora da produção de uma enzima deficiente na população asiática (LIU et al., 1998b; KODA et al., 1996; KELLY et al., 1995). A frequência da mutação G428A neste estudo foi de 73,7% para as pacientes portadoras de câncer de mama e de 71,8% entre as mulheres do grupo controle. Os valores são maiores do que os encontrados por VESTERGAARD et al (1999) com 63,3% na população Dinamarquesa e por LIU et al (1998b) numa população africana e semelhante a encontrada por PROCTER et al (1997). Neste estudo, em quase todos os indivíduos fenotipados como não-secretores - Le(a+b-) – exceto por 1 indivíduo, a mutação G428A foi encontrada em homozigose. Como ainda não há outros estudos publicados sobre o polimorfismo do gene *FUT2* na população brasileira, com esses resultados pode-se demonstrar que esta mutação é a principal responsável pelo fenótipo não-secretor na população central do Estado de São Paulo.

Estudos de associação de doenças com os grupos sanguíneos envolvem uma área complexa, com muitas controvérsias. Muitos dos problemas são causados pela inadequada confiabilidade da fenotipagem do grupo sanguíneo Lewis em portadores de patologias. Os estudos de associação devem também além de considerar os parâmetros fenotípicos dos três grupos - ABO, Lewis e secretor - incluir os estudos genotípicos (HENRY, 1996).

## ***7. Conclusões***

- A verificação de genótipos do grupo sanguíneo ABO demonstrou que os genótipos mais comuns nas pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo foram  $O^1O^1$ ,  $AO^1$  e  $BO^1$  e nas mulheres doadoras de sangue (grupo controle) foram  $O^1O^1$ ,  $AO^1$  e A., Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos e também não houve diferença significativa quando este grupo sanguíneo foi comparado com as características clinicopatológicas dos tumores;
- A verificação das mutações T59G, T1067A, T202C e C314T no gene *FUT3* demonstrou que a maioria dos indivíduos com fenótipo Le(a-b-) apresentaram uma ou mais destas mutações. Entretanto nem todos os indivíduos fenotipados como Lewis negativo apresentaram estas mutações, sendo necessária a pesquisa do genótipo e não apenas do fenótipo para a avaliação do sistema Lewis;
- Das quatro mutações estudadas no gene *FUT3*, as mais frequentes tanto nas mulheres portadoras de CADI como nas mulheres doadoras de sangue foram T202C e C314T, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando as mutações foram avaliadas separadamente. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos quando as quatro mutações foram avaliadas em conjunto, com uma proporção maior de genótipos Lewis negativo para as pacientes portadoras de CADI. Além disso, não houve diferença significativa na comparação entre este grupo sanguíneo e as características clinicopatológicas dos tumores

- A mutação G428A do gene *FUT2* foi muito freqüente na população estudada e determinada em homozigose na maioria dos indivíduos fenotipados como não-secretores. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as mulheres portadoras de CADI e as doadoras de sangue para essa mutação. Entretanto, houve diferença significativa para esta mutação quando relacionada a presença de metástase em linfonodos, sendo que tumores com comprometimento em linfonodos axilares estariam mais associados ao genótipo não secretor.

## *8. Referências Bibliográficas*

ABDEL-RAHMAN, S.Z. Isolation of DNA using salting-out procedure. **J. Biochem. Toxicol.**, v.9, p.191-198, 1994.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no cancer da mama feminine. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.48, n.1, p. 113-131, 2002.

ADAMIAN R.T. Blood-type and rhesus distribution in Armenian women with endometrial carcinoma. **Vopr. Onkol.**, v.51, p.575-576, 2005.

AUBERT M., PANICOT, L.; CROTTE, C.; GIBIER, P.; LOMBARDO, D.; SADOULET, M.O.; MAS, E. Restoration of alpha(1,2) fucosyltransferase activity decreases adhesive and metastatic properties of human pancreatic cancer cells. **Cancer Res**, v.60, p.1449-1456, 2000.

BARJAS-CASTRO, M.L.; CARVALHO, M.H. LOCATELLI, M.F.; BORDIN, S.; SAAD, S.T.O. Molecular heterogeneity of the A3 subgroup. **Clin. Lab. Haem.** v.22, p. 73-78, 2000.

BERSTEIN, J.L.; LÓPEZ-CARRILLO, L.; WANG, L. The epidemiology of Her-2/neu and p53 in breast cancer. **Rev. Salud Pública México**, v.41, suppl.2, p.s114-s123, Gwenvaca. Nov.1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Diagnóstico histopatológico e citopatológico das lesões da mama**. Rio de Janeiro: Conprev, 2002, 80 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Câncer de mama**. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancer/mama/>. Acessado em 01/03/07.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Câncer de mama**. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancer/mama/>. Acessado em 10/06/05.

BRYNE, M.; EIDE, G.E.; LILLEN, R.; LANGMARK, F.; THRANE, P.S.; DABELSTEEN, E. A multivariate study of the prognosis of oral squamous cell carcinoma. Are blood group and hemoglobin new prognostic factors? **Cancer**, v.68, p.1994-1998, 1991.

CAKIR, B.; PANKOW, J.S.; SALOMAA, V.; COUPER, D.; MORRIS, T.L.; BRANTLEY, K.R.; HILLER, K.M.; HEISS, G.; WESTON, B.W. Distribution of *Lewis* (*FUT3*) genotype and allele: frequencies in a biethnic United States population. **Ann. Hematol.**, v.81, p.558-565, 2002.

CAMPBELL, I.G.; BAXTER, S.W.; ECCLES, D.M.; CHOONG, D.Y. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v.4, p.R14, 2002.

CESCHI, M.; SUN, C.L.; VAN DEN BERG, D.; KOH, W.P.; YU, M.C.; PROBST-HENSCH, N. The effect of cyclin D1 (CCND1) G870A-polymorphism on breast cancer risk is modified by oxidative stress among Chinese women in Singapore. **Carcinogenesis**, v.26, p.1457-1464, 2005.

CHANG, C.; LIN, S.; LEE, J.; CHANG, J.; LIU, T.; HUANG, S.; CHEN, T.; LIU, H. Application of ABO genotyping using polymerase chain reaction method to assess engraftment in bone marrow transplantation - a case report. **Kaohsiung J. Med. Sci.**, v.11, p.574-577, 1995.

CHANG, J.; LEE, L.; CHEN, P. Rapid genotyping of the ABO blood group. **Blood**, v.79, p.3176-7, 1992.

CHENG, T.C.; CHEN, S.T.; HUANG, C.S.; FU, Y.P.; YU, J.C.; CHENG, C.W.; WU, P.E.; SHEN, C.Y. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the catechol estrogen-metabolizing genes: a multigenic study on cancer susceptibility. **Int. J. Cancer**, v.113, p.345-353, 2005.

CHOU, Y.C.; WU, M.H.; YU, J.C.; LEE, M.S.; YANG, T.; SHIH, H.L.; WU, T.Y.; SUN, C.A. Genetic polymorphisms of the methylene tetrahydrofolate reductase gene,

plasma folate levels and breast cancer susceptibility: a case-control study in Taiwan. **Carcinogenesis**, v.27, p.2295-2300, 2006.

COOLING, L.; GU, Y. Identification of two new single-nucleotide polymorphisms in *FUT3* associated with the Lewis-null phenotype. **Transfusion**, v.43, p.1760-1761, 2003.

CROUSE, C.; VINCEK, V. Identification of ABO alleles on forensic type specimens using rapid ABO genotyping. **Biotechnics**, v.18, p.478-82, 1995.

DABELSTEEN, E.; GAO, S. ABO blood-group antigens in oral cancer. **J. Dent. Res.**, v.84, p.21-28, 2005.

D'ADAMO, P.J.; KELLY, G.S. Metabolic and immunologic consequences of ABH secretor and Lewis subtype status. **Altern. Med. Rev.**, v.6, p.390-405, 2001.

DRESLER, C.M.; RITTER, J.H.; WICK, M.R. ROPER, C.L.; PATTERSON, G.A.; COOPER, J.D. Immunostains for blood group antigens lack prognostic significance in T1 lung carcinoma. **Ann. Thorac. Surg.**, v.59, p.1069-1073, 1995.

EGAN, K.M.; CAI, Q.; SHU, X.O.; JIN, F.; ZHU, T.L.; DAI, Q.; GAO, Y.T.; ZHENG, W. polymorphisms in *GSTM1*, *GSTP1*, and *GSTT1* and the risk for breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study and meta-analysis. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.13, p.197-204, 2004.

ELMGREN, A.; BÖRJESON, C.; SVERSSON, L.; RYDBERG, L.; LARSON, G. DNA sequencing and screening for point mutations in the human Lewis (*FUT3*) gene enables the molecular genotyping of the human Lewis blood group system. **Vox Sang.**, v.70, p.90-103, 1996.

ELMGREN, A.; MOLLICONE, R.; COSTACHE, M.; BORJESON, C.; ORIOL, R.; HARRINGTON, J.; LARSON, G. Significance of individual point mutations, T202C and C314T, in the human Lewis (*FUT3*) gene for expression of Lewis antigens by the human  $\alpha(1,3/1,4)$ -fucosyltransferase, Fuc-TIII. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.21994-21998, 1997.

ELMGREN, A.; RYDBERG, L.; LARSON, G. Genotypic heterogeneity among Lewis negative individuals. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.196, p.515-520, 1993.

ERNEST, C.; ATKINSON, B.; WYSOCKA, M.; BLASZCZYK, M.; HERLYN, M.; SEARS, H.; STEPLEWSKY, Z.; KOPROWSKY, H. Monoclonal antibody localization of Lewis antigens in fixed tissue. **Lab. Invest.**, v.50, p.394-400, 1984.

FERRINI, F.S., ROSSI, M.A.; MOURÃO NETO, M.; SOARES, F.A. Schirrous invasive ductal carcinoma of the breast overexpress p53 oncoprotein. **São Paulo Med. J.**, v.119, n.1, p. 04-06, São Paulo. Jan.2001.

FRANEKOVA, M.; ZUBOR, P.; STANCLOVA, A.; DUSSA, C.A.; BOHUSOVA, T.; GALO, S.; DOBROTA, D.; KAJO, K.; PEC, M.; RACAY, P. Association of p53 polymorphisms with breast cancer: a case-control study in Slovak population. **Neoplasma**, v.54, p.155-161, 2007.

GARRISON, R.J.; HAVLIK, R.J.; HARRIS, R.B.; FEINLEIB, M.; KANNEL, W.B.; PADGETT, S.J. ABO blood group and cardiovascular disease: the Framingham study. **Atherosclerosis**, v.25, p.311-318, 1976.

GRAHN, A.; ELMGREN, A.; ABERG, L.; SVENSSON, L.; JANSSON, P.-A.; LÖNNROTH, P.; LARSON, G. Determination of Lewis *FUT3* gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. **Hum. Mutat.**, v.18, p.358-359, 2001.

GRENE, F.L.; PAGE, D.; MORROW, M.; BALCH, C.; HALLER, D.; FRITZ, A.; FLEMING, I.; eds. **AJCC Cancer Staging Manual** 6th ed. New York: Springer; 2002.

GRUNNET, N.; STEFFELSON, R.; BENNETT, E. P.; CLAUSEN, H. Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a danish population: frequency of a novel O allele defined as O<sup>2</sup>. **Vox Sang.**, v. 67, p.210-215, 1994.

HAKOMORI, S.I. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. **Cancer Res.**, v. 45, p.2405-2414, 1985.

HAKOMORI, S.I. Antigen and structure and genetic bases of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1473, p.247-266, 1999.

HAKOMORI, S.I. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.*, v.56, p.5309-5318, 1996.

HAMMER, L.; MANSSON, S.; ROHR, T.; CHESTER, M.A.; GINSBURG, V.; LUNDBLAD, A.; ZOPF, D. Lewis-phenotype of erythrocytes and Leb active glycolipid in serum of pregnant women. *Vox sang.*, v.40, p.27-33, 1981.

HANBY, A.M The pathology of breast cancer and the role of the histopathology laboratory. *Clinical Oncology*, 2005, In Press.

HANKINSON, S.E.; STAMPFER. M.J. Estrogens and breast cancer. *Rev. Salud Pública Méx.*, v. 39, n. 4, p.370-378, 1997.

HANSEN, T.; NAMORK, E.; OLSSON, M.L.; CHESSER, M.A. HEIER, H.I. Different genotypes causing indiscernible patterns of A expression Ael red blood cells as visualized by scanning immunogold electron microscopy. *Vox. Sang.*, v., 1998.

HENRY, S.; MOLLICONE, R.; FERNANDEZ, P.; SAMUELSSON, B.; ORIOL, R.; LARSON, G. Homozygous expression of a missense mutation at nucleotide 685 in the *FUT2* gene associates with the Le(a+b+) partial-secretor phenotype in an Indonesian family. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v.219, p.675-678, 1996.

INAI, K., YAMAMOTO, A.; ARIHIRO, K.; KHATUN, N.; KURIHARA, K.; TAKEDA, S. Epithelial hyperplasia of the breast. Comparison of incidence between cases of breast carcinoma and control autopsy specimens with immunohistochemical observation of blood group antigens. *Acta Pathol. Jpn.*, v.42, p.193-200, 1992.

JARVIS, E. M.; KIRK, J. A.; CLARKE C, L, Loss of nuclear BRCA1 expression in breast cancers is associated with a highly proliferative tumor phenotype. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 101, p.109-115, 1998

JESCHKE, U.; MYLONAS, I.; SHABANI, N.; KUNERT-KEIL, C.; SCHINDLBECK, C.; GERBER, B.; FRIESE, K. Expression of sialyl Lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis. **Anticancer Res.**, v.25, p.1615-22, 2005.

JIANG, J.M.; PAN, K.F.; MA, J.L.; NING, T.; LU, G.R.; YOU, W.C.; KE, Y. Analysis of Lewis gene polymorphism in high and low incidence area of gastric cancer in Shandong province. **Yi Chuan.** V.25, p.258-260, 2003a.

JIANG, J.M.; PAN, K.F.; MA, J.L.; NING, T.; LU, G.R.; YOU, W.C.; KE, Y. Analysis of polymorphisms on Lewis blood group antigen related *Se* gene in the populations in Shandong with high-risk of gastric cancer and Beijing. **Yi Chuan**, v.25, p.261-266, 2003b.

JOHNSON, P. H.; HOPKINSON, D. A. Detection of ABO blood group polymorphism by denaturing gradient gel electrophoresis. **Hum. Mol. Genet.**, v.1, p.341-344, 1992.

KELLY, R.J.; ROUQUYER, S.; GIORGI, D.; LENNON, G.G.; LOWE, J.B. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group  $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene (*FUT2*). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the nonsecretor phenotype. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.4640-4649, 1995.

KENEMANS, P.; BOSMAN, A. Breast cancer and post-menopausal hormone therapy. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Met.**, v. 17, n.1, p.123-137, 2003.

KODA, Y.; KIMURA, H; MEKADA, E. Analysis of Lewis fucosyltransferase genes from the human gastric mucosa of Lewis-positive and -negative individuals. **Blood**, v.82, p.2915-2919, 1993.

KODA, Y.; SOEJIMA, M.; JOHNSON, P.H.; SMART, E.; KIMURA, H. An *Alu*-mediated large deletion of the *FUT2* gene in individuals with the ABO-Bombay phenotype. **Hum. Genet.**, v.106, p.80-85, 2000.

KODA, Y.; SOEJIMA, M.; KIMURA, H. The polymorphisms of fucosyltransferases. **Leg. Med.**, v.3, p.02-14, 2001.

KODA, Y.; SOEJIMA, M.; LIU, Y-H.; KIMURA, H. Molecular basis for secretor type  $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene deficiency in a Japanese population: a fusion gene generated by unequal crossover responsible for the enzyme deficiency. **Am. J. Hum. Genet.**, v.59, p.343-350, 1996.

KODA, Y.; SOEJIMA, M.; WANG, B-J; KIMURA, H. Structure and expression of the gene encoding secretor-type galactoside 2- $\alpha$ -L-fucosyltransferase (*FUT2*). **Eur. J. Biochem.**, v.246, p.750-755, 1997.

KOIFMAN, R.J; KOIFMAN, S; VIEIRA, R.J.S. Familial aggregation of breast/ovarian cancer: age of onset along subsequent generations in Brazil. **Cad. Saude Publica**, v.14, p. 181-185, 1998.

KUKOWSKA-LATALLO, J.F.; LARSEN, R.D.; NAIR, R.P.; LOWE, J.B. A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group  $\alpha(1,3/1,4)$ -fucosyltransferase. **Genes Dev.**, v.4, p.1288-1303, 1990.

KURBEL, S. Selective reduction of estrogen receptor (ER) positive breast occurrence by estrogen receptor modulators supports etiological distinction between ER positive and ER negative breast cancers. **Med. Hypotheses**, v.64, p. 1182-1187, 2005.

LAMEY, P-J.; DOUGLAS, P.S.; NAPIER, S.S. Secretor status and oral cancer. **Br. J. Oral Maxil. Surg.**, v.32, p.214-217, 1994.

LE PENDU, J.; MARIONNEAU, S.; CAILLEAU-THOMAS, A.; ROCHER, J.; LE MOULLAC-VAIDYE, B.; CLÉMENT, M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. **APMIS**, v.109, p.9-31, 2001.

LEE, A.H.; REID, M.E. ABO blood group system: a review of molecular aspects. **Immunohematol.**, v.16, p.01-06, 2000.

LEE, J. C.; CHANG, J. G. ABO genotyping by polymerase chain reaction, **J. Foren. Sci.**, v.37, p.1269-1275, 1992.

LIECHTI-GALLATI, S.; NEESER, D. Efficient and reliable PCR based detection of the ABO blood group alleles: genotyping on stamps and others biological evidence samples. **J. Forens. Sci.**, v.41, p.653-57, 1996.

LIU, T.C.; CHANG, J.G.; LIN, S.F.; CHANG, W.C.; YANG, T.Y.; LIN, C.L.; WANG, N.M.; TSAI, C.H. Lewis (FUT3) genotypes in Taiwanese, Thai and Filipino populations. **Ann. Hematol.**, v.79, p.599-603, 2000.

LIU, Y.; KODA, Y.; SOEJIMA, M.; PANG, H.; SCHLAPHOFF, T.; DU TOIT, E.; KIMURA, H. Extensive polymorphism of the *FUT2* gene in an African (Xhosa) population of South Africa. **Hum. Genet.**, v.103, p.204-210, 1998b.

LIU, Y-H.; FUJITANI, N.; KODA, Y.; KIMURA, H. Distribution of H type 1 and of H type 2 antigens of ABO blood group in different cells on human submandibular gland. **J. Histochem. Cytochem.**, v.46, p.69-76, 1998a.

LIU, Y-H.; KODA, Y.; SOEJIMA, M.; PANG, H.; WANG, B.J.; KIMURA, H. Lewis (*FUT3*) genotypes in two different Chinese populations. **J. Forensic Sci.**, v.44, p.82-86, 1999.

LIU, Y-H.; KODA, Y.; SOEJIMA, M.; UCHIDA, N.; KIMURA, H. PCR analysis of Lewis-negative gene mutations and the distribution of Lewis alleles in a Japanese population. **J. Forensic Sci.**, v.41, p.1018-1021, 1996.

LO, Y.L.; YU, J.C.; CHEN, S.T.; YANG, H.C.; FANN, C.S.; MAU, Y.C.; SHEN, C.Y. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the mitosis-regulating gene Aurora-A/STK15/BTAK. **Int. J. Cancer**, v.115, p.276-283, 2005.

LUKKAINEN, T. Issues to debate on the Women's Health Initiative study failure of estrogen plus progestin therapy for prevention of breast cancer risk. **European Society of Human Reproduction and Embryology**, v.18, n.8, p.1559-1563, 2003.

MACKENZIE, I.C.; DABELSTEEN, E.; RITTMAN, G.; JUNGREN, L.; TOH, H. Expression of blood group-related glycoconjugates in the junctional and other oral epithelia of rodents. **Anat. Rec.**, v.241, p.310-318, 1995.

MADJD, Z.; PARSONS, T.; WATSON, N.F.; SPENDLOVE, I.; ELLIS, I.; DURRANT, L.G. High expression of Lewis y/b antigens associated with decrease survival in lymph node negative breast carcinomas. **Breast Cancer Res.**, v.7, p.780-7, 2005.

MAGGARD, M.A.; O'CONNELL, J.B.; LANE, K.E.; LIU, J.H.; ETZIONI, D.A.; KO, C.Y. Do young breast cancer patients have worse outcomes? **J. Surg. Res.**, v.113, p.109-113, 2003.

MARIANO, A.; DI CARLO, A.; SANTONASTASO, C.; OLIVA, A.; D'ARMIENTO, M.; MACCHIA, V. Expression of Lewis carbohydrate antigens and chromogranin A in human prostatic cancer. **Int. J. Oncol.**, v.17, p.167-171, 2000.

MARIONNEAU, S.; CAILLEAU-THOMAS, A.; ROCHER, J.; MOULLAC-VAIDYE, B.; RUVOËN, N.; CLÉMENT, M.; LE PENDU, J. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. **Biochimie**, v.83, p.565-573, 2001.

MARIONNEAU, S.; MOULLAC-VAIDYE, B.; LE PENDU, J. Expression of histo-blood group A antigen increases resistance to apoptosis and facilitates escape from immune control of rat colon carcinoma cells. **Glycobiol.**, v.12, p.851-856, 2002.

MATERSSON, S.; BIGLER, S.A.; BROWN, M.; LANGE, P.H.; BRAWER, M.K.; HAKOMORI, S. Sialyl-Lewis(x) and related carbohydrate antigens in the prostate. **Hum. Pathol.**, v.26, p.735-739, 1995.

MATTOS, L.C.; CINTRA, J.R.; SANCHES, F.E.; SILVA, R.C.M.A.; RUIZ, M.A.; MOREIRA, H.W. ABO, Lewis, secretor and non-secretor phenotypes in patients infected or uninfected by the *Helicobacter pylori* bacillus. **São Paulo Med. J.**, v.120, p. 55-58, 2002.

MATTOS, L.C.; SANCHEZ, F.E.; CINTRA, J.R.; SALLES, A.C.F.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; MOREIRA, H.W. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.23, p.15-22, 2001.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutat. Res.**, v.544, p.9-41, 2003.

MOLDVAY, J.; SCHEID, P.; WILD, P.; NABIL, K.; SIAT, J.; BORRELLY, J.; MARIE, B.; FARRE, G.; LABIB, T.; POTTIER, G.; SESBOUE, R.; BRONNER, C.; VIGNAUD, J.M.; MARTINET, Y.; MARTINET, N. Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v.6, p.1125-1234, 2000.

MOLLICONE, R.; REGUIGNE, I.; KELLY, R.J. et al. Molecular basis for Lewis  $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase gene deficiency (*FUT3*) found in Lewis-negative Indonesian pedigrees. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.20987-20994, 1994.

MOURANT, A.E.; KOPEC, A.C.; DOMANIEWSKA-SOBCZAK, K. **Blood groups and diseases: A study of associations of diseases with blood groups and other polymorphisms.** Oxford University Press, Oxford, 1978.

MOURÃO NETO, M.; LOGUELO, A F.; NONOGAKI, S.; BOENTAMI, R.R.; BRENTANI, M.M Expression of cerbB-2, p53 and c-myc proteins in male breast

carcinoma. Comparison with traditional prognóstico factores and survival. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, p. 887-894, 2001.

NAKAGOE, T.; FUKUSHIMA, K.; HIROTA, M.; KUSANO, H.; KAWAHARA, K.; AYABE, H. et al. Immunohistochemical expresión of blood group substances and related carbohydrate antigens in breast carcinoma. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.82, p.559-568, 1991.

NAKAGOE, T.; FUKUSHIMA, K.; ITOYANAGI, N.; IKUTA, Y.; OKA, T.; NAGAYASU, T.; AYABE, H.; HARA, S.; ISHIKAWA, H.; MINAMI, H. Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.128, p.257-264, 2002.

NAKAGOE, T.; FUKUSHIMA, K.; TUJI, T.; SAWAI, T.; NANASHIMA, A., YAMAGUCHI, H. YASUTAKE, T.; HARA, S.; AYABE, H.; MATUO, T.; KAMIHIRA, S. Immunohistochemical expression of ABH/Lewis-related antigens in primary breast carcinomas and metastatic lymph node lesions. **Cancer Detect. Prev.**, v.22, p.499-505, 1998.

NISHIHARA, S.; HIRAGA, T.; IKEHARA, Y.; IWASAKI, H.; KUDO, T.; YAZAWA, S.; MOROZUMI, K.; SUDA, Y.; NARIMATSU, H. Molecular behavior of mutant Lewis enzymes *in vivo*. **Glycobiology**, v.9, p.373-382, 1999.

NISHIHARA, S.; NARIMATSU, H.; IWASAKI, H.; YAZAWA, S.; AKAMATSU, S.; ANDO, T.; SENO, T.; NARIMATSU, I. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.29271-29278, 1994.

NISHIHARA, S.; YAZAWA, S.; IWASAKI, H.; NAKAZATO, N.; KUDO, T.; ANDO, T.; NARIMATSU, H.  $\alpha(1,3/1,4)$ Fucosyltransferase (FucT-III) gene is inactivated by a single amino acid substitution in Lewis histo-blood type negative individuals. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v.196, p.624-631, 1993.

NOVARETTI, M.C.Z.; DORLHIAC-LLACER, P.E.; CHAMONE, D.A.F. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.22, p.23-32, 2000.

NOZOE, T.; EZAKI, T.; BABA, H.; KAKEJI, Y.; MAEHARA, Y. Correlation of ABO blood group with clinicopathologic characteristics of patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Diseases of the Esophagus**, v.17, p.146-149, 2004.

OLSSON, M.L.; CHESSER, M.A. Evidence for a new type of O allele at the ABO locus, due to a combination of the A2 nucleotide deletion and the Ael nucleotide insertion. **Vox Sang**, v.71, p.113-117, 1996.

OLSSON, M.L.; CHESTER, M.A. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O2 versus A/O2 discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. **Vox Sang**, v.69, p.242-247, 1995.

OLSSON, M.L.; CHESTER, M.A. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. **Transf. Med.**, v.11, p.295-313, 2001.

ORNTOFT, T.F.; HOLMES, H.; JOHNSON, J.; HAKOMORI, S.; CLAUSEN, H. Differential tissue expression of the Lewis blood antigens: enzymatic, immunohistologic and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen expression in Le(a-b-) individuals. **Blood**, v.77, p.1389-1396, 1991.

PAIVA, C.E.; RIBEIRO, B.S.;GODINHO, A.A.; MEIRELLES, R.S. P; SILVA, E.V.G.; MARQUES, G.D'A.; ROSSINI JÚNIOR,O. Fatores de risco para câncer de mama em Juiz de Fora (MG): um estudo caso-controle .**Rev. Brasileira de Cancerologia**, v.48, n.2, 2002, p.231-237.

PANG, H.; KODA, Y.; SOEJIMA, M.; KIMURA, H. Significance of each of three missense mutation, G484A, G667A and G808A, present in an inactive allele of the human Lewis gene (*FUT3*)  $\alpha(1,3/1,4)$ -fucosyltransferase inactivation. **Glycoconjugate J.**, v.15, p.961-967, 1998a.

PANG, H.; LIU, Y-H.; KODA, Y.; SOEJIMA, M.; JIA, J.T.; SCHLAPHOFF, T.; du TOIT, E.D.; KIMURA, H. Five novel mutations of Lewis gene (*FUT3*) in African (Xhosa) and Caucasian populations in South Africa. **Hum. Genet.**, v.102, p.675-680, 1998b.

PENG, C-T; TSAI, C-H; LIN, T-P; PENG, L-I; KAO, M-C; YANG, T-Y; WANG, N-M; LIU T-C; LIN, S-F; CHANG, J-G. Molecular characterization of secretor type  $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene deficiency in the Philippine population. **Ann Hematol.**, v.78, p.463-467, 1999.

PLATET, N.; CATHIARD, A. M.; GLEIZES, M.; GARCIA, M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. **Crit. Rev. Oncol./ Hematol.**, v. 51, p. 55-67, 2004.

PROCTER, J.; CRAWFORD, J.; BUNCE, M.; WELSH, K.I. A rapid molecular method (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) to genotype for ABO blood group and secretor status and its potential for organ transplants. **Tissue Antigens**, v.50, p.475-483, 1997.

RAVN, V.; DABELSTEEN, E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. **APMIS**, v.108, p.108-128, 2000.

ROUQUIER, S.; LOWE, J.B.; KELLY, R.J.; FERTITTA, A.L.; LENNON, G.G.; GIORGI, D. Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group  $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human secretor blood group locus. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.4632-4639, 1995.

SALMON, C.; CARTRON, J. P.; ROUGER, P. **The human blood groups**. Chicago: Year Book Medical Publishers. INC, 1984, 460p.

SALOMAA, V.; PANKOW, J.; HEISS, G.; CAKIR, B.; ECKFELDT, J.H.; ELLISON, R.C.; MYERS, R.H.; HILLER, K.M.; BRANTLEY, K.R.; MORRIS, T.L.; WESTON, B.W. Genetic background of Lewis-negative blood group phenotype and its association

with atherosclerotic disease in the NHLBI Family Heart Study. **J. Intern Med.**, v.247, p.689-698, 2000.

SERPA, J.; ALMEIDA, R.; OLIVEIRA, C.; SILVA, F.S.; SILVA, E.; REIS, C.; LE PENDU, J.; OLIVEIRA, G.; RIBEIRO, L.M.C.; DAVID, L. Lewis enzyme ( $\alpha$ 1-3/4 fucosyltransferase) polymorphisms do not explain the Lewis phenotype in the gastric mucosa of a Portuguese population. **J. Hum. Genet.**, v.48, p.183-189, 2003.

SHU, X.O.; MOORE, D.B.; CAI, Q.; CHENG, J.; WEN, W.; PIERCE, L.; CAI, H.; GAO, Y.T.; ZHENG, W. Association of cyclin D1 genotype with breast cancer risk and survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, v.14, p.91-97, 2005.

SIDONI, A.; CAVALIERE, A.; BELLEZA, G.; SCHEIBEL, M.; BUCCIARELLI, E. Breast cancer in young women: clinicopathological features and biological specificity. **The Breast**, v.12, p.247-250, 2003.

SILVA, D. M.; SADDI, V.A MOMOTUK, E.G. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. **Rev. Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n.1, p.39-48, 2002.

SKOVLUND, V.R. ABH and related histo-blood group antigens in normal & malignant human endometrium in relation to genetic and hormonal factors. **APMIS**, v.69(Suppl), p.1-33, 1997.

SOEJIMA, M.; KIMURA, H.; KODA, Y. Two novel *FUT3* alleles responsible for Lewis-null phenotypes in SriLanka. **Transfusion**, v.44, p.1534-1535, 2004.

SOEJIMA, M.; KODA, Y. Molecular mechanisms of Lewis antigen expresión. **Legal Med.**, v.7, p.266-269, 2005.

SOUTO, J.C.; ALMASY, L.; MUNIZ-DIAZ, E.; SORIA, J.M.; BORELL, M.; BAYEN, L.; MATEO, J.; MADOZ, P.; STONE, W.; BLANGERO, J. FONTEUBERTA, J. Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma

levels of von Willebrand factor, factor VIII and activated partial thromboplastin time. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v.20, p.2024-2028, 2000.

STIGENDAL, L.; OLSSON, R.; RYDBERG, L.; SAMUELSSON, B.E. Blood group Lewis phenotype on erythrocytes and in saliva in alcoholic pancreatitis and chronic liver disease. **J. Clin. Pathol.**, v.37, p. 778-786, 1984.

SU, M.; LU, S-M.; TIAN, D.-P.; ZHAO, H.; XIAO-YUNLI; LI, D.-R.; ZHENG, Z.-C. Relationship between ABO blood groups and carcinoma of esophagus and cardia in Chaoshan onhabitants of China. **World J. Gastroenterol.**, v.7, p.657-661, 2001.

TAKASHIMA, T.; ONODO, N.; ISHIKAWA, T; AGAWA, Y.; KATO, Y.; FUJIMOTO, Y; SAWA, M.; HIRAKAWA. Prognostic value of combined analysis of estrogen receptor status and cellular proliferative activity in breast cancer patients with extensive lymph node metastases. **Oncology Reports**, v.9, p. 589-594, 2002.

TAVASSOLI, F. A. **Pathology of the breast**. Norwalk: Appleton & Lange. 1992, p. 25-53, 293-307.

TERRY, M.B.; GAMMON, M.D.; ZHANG, F.F.; ENG, S.M.; SAGIV, S.K.; PAYKIN, A.B.; WANG Q, HAYES, S.; TEITELBAUM, S.L.; NEUGUT, A.I.; SANTELLA, R.M. Polymorphism in the DNA repair gene XPD, polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.13, p.2053-2058, 2004.

TESSARO, S.; BÉRIA, J.U.; TOMASI, E.; BARROS, A.A.J.D. Contraceptivos orais e câncer de mama: estudo de casos e controles. **Rev. Saúde Pública**, v. 35, n.1, p. 32-38, 2001.

TURSEN, U.; TIFTIK, E.N.; UNAL, S.; GUNDUZ, O.; KAYA, T.I.; CAMDEVIREN, H.; IKIZOGLU, G. Relationship between ABO blood groups and skin cancers. **Dermatol. Online J.**, v.11, p.44, 2005.

URA, Y.; DION, A., WILLIAMS, C.; OLSEN, B.; REDFIELD, E.; ISHIDA, M.; HERLYN, M.; MAJOR, P.P. Quantitative dot blot analyses of blood-group-related antigens in paired normal and malignant human breast tissues. **Int. J. Cancer**, v.50, p.57-63, 1992.

VAN DE VIJVER, M. Genetic alterations in breast cancer. **Curr. Diagn. Pathol.**, v. 6, p.271-281, 2000.

VESTERGAARD, E.M.; HEIN, H.O.; MEYER, H.; GRUNNET, N.; JOTGENSEN, J.; WOLF, H.; ORNTOFT, T.F. Reference values and biological variation for tumor marker CA 19-9 in serum for different Lewis and secretor genotypes and evaluation of secretor and Lewis genotyping in a Caucasian population. **Clin. Chem.**, v.45, p.54-61, 1999.

VIDAS, I.; DELAJLIJA, M.; TEMMER-VUKSAN, B.; STIPETIC-MRAVAK, M.; CINDRIC, N.; MARICIC, D. Examining the secretor status in the saliva of patients with oral pre-cancerous lesions. **J. Oral Rehab.**, v.26, p.177-182, 1999.

VOGEL, F. ABO blood groups and disease. **Am. J. Hum. Genet.**, v.22, p.465-475, 1970.

VOWDEN, P.; LOWE, A.D.; LENNOX, E.S.; BLEEHEN, N.M. The expression of ABH and Y blood group antigens in benign and malignant breast tissue: the preservation of the H and Y antigens in malignant epithelium. **Br. J. Cancer**, v.53, p.313-319, 1986.

WATKINS, W.M. The ABO blood group system: historical background. **Transf. Med.**, v. 11, p.243-265, 2001.

WATKINS W.M. **Molecular basis of antigenic specificity in the ABO, H and Lewis blood group systems.** In: Montreuil J. Vliegenthart JFG, Schachter H, editors. Glycoproteins. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1995, p 313-390.

XIE, X.; BOYSEN, M.; CLAUSEN, O.P.; BRYNE, M.A. Prognostic value of Le(y) and H antigens in oral tongue carcinomas. **Laryngoscope**, v.109, p.1474-1480, 1999.

YAMAMOTO, F.; CLAUSEN, H.; WHITE, T.; MARKEN, J.; HAKOMORI, S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. **Nature**, v.345, p.229-233, 1990a.

YAMAMOTO, F.; MARKEN, J.; TSUJI, T.; WHITE, T.; CLAUSEN, H.; HAKOMORI, S. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAz:fuc-alpha 1-2Gal alpha 1-3GalNAc transferase (histo-blood group a transferase) mRNA. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.1146-1151, 1990b.

YAMAMOTO, F.; HAKOMORI, S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p.19257-19262, 1990.

YAMAMOTO, F.; McNEILL, P. D.; HAKOMORI, S. genomic organization of human histo-blood group ABO genes. **Glycobiology**, v.5, 1995.

YAMAMOTO, F.; McNEILL, P. D.; YAMAMOTO, M.; HAKOMORI, S.; HARRIS, T. Molecular genetic analyses of ABO blood group system: 3. Ax and B(A) alleles. **Vox Sang.** v.64, p.171-174, 1993.

YAZAWA, S.; NISHIHARA, S.; IWASAKI, H.; ASAO, T.; NAGAMACHI, Y.; NARIMATSU, H. Gentic and enzymatic evidence for Lewis enzyme expression in Lewis-negative cancer patients. **Cancer Res.**, v.55, p.1473-1478, 1995.

YAZAWA, S.; OH-KAWARA, H.; NAKAJIMA, T.; HOSOMI, O.; AKAMATSU, A.; KISHI, K. Histo-blood group Lewis genotyping from human hairs and blood. **Jpn. J. Human Genet.**, v.41, p.177-188, 1996.

YIP, S.P. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. **Blood**, v.95, p.1487-1492, 2000.

YU, L.; LEE-H-L; CHU, C.C.; BROADBERRY, R.E.; LIN, M. A newly identified nonsecretor allele of the human histo-blood group  $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene (*FUT2*). **Vox Sang.**, v.76, p.115-119, 1999

YU, L-C.; YANG, Y-H.; BROADBERRY, R.E.; CHEN, Y-H.; CHAN, Y-S.; LIN, M. Heterogeneity of the human blood group  $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase gene among para-Bombay individuals. **Vox Sang.**, v.72, p.36-40, 1997.

YU, L-C.; YANG, Y-H; BROADBERRY, R.E.; CHEN, Y-H.; CHAN, Y-S.; LIN, M. Correlation of a missense mutation in the human secretor  $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene with the Lewis(a+b+) phenotype: a potential molecular basis for the weak secretor allele ( $Se^w$ ). **Biochem. J.**, v.312, p.329-332, 1995.

## *9. Anexos*

DISTRIBUTION OF LEWIS (FUT3) PHENOTYPE AND GENOTYPE IN A  
BRASILIAN POPULATION

D.B. Teresa <sup>(a)</sup>, C.P. Soares \* <sup>(a)</sup>, L.C. de Mattos <sup>(b)</sup>, M. Giocondo <sup>(a)</sup>, A.A. Leite <sup>(a)</sup>; E.  
Leite <sup>(a)</sup>; H.W. Moreira <sup>(a)</sup>

(a) Department of Clinical Analysis, School Pharmaceutical Sciences, University of  
São Paulo State (UNESP), Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Zip code 14 801  
902, Araraquara, Sao Paulo, Brazil.

(b) Faculty of Medicine of São José do Rio Preto (FAMERP), Avenida Brigadeiro Faria  
Lima, 5416, São Pedro, Zip code 15090-000, São Jose do Rio Preto, São Paulo,  
Brazil

Author to whom correspondence must be sent:

C.P.Soares. Address: Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Zip code 14 801 902,  
Araraquara, São Paulo, Brazil. Phone 55 16 201 6554; fax 55 16 201 6547.

\* e-mail address:soarescp@hotmail.com, soarescp@fcar.unesp.br

## Abstract

The Lewis histo-blood group system comprises two major antigens, Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup>, whose determinants are composed of type 1 carbohydrate chains. The Le<sup>a</sup> antigen is synthesized from a type 1 precursor substrate by a *FUT3*-encoded  $\alpha(1,3/1,4)$  fucosyltransferase (Le enzyme), whereas the Le<sup>b</sup> antigen is synthesized from an H type 1 substrate by the enzyme. The cDNA encoding Lewis fucosyltransferase has been isolated, and 13 single bases substitutions have been identified in a number of different Le (a-b-) individuals – T59G, G508A, T1067A, T202C, C314T, C445T, G484A, G667A, G808A, G760A, G13A, G1022T and G47C. In this study, we have investigated the frequency of Lewis phenotype and the four mutations of the *FUT3* gene, T59G, T1067A, T202C e C314T, in blood donors at the city of Araraquara, Sao Paulo State by using a polymerase chain reaction/sequence-specific primers (PCR/SSP) method. One hundred and eighty-one healthy blood donors arriving to the blood bank were subjects of the study. The genotypes comprising the four common mutations (T59G, T1067A, T202C and C314T) and the most common genotype was the “all-wild” genotype (i.e., *WWWW*), which was found to be present in 45.9% (n=83) of participants. The others genotypes were *WWHH* (n=45, 24.9%), *HHWW* (n=20, 11.0%), *HWWW* (n=14, 7.7%), *WWMM* (n=7, 3.9%), *MMWW* (n=5, 2.8%), *HWHH* (n=2, 1.1%) and *MWWW*, *MHWW*, *WWHW*, *HHHW* and *HWHW* with 0.6% each (n=1). With regard to the molecular basis of phenotypes of Le (a-b+), 66 cases (54.6%) were “all-wild” genotype (*WWWW*), 44 (36.4%) were double heterozygotes (*HHWW* or *WWHH*), 1 (0.8%) was *WWHW* and 1 (0.8%) was *HHHW*. Concerning the phenotypes of Le (a+b-), the genotype most common was *WWWW* (n=12, 40.0%). Concerning the phenotypes of Le (a-b-), 14 cases (48.3%) were homozygous or double homozygotes for a mutant allele (*WWMM*, *MMWW*, *MWWW*, *MHWW*), 11 cases (37.9%) had at least a mutant heterozygote allele. The most

common mutation was at nucleotide position 202 with frequency of the 17.7% for *C* allele. The second most common mutant allele was *T* allele at nucleotide position 314 with 16.9%. In conclusion, our study indicated that at the Brazilian population of the Araraquara city the T202C and C314T mutations were the most frequent. These mutations were presented in 86.2% of the Le (a-b-) participants, though only 41.34% of the Lewis (a-b-) individuals produced genotypes Lewis-negative.

**Keywords:** *Lewis* gene, *FUT3* gene, PCR-SSP, polymorphism

## Introduction

The Lewis histo-blood group system comprises two major antigens, Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup>, whose determinants are composed of type 1 carbohydrate chains. In contrast to the other blood group antigens, the synthesis of Lewis antigens do not occur in erythroid tissues; rather they are secondarily acquired by the erythrocyte membranes from other glycolipids expressing endoderm-derived tissue(s) through the circulating soluble forms bound to lipoproteins (Watkins, 1995). The Le<sup>a</sup> antigen is synthesized from a type 1 precursor substrate by a *FUT3*-encoded  $\alpha(1,3/1,4)$  fucosyltransferase (Le enzyme), whereas the Le<sup>b</sup> antigen is synthesized from an H type 1 substrate by the enzyme. The gene *FUT2* encoded a  $\alpha(1,2)$  fucosyltransferase (Se enzyme) that synthesize H antigen mainly on the gastrointestinal epithelial cells and in body fluids such as saliva (Clausen & Hakomori 1989). Therefore, the Lewis system phenotypes are determined by both the Lewis (*FUT3*) and secretor (*FUT2*) loci and individuals lacking a functional *FUT3* allele are called 'Lewis negative' and are characterized by the red cell phenotype Le(a-b-). People with a 'Lewis positive' phenotype, either Le(a-b+) or Le(a+b-), possess at least one functional *FUT3* allele and are respectively secretors or non-secretors (Marionneau, 2001). A secretor has the ABH antigen in saliva and other body fluids and at least one functional allele *FUT2* while a non-secretor is homozygous for a allele nonfunctional and is characterized by the absence of ABH antigens in saliva and on various epithelial cell types (Watkins, 1995).

The Lewis antigens are not intrinsic to red blood cells, the typing of Lewis phenotypes is difficult and is sometimes misjudged because of weak hemagglutination as a result of the small numbers of the antigens on red cells, and low titers (Good 1992; Wang, 1994). Therefore, it is important and useful to determine the genotypes of the Lewis system.

The *FUT3* gene is polymorphic, located on chromosome 19 and codes for an  $\alpha(1,3/1,4)$  fucosyltransferase that is expressed in exocrine secretions (Kukowska-Latallo et al., 1990; Elmgren et al., 1993). The cDNA encoding Lewis fucosyltransferase has been isolated (Kukowska-Latallo et al., 1990), and 13 single bases substitutions have been identified in a number of different Le (a-b-) individuals – T59G, G508A, T1067A, T202C, C314T, C445T, G484A, G667A, G808A, G760A, G13A, G1022T and G47C (Elmgren et al., 1993; Koda et al., 1993; Liu et al., 1996; Liu et al., 1999; Pang et al., 1998; Elmgren et al., 1997; Cooling & Gu, 2003; Soejima et al., 2004). In addition, two silent base substitutions, C304A and T370G, were also observed in an African population (Pang et al., 1998). While the  $le^{202,314}$  allele is common in Caucasian Le(a-b-) individuals, these mutations are quite rare in Asian populations (Koda et al., 1993; Liu et al., 1996; Liu et al., 1999; Pang et al., 1998; Elmgren et al., 1997). On the hand, the G508A mutation (the  $le^{59,508}$ ), which is common in Asian populations, is rare in Caucasian populations (Liu et al., 1996; Elmgren et al., 1997). The G484A, G667A and G808A mutations are observed only in a African population (Pang et al., 1998). The mutations T59G and T1067A seem to be wide-spread, all over the world. They frequently occur as single mutations in Indonesia, whereas in Japan and Europe, they are almost always co-localized (Orntoft et al., 2004). In addition, the G47C mutation is likely to be specific for Sinhalese (Soejima et al., 2004).

Although several mutations of *FUT3* were found in different ethnic populations, there were no reports based on the genetic analysis of the *FUT3* gene in Brazilians. In this study, we have investigated the frequency of Lewis phenotype and the four mutations of the *FUT3* gene, T59G, T1067A, T2020C e C314T, in blood donors at the city of Araraquara, Sao Paulo State by using a polymerase chain reaction/sequence-specific primers (PCR/SSP) method.

## **Materials and Methods**

### ***Subjects and determination of Lewis blood phenotypes***

One hundred and eighty-one healthy blood donors arriving to the blood bank were subjects of the study. The study was approved by the Ethical Committee at the. Lewis hemagglutination assay was performed with micro typing system (DiaMed, Switzerland).

### ***DNA extraction***

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes as described previously and diluted in TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7,5) (Miller et al., 1988).

### ***PCR-SSP genotyping of FUT3 mutations***

The amplifications of the DNA were performed in 25uL of solution containing 1X Green Buffer (Promega-USA), 0,2mM each dNTP, 0.5µM each primer, 1,25U GoTaq™ DNA polymerase (Promega – USA) and 500ng genomic DNA. The cycling parameters were 96°C 60s; 5 cycles at 96°C 20s, 70°C 45s, 72°C 25s; 21 cycles at 96°C 25s, 65°C 50s, 72°C 30s; 4 cycles at 96°C 30s, 55°C 60s, 72°C 90s. The mutated FUT3 oligonucleotide primers had genotypically specific mutations on the penultimate or last nucleotide at the 3'-end, and a T<sub>m</sub> between 58°C-60°C (Granh et al., 2001). The human growth hormone (hGH) gene was used, as an internal control in each PCR amplification, with 5'-GCCTTCCCAACCATTCCTT-3' as sense primer and 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTG-3' as anti-sense primer (Procter et al, 1997). All primer-mixes included 0.5µM of each *hGH*-primer, which gave raise to a 428bp amplification product and an anti-sense primer (III-55as) with 5'-

TTCTGGAGGGGAGAGGCT-3' specific for the wild allele *FUT3* in the position 1212-1229. All PCR-amplification were run on 1% agarose gel (Promega – Madison, USA) in 0.5 mg/ml ethidium bromide for 30-50 minutes at 100V and visualized using UV illumination.

Table 1- The primer sequences and corresponding PCR product sizes. *UP* upstream; *DP* downstream.

| Mix | Allele  | Primer sequence <sup>a</sup>                              | Product size (bp) |
|-----|---------|---|-------------------|
| 1   | 59wt    | UP: 5' - CGCTGTCTGGCCGCACT – 3'<br>DP: III-55as           | 1186              |
| 2   | 59T>G   | UP: 5' - GCTGTCTGGCCGCAC <b>g</b> G – 3'<br>DP: III-55as  | 1185              |
| 3   | 202wt   | UP: 5' - CCCTCCTGATCCTGCTATG – 3'<br>DP: III-55as         | 1045              |
| 4   | 202T>C  | UP: 5' - ACCCTCCTGATCCTGCTA <b>c</b> – 3'<br>DP: III-55as | 1044              |
| 5   | 314wt   | UP: 5' - GTACCCACAGGCAGACACG – 3'<br>DP: III-55as         | 932               |
| 6   | 314C>T  | UP: 5' - TGTACCCACAGGCAGACA <b>t</b> – 3'<br>DP: III-55as | 933               |
| 7   | 1067wt  | UP: 5' - CCAGACGGTGCGCAGCAT – 3'<br>DP: III-55as          | 180               |
| 8   | 1067T>A | UP: 5' - CCAGACGGTGCGCAGCA <b>a</b> – 3'<br>DP: III-55as  | 180               |

<sup>a</sup>Deliberately mutated nucleotides are indicated by small letters in bold. Wt= wild type

### *Definition of Lewis genotype*

Distributions of genotype and allele frequencies for each individual single nucleotide polymorphism (i.e., T59G, T1067A, T202C and C314T) were studied separately, and as combinations of four *FUT3* gene SNPs, i.e., Lewis genotype groups. The table 2 summarizes some groups of *FUT3* gene polymorphisms into the corresponding Lewis genotype (Cakir et al., 2002).

Table 2- Identifications of Lewis genotype groups by combining information on *FUT3* gene mutations. *W* wild, *H* heterozygous, *M* homozygous mutant

| Lewis genotype at site |          |          |          |
|------------------------|----------|----------|----------|
| 59                     | 1067     | 202      | 314      |
| <i>W</i>               | <i>W</i> | <i>W</i> | <i>W</i> |
| <i>M</i>               | <i>M</i> | <i>W</i> | <i>W</i> |
| <i>W</i>               | <i>W</i> | <i>H</i> | <i>H</i> |
| <i>H</i>               | <i>H</i> | <i>H</i> | <i>W</i> |

### **Results**

Genotyping was completed for 181 blood donors. There were 37% (n=67) male and 63.0% (n=114) female subjects with a mean age of 34.85 years (ranging from 18 years to 61 years). Concern ethnic the majority was Caucasians (84.5%, n=153), 12.2% (n=22) Africans Americans and 3.3% (n=6) Mongols. The genotypes comprising the four common mutations (T59G, T1067A, T202C and C314T) and the most common genotype was the “all-wild” genotype (i.e., *WWWW*), which was found to be present in 45.9% (n=83) of participants. The others genotypes were *WWHH* (n=45, 24.9%), *HHWW* (n=20, 11.0%), *HWWW* (n=14, 7.7%), *WWMM* (n=7, 3.9%), *MMWW* (n=5,

2.8%), *HWHH* (n=2, 1.1%) and *MWWW*, *MHWW*, *WWHW*, *HHHW* and *HWHW* with 0.6% each (n=1).

With regard to the molecular basis of phenotypes of Le (a-b+), 66 cases (54.6%) were “all-wild” genotype (*WWWW*), 44 (36.4%) were double heterozygotes (*HHWW* or *WWHH*), 1 (0.8%) was *WWHW* and 1 (0.8%) was *HHHW*. Concerning the phenotypes of Le (a+b-), the genotype most common was *WWWW* (n=12, 40.0%). Concerning the phenotypes of Le (a-b-), 14 cases (48.3%) were homozygous or double homozygotes for a mutant allele (*WWMM*, *MMWW*, *MWWW*, *MHWW*), 11 cases (37.9%) had at least a mutant heterozygote allele (Table 3).

Table 4 presents the distribution of genotype and allele frequencies for each individual single nucleotide polymorphism. The most common mutation was at nucleotide position 202 with frequency of the 17.7% for *C* allele. The second most common mutant allele was *T* allele at nucleotide position 314 with 16.9% (Table 4).

Table 3- Distribution of combinations of SNPs of the *FUT3* gene and Lewis blood phenotypes. *W* wild, *H* heterozygous, *M* homozygous mutant

| Lewis genotypes (at sites<br>59, 1067, 202, 314) | Lewis phenotypes |      |           |      |           |      |           |     |
|--|------------------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|-----|
|  | Le (a-b+)        |      | Le (a+b-) |      | Le (a-b-) |      | Le (a+b+) |     |
|  | n                | %    | n         | %    | N         | %    | n         | %   |
| <i>WWWW</i>                                      | 66               | 54.6 | 12        | 40.0 | 4         | 13.8 | 1         | 100 |
| <i>HHWW</i>                                      | 9                | 7.4  | 9         | 30.0 | 2         | 6.9  | -         |     |
| <i>WWHH</i>                                      | 35               | 29.0 | 5         | 16.7 | 5         | 17.2 | -         |     |
| <i>HWWW</i>                                      | 9                | 7.4  | 4         | 13.3 | 1         | 3.4  | -         |     |
| <i>WWMM</i>                                      | -                |      | -         |      | 7         | 24.1 | -         |     |
| <i>MMWW</i>                                      | -                |      | -         |      | 5         | 17.2 | -         |     |
| <i>MWWW</i>                                      | -                |      | -         |      | 1         | 3.4  | -         |     |
| <i>MHWW</i>                                      | -                |      | -         |      | 1         | 3.4  | -         |     |
| <i>HWHH</i>                                      | -                |      | -         |      | 2         | 6.9  | -         |     |
| <i>WWHW</i>                                      | 1                | 0.8  | -         |      | -         |      | -         |     |
| <i>HHHW</i>                                      | 1                | 0.8  | -         |      | -         |      | -         |     |
| <i>HWHW</i>                                      | -                |      | -         |      | 1         | 3.4  | -         |     |
|  | 121              | 100  | 30        | 100  | 29        | 100  | 1         | 100 |

Table 4- Distribution of Lewis genotype and allele frequencies for individual SNPs.

| Mutation | Genotype        | Participants |      |
|----------|-----------------|--------------|------|
|          |                 | N            | %    |
| T59G     | TT              | 136          | 75.1 |
|          | TG              | 38           | 21.0 |
|          | GG              | 7            | 3.9  |
|          | <i>T</i> allele | 310          | 85.6 |
|          | <i>G</i> allele | 52           | 14.4 |
| T1067A   | TT              | 154          | 85.1 |
|          | TA              | 22           | 12.2 |
|          | AA              | 5            | 2.8  |
|          | <i>T</i> allele | 330          | 91.2 |
|          | <i>A</i> allele | 32           | 8.8  |
| T202C    | TT              | 124          | 68.5 |
|          | TC              | 50           | 27.6 |
|          | CC              | 7            | 3.9  |
|          | <i>T</i> allele | 298          | 82.3 |
|          | <i>C</i> allele | 64           | 17.7 |
| C314T    | CC              | 127          | 70.2 |
|          | CT              | 47           | 26.0 |
|          | TT              | 7            | 3.9  |
|          | <i>C</i> allele | 301          | 83.1 |
|          | <i>T</i> allele | 61           | 16.9 |

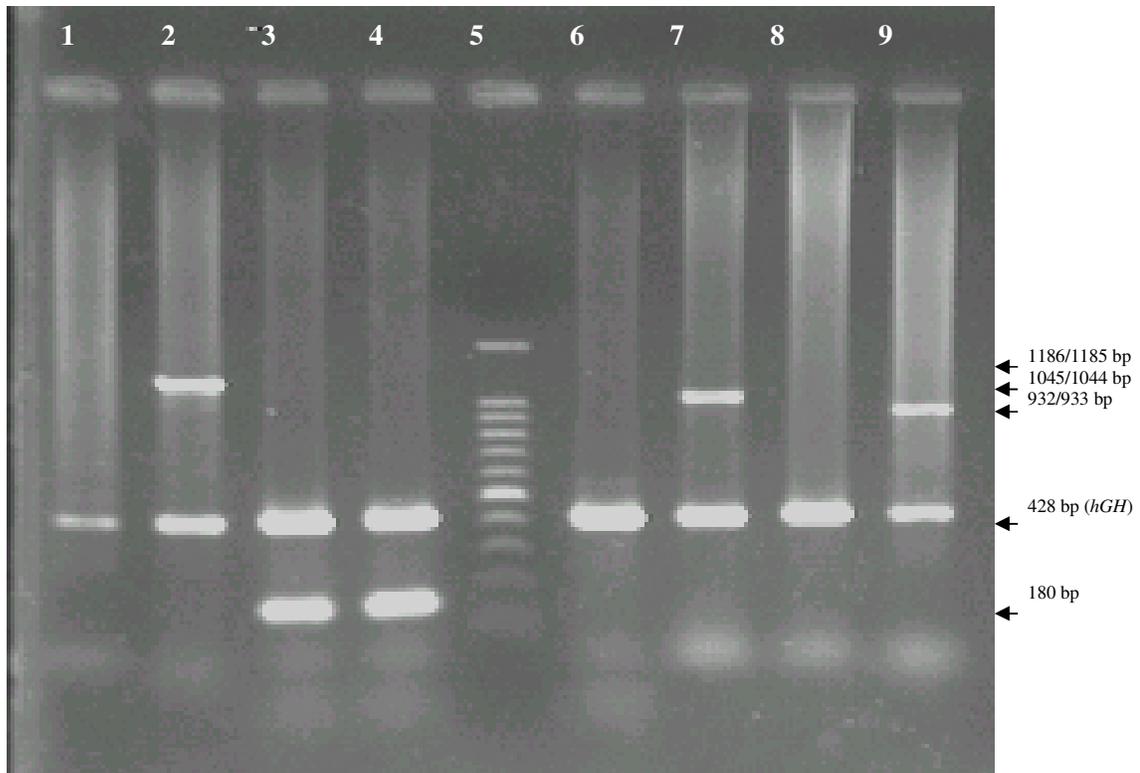


Figure 1- PCR-SSP patterns from the *FUT3* genotyping. Lanes 1 and 2 show the results using the 59wt and 59T>G primers (genotype - GG), lanes 3 and 4 show the results using the 1067wt and 1067T>A primers (genotype - TA), lanes 6 and 7 show the results using the 202wt and 202T>C primers (genotype - CC), lanes 8 and 9 show the results using the 314wt and 314C>T primers (genotype - TT). The lane 5 indicate molecular weight marker of the 100bp. Internal control (*hGH*) is included in lines 1-4 and 6-9.

## Discussion

There are at least two alleles at the *Lewis* site: *Le*, which encoding a functional  $\alpha(1,3/1,4)$  fucosyltransferase, and *le*, which encode nonfunctional  $\alpha(1,3/1,4)$  fucosyltransferase. These silent variants contain single nucleotide polymorphisms (SNPs) in coding region of the *FUT3* gene and are consistent with a decrease in enzyme levels and/or Lewis-negative phenotype in individuals (Henry et al., 1995). Until now, four missense mutations in the *FUT3* gene, viz., T59G, T1067A, T202C and C314T, associated with a non-functional *Lewis* allele (*le*) which are known to explain the 90-95% of the Lewis-negative phenotype in Caucasians (Elmgren et al. 1997; Mollicone et al. 1994; Pang et al. 1998; Koda et al. 2001; Cakir et al. 2002). These four mutations produces at least five alleles,  $Le^{59}$ ,  $le^{59,1067}$ ,  $le^{1067}$ ,  $le^{202}$  and  $le^{202,314}$ , which have been demonstrated to show a race-specific distribution. Lewis genotyping in this study included the identification of four major single nucleotide polymorphisms of *FUT3* gene at nucleotide positions 59, 1067, 202 and 314. The most common genotype was the “wild type” genotype at all four nucleotide positions and was found to be present in 45.9% of participants. Previous studies reported the frequency of the “wild” genotype (*LeLe*) as 23%, 47%, 46.7%, 57.2%, 45.3%, 38% and 41.6% in Xhosa (n=100), South Africa Caucasian (n=100) (Pang et al., 1998), Chinese in Guangzhou (n=154), Chinese in Shenyang (n=138) (Liu et al., 1999), Taiwanese (n=137), Thai (n=71) and Filipino (n=125) populations (Liu et al., 2000), respectively.

These study the most common mutant allele was *C* allele at nucleotide position 202 of the *FUT3* gene with 17.7%, compared to 15.5% in South Africa Caucasians (Pang et al., 1998). The frequency of the mutant *T* allele at site 314 (16.9%) was almost the same as for the mutant *C* allele at site 202 (17.7%), and this finding was consistent with the literature in that SNPs at nucleotide positions 202 and 314 usually occur

together (Elmgren et al., 1996). The T59G mutation (14.4% G allele) was most frequent than T1067A (8.8% A allele), though often occur together. The G508A mutation was not examined in the study and the  $le^{59,508}$  and  $Le^{59}$  alleles were indistinguishable. Hence the higher frequency of the T59G mutation may be representative of the  $le^{59,508}$  allele, rather than  $le^{59}$  allele. Salomaa et al. (2000) studied Lewis genotype-phenotype correspondence in a Caucasian population and have indicated that the point mutations at nucleotide positions 59, 1067, 202 and 314 of the *FUT3* gene and/or combinations of these mutations are explanatory for more than 90% of individuals with Lewis-negative phenotype.

The phenotype Le (a+b+) was found our study in only 1 case (0.6%) confirming results of the literature in that these phenotype is virtually absent in Caucasians (Henry 1996). The phenotype Le (a-b-) was found in 16.0% (n=29), however the genotype Lewis-negative was found in 6.6% (n=12) from participants and 41.34% from Le (a-b-) individuals, whereas 13.8% (n=4) of the Lewis (a-b-) were wild type genotype (WWWW). Studies report a frequency of approximately 10% of Le (a-b-) phenotypes in Caucasians populations (Ellison et al., 1999; Watkins 1995b). The SNPs at nucleotide positions 59, 1067, 202 and 314 were presented in 86.2% of the Lewis (a-b-) participants, but the genotypes Lewis-negative were *WWMM* (n=7, 3.9%) and *MMWW* (n=5, 2.7%). The genotypes *MWWW*, *MHWW* and *HWHH* though found only in Le (a-b-) individuals not annuls totally the enzyme activity. Elmgren et al. (1997) have reported, in their transfection study of a chimeric *FUT3* gene construct containing T202C or C314T, that the T202C mutation alone has about 10% activity compared with a construct containing the wild type allele. The C314T construct had an activity similar to the wild type allele, whereas the construct containing both T202C and C314T mutations in combination had no activity. This study suggested a synergistic negative

effect on the protein activities of T202C and C314T mutations (Elmgren et al., 1996; Elmgren et al 1997). The T59G mutation alone may cause a 0- 30% decrease in the Lewis enzyme levels, although the T59G mutation is usually co-localized with the T1067A mutation (Molicone et al., 1994; Nishihara et al., 1993; Nishihara et al., 1994). A single at site 1067 was found to reduce the fucosyltransferase enzyme activity to less than 10% (Nishihara et al., 1994).

In conclusion, our study indicated that at the Brazilian population of the Araraquara city, was found the four SNPs of *FUT3* gene at nucleotide positions 59, 1067, 202 and 314 and that the T202C and C314T mutations were the most frequents. Theses mutations were presented in 86.2% of the Le (a-b-) participants, though only 41.34% of the Lewis (a-b-) individuals produced genotypes Lewis-negative. Moreover, studies of the association between Lewis blood group system and different disease might has using genotyping method, for Lewis phenotyping is an unreliable method for correct classification of the individuals Lewis-negative.

#### Acknowledgements

The present study was supported by FUNDUNESP, a Brazilian research funding organization.

## References

- Cakir B, Pankow JS, Samomaa V et al. 2002. Distribution of *Lewis (FUT3)* genotype and allele: frequencies in a biethnic United State population. *Ann Hematol* 81:558-65.
- Clausen H, Hakomori S. 1989. ABH and related histo-blood group antigens: immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 56:1-20.
- Cooling L, Gu Y. 2003. Identification of two new single-nucleotide polymorphisms in *FUT3* associated with the Lewis-null phenotype. *Transfusion* 43:1760-1.
- Ellison RC, Zhang Y, Myers RH et al. 1999. Lewis blood group phenotype as an independent risk factor for coronary heart disease (The NHLBI Family Heart Study). *Am J Cardiol* 83:345-8.
- Elmgren A, Börjeson C, Svensson L et al. 1996. DNA sequencing and screening for point mutations in the human *Lewis (FUT3)* gene enables the molecular genotyping of the human Lewis blood group system. *Vox Sang* 70:90-103.
- Elmgren A, Mollicone R, Costaghe M, Borjeson C, Oriol R, Harrington J, Larson G. 1997. Significance of individual point mutations, T202C and C314T, in the human *Lewis (FUT3)* gene for expression of Lewis antigens by the human  $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase, Tuc-TIII. *J Biol Chem* 272:21994-8.
- Elmgren A, Rydberg L, Larson G. 1993. Genotypic heterogeneity among Lewis negative individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 196:515-20.
- Good AH, Yau D, Lamontagne LR, Oriol R. 1992. Serological and chemical specificities of twelve monoclonal anti-Le<sup>a</sup> and anti-Le<sup>b</sup> antibodies. *Vox Sang* 62:180-9.
- Grahn A, Elmgren A, Aberg L et al. 2001. Determination of Lewis *FUT3* gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. *Hum Mutat* 18:358-9.

Henry SM. 1996. Review: phenotyping for Lewis and secretor histo-blood group antigens. *Immunohematol* 12:51-61.

Koda Y, Kimura H, Mekada E. 1993. Analysis of lewis fucosyltransferase gene180s from the human gastric mucosa of Lewis-positive and -negative individuals. *Blood* 82:2915-9.

Kukowska-Latallo JF, Larsen RD, Nair RP, Lowe JB. 1990. A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group  $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase. *Genes Dev* 4:1288-1303.

Liu TC, Chang JG, Lin SF et al. 2000. Lewis (*FUT3*) genotypes in Taiwanese, Thai, and Filipino populations. *Ann Hematol* 79:599-603.

Liu Y-H, Koda Y, Soejima M, Pang H, Wang BJ, Kimura H. 1999. Lewis (*FUT3*) genotypes in two different Chinese populations. *J Forensic Sci* 44:82-6.

Liu Y-H, Koda Y, Soejima M, Uchida N, Kimura H. 1996. PCR análisis of Lewis-negative gene mutations and the distribution of Lewis alleles in a Japanese population. *J Forensic Sci* 41:1018-21.

Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clément M, Le Pendu J. 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83:565-73.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res* 16:1215.

Nishihara S, Narimatsu H, Iwasaki H et al 1994. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. *J Biol Chem* 269:292718.

Nishihara S, Yazawa S, Iwasaki H et al. 1993  $\alpha(1,3/1,4)$ Fucosyltransferase (FucT-III) gene is inactivated by a single amino acid substitution in Lewis histo-blood type negative individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 196:62431.

Orntoft TF, Vestergaard EM, Homes E et al. 1996. Influence of Lewis  $\alpha(1,3/1,4)$  fucosyltransferase (*FUT3*) gene mutations on enzyme activity, erythrocyte phenotyping, and circulating tumor marker sialyl-Lewis a levels. *J Biol Chem* 271:32260-8.

Pang H, Liu Y-H, Koda Y, Soejima M, Jia JT, Schlaphoff T, Du Toit ED, Kimura H. 1998. Five novel mutations of Lewis gene (*FUT3*) in African (Xhosa) and Caucasian populations in South Africa. *Hum Genet* 102:675-80.

Salomaa V, Pankow J, Heiss G et al. 2000. Genetic background of Lewis-negative blood group phenotype and its association with atherosclerotic disease in the NHLBI Family Heart Study. *J Intern Med* 247:689-98.

Soejima M, Kimura H, Koda Y. 2004. Two novel *FUT3* responsible for Lewis-null phenotypes in Sri Lanka. *Transfusion* 44:1534-5.

Wang B-J, Akiyama K, Kimura H. 1994. Quantitative analysis of Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup> antigens in human saliva. *Vox Sang* 66:280-6.

Watkins WM. 1995a. Molecular basis of antigenic specificity in the ABO, H and Lewis blood group systems. In: Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H, editors. *Glycoproteins*. Amsterdam: Elsevier Science BV, p 313-390.

Watkins WM. 1995b. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Adv Hum Genet* 10:82-117.

POLYMORPHISMS OF LEWIS AND SECRETOR GENES ARE RELATED TO THE  
BREAST CANCER AND METASTASIS IN AXILLARY LYMPH NODES .

D.B.Teresa<sup>(a)</sup>, R.A.Santos<sup>(b)</sup>, C.S.Takahashi<sup>(c)</sup>, H.H.Carrara<sup>(b)</sup>, H.W.Moreira<sup>(a)</sup>,  
L.C.Mattos<sup>(d)</sup>, N. Lia-Neto<sup>(e)</sup>, L.A.Cunha<sup>(f)</sup>, C.L.Bassi<sup>(b)</sup>, E.G. Soares<sup>(b)</sup>, C.P. Soares\*<sup>(a)</sup>

- a. School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, University of São Paulo State, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Zip code 14 801 902, Araraquara, Sao Paulo, Brazil.
- b. Faculty of Medicine of Ribeirão, University of São Paulo (USP), Av dos Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Zip Code 14041-900 - Ribeirão Preto, São Paulo – Brazil
- c. Faculty of Philosophy, Sciences and Letter of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Av dos Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Zip Code 14041-900 - Ribeirão Preto, São Paulo – Brazil
- d. Faculty of Medicine of São José do Rio Preto (FAMERP), Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, São Pedro, Zip code 15090-000, São Jose do Rio Preto, São Paulo, Brazil
- e. Institute of Surgical Pathology and Cytopathology (IPC), Rua Voluntários da Pátria, 2020 – Centro, Zip Code 14801-320, Araraquara, São Paulo, Brazil.
- f. Center of Oncology of Araraquara City (CORA),

Author to whom correspondence must be sent:

C.P.Soares. Address: Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Zip code 14 801 902, Araraquara, São Paulo, Brazil. Phone 55 16 201 6554; fax 55 16 201 6547.

\* e-mail address:soarescp@hotmail.com, soarescp@fcfar.unesp.br

## SUMMARY

ABH and Lewis antigens expression have been associated with cancer development, prognosis, tumor differentiation and metastasis. Considering that invasive ductal breast carcinoma (IDC) present multiple molecular alterations, the aim of the present study was evaluated if the polymorphism of ABO, Lewis and secretor genes, as well as ABO phenotyping could be associated to tumor differentiation and lymph nodes metastasis. In 76 women with IDC and 78 health women blood donors, ABO phenotyping/genotyping, Lewis and Secretor genotyping were evaluated. Phenotyping was performed by hemmagglutination method and genotyping by Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers (PCR-SSP). ABO, Lewis and Secretor were classified by individual single nucleotide polymorphism (SNP) at sites 59, 1067, 202 and 314 of the *Lewis* gene, 428 of the *Secretor* gene and 261 (O1 allele), 526 (O2 and B allele) and 703 (B allele). Lewis genotype was classified in Lewis positive (wild-type or two/three SNPs) or Lewis negative (two to four different SNPs). The Secretor genotype was classified in Secretor (wild type or SNP in heterozygotes) and Non-secretor (SNP in homozygotes). No association was found between patients with breast cancer and ABO antigen expression ( $P=0.9323$ ) and genotypes ( $P=0.9356$ ). Lewis negative was associated with IDC ( $P=0.0126$ ), but were not associated with anatomoclinical parameters (tumor size, TNM staging and axillary lymph nodes metastasis). Non-secretor genotype was associated with axillary lymph nodes metastasis ( $P=0.0149$ ). In conclusion, the Lewis and Secretor genotyping could be useful to predict, respectively, of breast cancer susceptibility and axillary lymph nodes metastasis.

**Key Words:** ABO, Lewis, Secretor, Genotyping, Phenotyping and human breast cancer

## Introduction

Breast cancer is an extremely diverse group of disease, presenting histological subtypes, such as tubular, cribriform and colloid cancers which are known to have a good prognosis, while ductal carcinomas have a relative poor prognosis (Henry and Hayes, 2006). Moreover, breast cancer is a complex genetic disease characterized by the accumulation of multiple molecular alterations. Invasive ductal carcinoma of breast (IDC) is the more common malignant lesion, whose behavior is evaluated through clinical (age of the patients), histological parameters, lymph node status and biological markers (Viale, 2003; Gago et al., 1998). Among biological markers, the ABH, Lewis and secretor antigens expression, have been associated with increased susceptibility to infections and cancer, promoting higher sites of adhesion between, respectively, to microorganism or cancer cells and target cells (Hurd and Domino, 2004; Ikehara et al, 2001). The Lewis blood group determinants are structurally related to the antigens of the ABO blood group system and they are made by sequential addition of specific monosaccharides onto terminal saccharide precursor chains on glycolipids or glycoproteins. The glycolipids on which they reside on the erythrocyte surface are not synthesized in erythroid tissues, but are acquired by erythrocyte membranes from other tissue through circulating soluble forms that are bound to lipoproteins (Watkins, 1995). The synthesis of the epitopes is dependent on the interaction of two different fucosyltransferases:  $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase encoded by the *FUT2* or *Secretor (Se)* gene, and  $\alpha(1,3/1,4)$  fucosyltransferase encoded by the *FUT3* or *Lewis (Le)* gene (Clausen and Hakomori 1989). Absence of histoblood group antigens expression is usually related to gene mutations and they are associated with loss of glycosyltransferase activity in bladder tumors (Orlow et al., 1998). During neoplastic

transformation, histoblood group antigen expression changes profoundly and the presence of *ABO*, *Lewis* and *Secretor* genes polymorphisms could represent a genetic susceptibility to the tumor invasion and metastasis (Dabelsteen and Gao, 2005; Madjd et al., 2005). Previous studies demonstrated that deregulation of adhesion molecules could be an important mechanism to invasion and metastasis of malignant tumors (Regidor et al., 1998; Madhavan et al., 2002, Gong et al., 2005). Considering that malignant neoplasm needs to adhere in extracellular matrix and blood vessels (Zhang et al., 2006; Jeschke et al., 2005; Rakha et al., 2005) to invade and metastasis, the aim of the present study was evaluated if the polymorphism of *ABO*, *Lewis* and *Secretor* genes and as well as ABO phenotyping are related to anatomoclinical parameters and lymph nodes metastasis in IDC.

## **Materials and Methods**

### **Specimens**

Seventy-six patients (test group) with invasive ductal carcinoma (IDC) were attended in Gynaecology and Obstetric Ambulatory, of Clinical Hospital of School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (HCFMRP-USP) and Center of Oncology of Araraquara City (CORA), São Paulo Brazil. Tumor specimens were graded by the WHO classification and staged according to the TNM staging system (AJCC, 1992). In control group, 78 healthy women blood donors were evaluated in the Blood Bank of School of Pharmaceutical Sciences, UNESP – University of São Paulo State, Araraquara, São Paulo, Brazil. The women with breast cancer and health donors were paired for age, when it was possible. The present study was approved by the ethical committee in human experimentation (process HCFMRP n° 15671/2005 and FCFAR process n° 24/2003)

### **ABO antigens phenotyping**

The ABO blood group type (A, B, O or AB) antigens expression were evaluated by standard hemmagglutination method (Vengelen-Tyler, 1996), using monoclonal antibodies (DiaMed, Switzerland).

### **ABO, Lewis and Secretor Genotyping**

#### *DNA extraction*

Blood samples (5,0mL) are collected with vacutainer tube and genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes as described previously (Miller et al., 1988) and diluted in TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7,5).

#### *ABO Genotyping*

Two PCR reactions were performed with the following oligodeoxynucleotide primers : PCR1 (Fy 46 - 5' GAATTCACTCGCCACTGCCTGGGTCTC 3' and Fy57 - 5'GAATTCATGTGGGTGGCACCCTGCCA3') and PCR2 (Fy43 - 5'-CCAGGGGTGCACGGCCGGCGGC-3' and Fy31-5'GAAATCGCCCTCGTCCTT3'). For each reaction 0.5uM fo each primer, 0.2mM 0,2mM each dNTP was mixed with 0.2-0.4ug genomic DNA and 1.25U of *Taq* polymerase (Promega).The PCR1 was performed with an initial denaturation at 94°C for 5 min and the 35 cycles of denaturation at 94°C for 2 min, anneling at 57°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. The PCR2 was performed with an initial denaturation at 94°C for 5 min and the 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, anneling at 53°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. PCR1 product with 248/249 pb was digested with KpnI restriction enzyme to indentify O1 allele. PCR2 product with 467bp was submitted to restriction digestion with MspI and NarI to identify, B allele and O2 allele.

*Lewis and Secretor Genotyping*

Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers (PCR-SSP) was performed to evaluate FUT3 and FUT2 gene mutation, identifying, respectively, the polymorphism of Lewis and Secretor genes. The amplifications of the DNA were performed in 25uL of solution containing 1X Green Buffer (Promega-USA), 0.2mM each dNTP, 0.5  $\mu$ M each primer, 1,25U GoTaq<sup>TM</sup> DNA polymerase (Promega – USA) and 500ng genomic DNA. The cycling parameters for *FUT3* mutations were 96°C 60s; 5 cycles at 96°C 20s, 70°C 45s, 72°C 25s; 21 cycles at 96°C 25s, 65°C 50s, 72°C 30s; 4 cycles at 96°C 30s, 55°C 60s, 72°C 90s and for *FUT2* mutation was. 96°C 60s; 5 cycles at 96°C 25s, 70°C 45s, 72°C 45s; 21 cycles at 96°C 25s, 65°C 50s, 72°C 45s; 4 cycles at 96°C 25s, 55°C 60s, 72°C 120s The human growth hormone (hGH) gene was used, as an internal control in each PCR amplification, with 5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTT-3' as sense primer and 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTG-3' as anti-sense primer (Procter et al, 1997). All primer-mixes (table 1) included 0.5  $\mu$ M of each *hGH*-primer, gave raise to an 428bp amplification product and an anti-sense primer (III-55as) with 5'-TTCTGGAGGGGAGAGGCT-3' specific for the wild allele *FUT3* in the position 1212-1229 were used (Grah et al, 2001)

Table 1- The primer sequences and corresponding PCR product sizes. *UP* upstream; *DP* downstream.

| Mix | Allele  | Primer sequence <sup>a</sup>              | Product size (bp) |
|-----|---------|---|-------------------|
| 1   | 59wt    | UP: 5' - CGCTGTCTGGCCGCACT – 3'           | 1186              |
|     | FUT3    | DP: III-55as                              |                   |
| 2   | 59T>G   | UP: 5' - GCTGTCTGGCCGCAC <b>g</b> G – 3'  | 1185              |
|     | FUT3    | DP: III-55as                              |                   |
| 3   | 202wt   | UP: 5' - CCCTCCTGATCCTGCTATG – 3'         | 1045              |
|     | FUT3    | DP: III-55as                              |                   |
| 4   | 202T>C  | UP: 5' - ACCCTCCTGATCCTGCTA <b>c</b> – 3' | 1044              |
|     | FUT3    | DP: III-55as                              |                   |
| 5   | 314wt   | UP: 5' - GTACCCACAGGCAGACACG – 3'         | 932               |
|     | FUT3    | DP: III-55as                              |                   |
| 6   | 314C>T  | UP: 5' - TGTACCCACAGGCAGACA <b>t</b> – 3' | 933               |
|     | FUT3    | DP: III-55as                              |                   |
| 7   | 1067wt  | UP: 5' - CCAGACGGTGCGCAGCAT – 3'          | 180               |
|     | FUT3    | DP: III-55as                              |                   |
| 8   | 1067T>A | UP: 5' - CCAGACGGTGCGCAGCA <b>a</b> – 3'  | 180               |
|     | FUT3    | DP: III-55as                              |                   |
| 9   | 428wt   | UP: 5' -GCTACCCCTGCTCCTGG-3'              | 519               |
|     | FUT2    | DP: 5'-GGCTGCCTCTGGCTTAAAG-3'             |                   |
| 10  | 428G>A  | UP: 5' -CGGCTACCCCTGCTCCT <b>a</b> -3'    | 520               |
|     | FUT2    | DP: 5'-GGCTGCCTCTGGCTTAAAG-3'             |                   |

<sup>a</sup>Deliberately mutated nucleotides are indicated by small letters in bold. Wt= wild type

#### *Definition of ABO, Lewis and Secretor genotype*

ABO genotype were evaluated separately and individual single nucleotide polymorphism (SNP) defined O genotype in O1(G261del) and O2(C526G); B genotyped were defined to SNP(G703A). A type blood antigen genotype were classified for exclusion, when the genotyping did not presented O and B polymorphisms. AB genotype were characterized to SNP (G703A) and allele A.

Distributions of Lewis genotype and allele frequencies for each, SNP (T59G, T1067A, T202C and C314T) were studied separately. Moreover, these four SNPs of *FUT3* gene were evaluated in different permutations, named Wild-type (W),

Heterozygous (*H*) and Homozygous mutant (*M*), they are classified in three groups SNPs permutations, which are related to FUT3 enzyme activity (Cakir et al., 2002): 1) active enzyme (WWWW) = absence of SNPs; 2) enzyme less active (HHWW, WWHH, HWWW, HWHH, MWWW, MHWW, WWHW, HHHW, HWHW) = presence of permutations of two or three SNPs and 3) enzyme inactive (WWMM, MMWW, HHHH, HWMH, MMHW, WWMH, HHMH) = Presence of permutations of two to four SNPs.

Distribution of Secretor genotype and allele frequency for an unique SNP (G428A) were classified in two groups: 1) Secretor genotype = wild-type or mutation G428A in heterozygotes and 2) Non-secretor genotype = G428A gene mutation in homozygotes.

### *Statistical Analysis*

The statistical analysis of phenotypic (ABO) and genotypic (ABO, Lewis and Secretor genes) characterization between women with invasive ductal breast carcinoma and health donors women were performed using chi-squared test ( $\chi^2$ ) and Fisher exact test.

## **Results**

Seventy-six patients with invasive ductal carcinoma of the breast and 78 women health donors were evaluated to histoblood group antigen expression and ABO genotypes (Table 2). Thirty-four (44.7%) out of 76 patients with breast cancer presented  $O^1O^1$  allele, 20(26.3%)  $AO^1$  allele, 7 (9.2%)  $BO^1$  allele and 6 (7.9%)  $AA$  allele. Among health women donors, 32 (41,0%) out of 78 women were  $O^1O^1$  allele, 20 (25.6%)  $AO^1$

allele, 10 (12.8%) AA allele and 9 (11.5%)  $BO^I$  allele. No statistical difference was found between patients with breast cancer and health women to ABO antigen expression ( $P=0.9323$ ) and genotypes ( $P=0.9356$ ).

Table 2 - Phenotyping and genotyping frequency of ABO histoblood group in health donors women (control group) and invasive ductal breast patients

| Phenotype <sup>(a)</sup> | Genotype <sup>(b)</sup>       | Patients (n=76) |      | Control (n=78) |      |
|--------------------------|-------------------------------|-----------------|------|----------------|------|
|                          |                               | N               | %    | N              | %    |
| O                        | O <sub>1</sub> O <sub>1</sub> | 34              | 44.7 | 32             | 41.0 |
|                          | O <sub>1</sub> O <sub>2</sub> | 2               | 2.6  | 1              | 1.3  |
| A                        | AA                            | 6               | 7.9  | 10             | 12.8 |
|                          | AO <sub>1</sub>               | 20              | 26.3 | 20             | 25.6 |
| B                        | BB                            | 3               | 3.9  | 2              | 2.6  |
|                          | BO <sub>1</sub>               | 7               | 9.2  | 9              | 11.5 |
| AB                       | AB                            | 4               | 5.3  | 4              | 5.1  |
|                          |                               | 76              | 100  | 78             | 100  |

Chi-squared test ( $\chi^2$ ) – <sup>(a)</sup> ABO phenotyping ( $P=0.9323$ ) and <sup>(b)</sup> genotyping ( $P=0.9356$ ).

ABO phenotyping, in 76 patients with invasive ductal carcinoma, were stratified according TNM classification, lymph nodes metastasis and tumor size (Table 3). No statistic difference was verified between anatomoclinical parameters and ABO histoblood group antigen expression ( $p>0,05$ ). The association between ABO antigen expression and distant metastasis was not possible to evaluate since only four (5.3%) patients presented metastasis to distant anatomical sites. Moreover, no association was found between ABO genotyping and anatomoclinical parameters.

Table 3 – ABO antigen expression in 76 women with invasive ductal carcinoma of breast stratified according anatomoclinical parameters.

| Variables                | O         | A         | B        | AB       | P Value <sup>(a)</sup> |
|--------------------------|-----------|-----------|----------|----------|------------------------|
| Tumor                    | n = 35    | n = 26    | n = 10   | n = 4    |                        |
|                          | n (%)     | n (%)     | n (%)    | n (%)    | 0.6128                 |
| T1                       | 12 (34.3) | 4 (15.4)  | 3 (30.0) | 1 (25.0) |                        |
| T2                       | 14 (40.0) | 12 (46.1) | 5 (50.0) | 2 (50.0) |                        |
| T3                       | 6 (17.1)  | 4 (15.4)  | 2 (20.0) | 1 (25.0) |                        |
| T4                       | 3 (8.6)   | 6 (23.1)  | 0 (0.0)  | 0 (0.0)  |                        |
| Metastasis (Lymph nodes) | n = 34    | n = 25    | n = 10   | n = 4    |                        |
|                          | n (%)     | n (%)     | n (%)    | n (%)    | 0.1985                 |
| Positive                 | 9 (26.5)  | 11 (44.0) | 4 (40.0) | 3 (75.0) |                        |
| Negative                 | 25 (73.5) | 14 (56.0) | 6 (60.0) | 1 (25.0) |                        |
| TNM stage                | n = 34    | n = 24    | n = 9    | n = 4    |                        |
|                          | n (%)     | n (%)     | n (%)    | n (%)    | 0.3625                 |
| I                        | 11 (32.3) | 4 (16.7)  | 3 (33.3) | 0 (0.0)  |                        |
| IIA                      | 10 (29.4) | 7 (29.2)  | 1 (11.1) | 1 (25.0) |                        |
| IIB                      | 7 (20.6)  | 5 (20.8)  | 4 (44.4) | 3 (75.0) |                        |
| IIIA                     | 3 (8.8)   | 1 (4.2)   | 1 (22.2) | 0 (25.0) |                        |
| IIIB                     | 2 (5.9)   | 4 (16.7)  | 0 (0.0)  | 0 (0.0)  |                        |
| IV                       | 1 (2.9)   | 3 (12.5)  | 0 (0.0)  | 0 (0.0)  |                        |

<sup>(a)</sup> Chi-squared test ( $\chi^2$ )

Four *FUT3* gene mutation were analyzed in women with breast cancer and health (Table 4). T202C mutation of *FUT3* gene was frequently found in the patients with breast cancer and health women donors, which *C* allele frequency was, respectively 25% (n=38) to breast cancer group and 17.3% (n=27) control group. To C314T mutation, *T* allele frequency was found in 31 (20.4%) out of 76 breast cancer patients and 25 (16.0%) out of 78 health women donors. In T1067A mutation, *A* allele was less frequently observed in 15 (9.9%) out of 76 breast cancer patients and 9 (5.8%)out of 78 health women. However, association was not observed between breast

cancer patients and health women donors to those *FUT3* gene mutations, compared separately.

Table 4 – Frequency of *FUT3* allele mutations in 76 women with breast cancer and 78 health women donors.

| Mutations | Allele          | Patients |      | Control |      | P Value <sup>(a)</sup> |
|-----------|-----------------|----------|------|---------|------|------------------------|
|           |                 | n        | %    | n       | %    |                        |
| T59G      | TT              | 56       | 73.7 | 63      | 80.8 | 0.5769                 |
|           | TG              | 16       | 21.0 | 12      | 15.4 |                        |
|           | GG              | 4        | 5.3  | 3       | 3.8  |                        |
|           | Allele <i>T</i> | 128      | 84.2 | 138     | 88.5 |                        |
|           | Allele <i>G</i> | 24       | 15.8 | 18      | 11.5 |                        |
| T1067A    | TT              | 63       | 82.9 | 70      | 89.7 | 0.4573                 |
|           | TA              | 11       | 14.5 | 7       | 9.0  |                        |
|           | AA              | 2        | 2.6  | 1       | 1.3  |                        |
|           | Allele <i>T</i> | 137      | 90.1 | 147     | 94.2 |                        |
|           | Allele <i>A</i> | 15       | 9.9  | 9       | 5.8  |                        |
| T202C     | TT              | 44       | 57.9 | 54      | 69.3 | 0.2827                 |
|           | TC              | 26       | 34.2 | 21      | 26.9 |                        |
|           | CC              | 6        | 7.9  | 3       | 3.8  |                        |
|           | Allele <i>T</i> | 114      | 75.0 | 129     | 82.7 |                        |
|           | Allele <i>C</i> | 38       | 25.0 | 27      | 17.3 |                        |
| C314T     | CC              | 48       | 63.2 | 56      | 71.8 | 0.4946                 |
|           | CT              | 25       | 32.9 | 19      | 24.4 |                        |
|           | TT              | 3        | 3.9  | 3       | 3.8  |                        |
|           | Allele <i>C</i> | 121      | 79.6 | 131     | 84.0 |                        |
|           | Allele <i>T</i> | 31       | 20.4 | 25      | 16.0 |                        |

<sup>(a)</sup> Chi-squared test ( $\chi^2$ )

Different Lewis gene polymorphism (*FUT3*) permutation, related to the activity of the enzyme were found in breast cancer patients and health women (Table 5). WWWW *FUT3* gene polymorphism (active enzyme) was the one more frequent found in 34 (44.7%) out of 76 women with breast cancer and in 41 (52.6%) out of 78 health women donors. The permutations analysis, which represent the less active enzyme (HHWW, WWHH, HWWW, HWHH, MWWW, MHWW, WWHW, HHHW, HWHW) or inactive (WWMM, MMSS, HHHH, HSMH, MMHS, SSMH, HHMH), were evaluated in patients with breast cancer and health women. Sixty-three (82.9%) out of 76 patients with breast cancer showed genotype of active and less active enzyme (Lewis positive) and 14(17.1%) with genotype of inactive enzyme (Lewis Negative). In contrast, 74 (94.9%) out of 78 health women donors showed Lewis positive genotype and 4 (5.1%) Lewis negative. Close association was found between the patients with breast cancer and the Lewis negative genotype ( $P=0.0126$ ).

Table 5 – Lewis genotypes, derived from permutations of four *FUT3* gene polymorphisms (T59G, T1067A, T202C e C314T), in breast cancer patients and health women donors (Control group).

| Genotypes           | Patients |      | Control |      |
|---------------------|----------|------|---------|------|
|                     | N = 76   | %    | N = 78  | %    |
| WWWW <sup>(a)</sup> | 34       | 44.7 | 41      | 52.6 |
| HHWW <sup>(b)</sup> | 3        | 3.9  | 6       | 7.7  |
| WWHH <sup>(b)</sup> | 17       | 22.4 | 18      | 23.1 |
| HWWW <sup>(b)</sup> | 4        | 5.3  | 4       | 5.1  |
| HWHH <sup>(b)</sup> | 0        | 0.0  | 1       | 1.3  |
| MWWW <sup>(b)</sup> | 1        | 1.3  | 1       | 1.3  |
| MHWW <sup>(b)</sup> | 1        | 1.3  | 1       | 1.3  |
| WWHW <sup>(b)</sup> | 2        | 2.6  | 1       | 1.3  |
| HHHW <sup>(b)</sup> | 1        | 1.3  | 0       | 0.0  |
| HWHW <sup>(b)</sup> | 0        | 0.0  | 1       | 1.3  |
| WWMM <sup>(c)</sup> | 1        | 1.3  | 3       | 3.8  |
| MMWW <sup>(c)</sup> | 1        | 1.3  | 1       | 1.3  |
| HHHH <sup>(c)</sup> | 5        | 6.6  | 0       | 0.0  |
| HWMH <sup>(c)</sup> | 2        | 2.6  | 0       | 0.0  |
| MMHW <sup>(c)</sup> | 1        | 1.3  | 0       | 0.0  |
| WWMH <sup>(c)</sup> | 2        | 2.6  | 0       | 0.0  |
| HMHM <sup>(c)</sup> | 1        | 1.3  | 0       | 0.0  |

<sup>(a)</sup> Lewis positive (active enzyme); <sup>(b)</sup> Lewis positive (less active enzyme); <sup>(c)</sup> Lewis negative (inactive enzyme). Fisher's Exact Test, Lewis positive *versus* Lewis negative, P= 0.0126.

Lewis and Secretor genotyping were associated with anatomoclinical parameters, evaluated by tumor size, TNM staging and lymph nodes metastasis (Table 6). High frequency of *Secretor* gene mutation (*FUT2*) was found in women with breast cancer and health donors. *Secretor* gene mutation was found in 56(73.7%) out of 76 women with breast cancer, which 16 (21.1%) out of 56 women with breast cancer was found in homozygosis and 40(52.6%) in heterozygosis. G428A mutation of gene *FUT2* was observed in 56 (71.8%) out of 78 health women donors. Among 56 health women donors, *Secretor* gene mutation was found in homozygosis in 18 (23.1%) and 38 (48,7%) was found in heterozygosis. No association was verified to *Secretor* gene mutation between women with breast cancer and health donors (  $p = 0.8877$ ). Close association was demonstrated to non-secretor genotyping in women with breast cancer with axillary lymph nodes metastasis ( $P = 0.0149$ ).

Tabela 6 – Anatomoclinical parameters of invasive ductal carcinoma of breast associated with Lewis e Secretor genotyping.

| Variables                 | Lewis (+)<br>Genotype | Lewis (-)<br>Genotype <sup>(a)</sup> | P Value               | Secretor<br>Genotype <sup>(b)</sup> | Non-secretor<br>Genotype <sup>(c)</sup> | P Value               |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|---|-----------------------|
| Tumor                     | n (%)                 | n (%)                                | 0.6089 <sup>(d)</sup> | n (%)                               | n (%)                                   | 0.7051 <sup>(d)</sup> |
| T1                        | 17 (27.4)             | 3 (23.1)                             |                       | 15 (25.4)                           | 5 (29.4)                                |                       |
| T2                        | 28 (45.2)             | 5 (38.5)                             |                       | 27 (45.8)                           | 6 (35.3)                                |                       |
| T3                        | 11 (17.7)             | 2 (15.4)                             |                       | 11 (18.4)                           | 2 (11.7)                                |                       |
| T4                        | 6 (9.7)               | 3 (23.1)                             |                       | 6 (10.2)                            | 3 (17.6)                                |                       |
| Total                     | (n = 62)              | (n = 13)                             |                       | (n = 59)                            | (n = 16)                                |                       |
| Metastasis in lymph nodes | n (%)                 | n (%)                                | 1.000 <sup>e</sup>    | n (%)                               | n (%)                                   | 0.0149 <sup>e</sup>   |
| Positive                  | 21 (34.4)             | 4 (33.3)                             |                       | 15 (26.3)                           | 10 (62.5)                               |                       |
| Negative                  | 40 (65.6)             | 8 (66.7)                             |                       | 42 (73.7)                           | 6 (37.5)                                |                       |
| Total                     | (n = 61)              | (n = 12)                             |                       | (n = 57)                            | (n = 16)                                |                       |
| TNM stage                 | n (%)                 | n (%)                                | 0.0893 <sup>d</sup>   | n (%)                               | n (%)                                   | 0.1187 <sup>d</sup>   |
| I                         | 15 (25.4)             | 3 (25.0)                             |                       | 14 (25.5)                           | 4 (24.8)                                |                       |
| IIA                       | 18 (30.5)             | 1 (8.3)                              |                       | 16 (29.1)                           | 3 (18.8)                                |                       |
| IIB                       | 14 (23.7)             | 5 (41.7)                             |                       | 16 (29.1)                           | 3 (18.8)                                |                       |
| IIIA                      | 5 (8.5)               | 0 (0.0)                              |                       | 2 (3.6)                             | 3 (18.8)                                |                       |
| IIIB                      | 3 (5.1)               | 3 (25.0)                             |                       | 3 (5.4)                             | 3 (18.8)                                |                       |
| IV                        | 4 (6.8)               | 0 (0.0)                              |                       | 4 (7.3)                             | 0 (0.0)                                 |                       |
| Total                     | (n = 59)              | (n = 12)                             |                       | (n = 55)                            | (n = 16)                                |                       |

<sup>(a)</sup> Lewis negative = inactive enzyme; <sup>(b)</sup> G428A mutation in *Secretor* gene – Secretor genotypes GG (wild-type homozygote) and GA (heterozygote); <sup>(c)</sup> G428A mutation in *Secretor* gene – Non-secretor genotype AA (mutant homozygote); <sup>(d)</sup> Chi-squared test ( $\chi^2$ ), Lewis positive *versus* Lewis negative genotypes and/or Secretor *versus* Non-secretor genotype and anatomoclinical parameters (Tumor size and TNM staging); <sup>(e)</sup> Fisher's Exact Test, Lewis positive *versus* Lewis negative genotypes and/or Secretor *versus* Non-secretor genotype and metastasis in axillary lymph nodes.

## Discussion

*ABO*, *FUT2* and *FUT3* are polymorphic genes, at least in human being. The histoblood antigens are also expressed in epithelial cells, suggesting that ABO, Lewis and Secretor antigens could be important to cellular adhesion (Karlsson, 1998). The role of histoblood antigen expression and diseases have been investigated and it seems to be associated with infections, cancer prognosis (Dabelsteen and Gao, 2005, Marionneau et al., 2001, Henry, 2001). Previous studies demonstrated that ABH or Lewis antigens are associated with high risk to coronary disease (Garrison et al., 1976), better von Willebrand levels (Souto, et al., 2000), with susceptibility to *Candida sp* (Johansson et al., 2000) and *Helicobacter pylori* (Ilver et al., 1998). Although several studies have found association between histoblood antigen expression and cancer, the association between ABO phenotyping and genotyping and carcinogenesis is still poorly understanding. In the present study no association was found between ABO phenotyping and genotyping in women with breast cancer and anatomoclinical parameters of the breast tumor. The absent association between anatomoclinical parameters, ABO antigen expression and cancer were also verified in previous studies such as observed in the present study (Moldvay et al., 2000; Dresler et al., 1995; Bryne et al., 1991). Few studies have been addressed to evaluate cancer and ABO genotyping, and in some tumors, alteration of ABO/Lewis-related antigens is associated with malignant transformations (Nakagoe et al., 2001, You et al., 2000, Pyd et al., 1995, Pinkston and Cole, 1996). Blood group type O has been associated well-differentiated tumors and AB blood type presented higher tumor sizes and TNM staging in patients with esophageal carcinoma (Nozoe et al., 2004). Women having AB histoblood type group and Rh negative factor presented higher frequency of endometrial carcinoma (Adamian, 2005). A pioneer study in breast cancer demonstrated that breast cancer

susceptibility were observed in women having type A group (Vogel, 1970). However, ABO antigens expression were not associated with the skin and esophageal cancer susceptibility (Tursen et al., 2005; Su et al., 2001). Although ABO antigen expression seems to be different in human and mouse, experimental studies with implant of colon carcinoma in mouse demonstrated that the tumor cells expressing A antigen were more resistant to apoptosis, permitting tumor's cells survival (Marionneau et al., 2002; Mackenzie et al., 1995). A and B antigen expression in tumor cells inhibit cellular migration and the patients demonstrated better prognosis that patients which tumor cells expressed O antigen (Dabelsteen and Gao 2005)

Physiological and pathological processes such as pregnancy (Yazawa et al., 1996; Hammer et al., 1981), cirrosis (Stigendal et al., 1984), and cancer (Orntoft et al., 1991; Ernest, et al., 1984) could modify Lewis antigen expression in erythrocytes. Genetic polymorphism of *FUT3* gene could be useful to evaluate gene mutations associated to Lewis enzyme inactivation and related to several diseases and in different populations (Serpa et al., 2003; Cakir et al., 2002; Mattos et al., 2002; Liu et al., 2000; Yazawa et al., 1996). Four different polymorphisms was evaluated in the present study (T59G, T1067A, T202C e C314A) and the association between Lewis negative genotype and breast cancer was observed in the present study. These polymorphism could result in decreasing of the enzyme activity and the lack of Lewis antigen in erythrocytes and epithelial cells (Nishihara et al., 1994). Moreover, Lewis negative genotype are devoid of the Lewis enzyme in the Golgi apparatus, resulting in an inability to synthesize Lewis antigens with the type-1 chain (Narimatsu et al., 1996). Although Lewis genotyping studies are scarce, T59G *FUT3* gene mutation not was associated with gastric cancer (JIANG et al., 2003a). Adhesion molecules have been considered important to cancer metastatic processes, in which metastatic tumor cells

acquire specific cell adhesion or recognition systems to migrate to distant anatomical sites. Increased expression of sialyl Lewis<sup>x</sup> is correlated with poor prognosis of certain types of carcinoma while the low expression of Le<sup>x</sup>, sialyl-Lewis<sup>x</sup>, Le<sup>a</sup> and sialyl-Le<sup>a</sup> has been found in oral carcinomas (Dabelsteen and Gao, 2005). Tumor tissue expression of sialyl Lewis<sup>x</sup> in human breast, pulmonary, colorectal, gastric and other cancers were useful for predicting metastasis, the prognosis of the patients and also understanding the route of metastasis spread (Kawaguchi, 2005). The lack of adhesion molecules, such as integrins, in lung carcinoma cells result in lower cellular adhesiveness to fibronectin and laminin, resulting in the loss of tumorigenicity (Kabayama et al., 2001). Our findings might indicate that the higher frequency of Lewis negative genotype could result in the lack of Lewis antigen in epithelial tissues and/or tumor cells, resulting in decrease of adhesiveness of breast tumor cells which seems to be essential for the development of the malignant tumors in vivo. Patients with non-small cell lung cancer that sialyl-Lewis<sup>x</sup> antigen was absent were TNM stage I and relative risk was 6.10 lower than patients with the Lewis antigen (Mizuguchi et al., 2007). However, tumor cells with absent or low expression of Lewis antigen could be escape to immunosurveillance mediated by *Natural Killer* (NK) cells, since previous studies demonstrated that NK cells attack melanoma tumor cells expressing high levels of sialyl-Lewis<sup>x</sup> (Ohyama et al., 2002). Thus, patients with breast cancer who present Lewis negative genotyping could have a deficient immune response mediated by NK cells, contributing to tumor cells survive and tumor development. However, we could not find an association between anatomoclinical parameters of invasive ductal carcinoma of breast and Lewis genotyping.

Alpha(1,2) fucosyltransferase encoded by *FUT2* gene participate of H antigen production which could be modified and secreted to the body fluids (Henry, 1996).

Secretor status is defined by the expression of H type 1 antigen on external secretions and secretor individuals seems to be more susceptible to some bacterial and viral infections of the genito-urinary and gastric lymphoma (Oberhuber et al., 1997). In the present study we found a positive association between non-secretor genotype and breast cancer patients with axillary lymph nodes metastasis. G428A mutation of *FUT2* gene is main cause of the secretor enzyme (alpha 1,2 fucosyltransferase) inactivation, resulting in a non-secretor allele in caucasians and africans, while in asiatic population A385T mutation results in an enzyme with deficient activity (Liu et al., 1998b; Koda et al., 1996; Kelly et al., 1995). The expression of alpha(1,2) fucosyltransferase is decreased in human metastatic pancreatic cancer cells and it could play an important role in metastatic properties of human pancreatic cancer cells (Aubert et al., 2000). Reduction of metastatic properties of BL6 melanoma cells was observed in tumor cells expressing terminal fucose(alpha)1-2-galactose after alpha1,2-fucosyltransferase cDNA transfection (Gorelik et al., 1997). Thus, our findings suggest that the absence of H antigen in non-secretor genotype could increase metastatic process in invasive ductal carcinoma of the breast.

In the present study, *se*<sup>428</sup> allele was higher in women with breast cancer (73.7%) and in health women donors (71.8%) as previously found (Vestergaard et al., 1999; Liu et al., 1998, Procter et al 1997). However, we could not found association between *FUT2* gene mutation and breast cancer. While previous study could not verified association to secretor status and genotyping in oral cancer (Lamey, et al, 1994) and gastric cancer (Jiang et al., 2003b), other study demonstrated that higher intensity of oral disease occurred in the individuals with non-secretor genotype, and the occurrence of epithelial dysplasia was found exclusively in the non-secretor individuals (Vidas et al., 1999).

We can conclude that Lewis negative genotyping could be related with invasive ductal carcinoma of the breast, but not associated with tumor size, TNM staging and metastasis in axillary lymph nodes. In addition, non-secretor genotype may associated with higher potential to metastasis to axillary lymph nodes in women with breast cancer. Apparently, ABO histoblood antigens were not associated with the susceptibility to develop breast cancer.

### **Acknowledgements**

The present study was supported by FUNDUNESP and FAEPA, a Brazilian research funding organization.

### **References**

- Adamian R.T. 2005. Blood-type and rhesus distribution in Armenian women with endometrial carcinoma. *Vopr Onkol* 51:575-576.
- Aubert M, Panicot L, Crotte C, Gibier P, Lombardo D, Sadoulet MO, Mas E. 2000. Restoration of alpha(1,2) fucosyltransferase activity decreases adhesive and metastatic properties of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 60:1449-56.
- Bryne, M.; Eide, G.E.; Lilleng, R.; Langmark, F.; Thrane, P.S.; Dabelsteen, E. 1991. A multivariate study of the prognosis of oral squamous cell carcinoma. Are blood group and hemoglobin new prognostic factors? *Cancer* 68:1994-1998.
- Cakir B, Pankow JS, Samomaa V et al. 2002. Distribution of *Lewis (FUT3)* genotype and allele: frequencies in a biethnic United State population. *Ann Hematol* 81:558-65.
- Clausen H, Hakomori S. 1989. ABH and related histo-blood group antigens: immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 56:1-20.

Dabelsteen E, Gao S. 2005. ABO blood-group antigens in oral cancer. *J Dent Res* 84:21-8.

Dabelsteen E, Gao S. 2005. ABO blood-group antigens in oral cancer. *J Dent Res* 84:21-8.

Dresler, C.M.; Ritter, J.H.; Wick, M.R. Roper, C.L.; Patterson, G.A.; Cooper, J.D. 1995. Immunostains for blood group antigens lack prognostic significance in T1 lung carcinoma. *Ann Thorac Surg* 59:1069-1073.

Ernest C; Atkinson B; Wysocka M; Blaszczyk M; Herlyn M; Sears H; Steplewsky Z; Koprowsky H. 1984. Monoclonal antibody localization of Lewis antigens in fixed tissue. *Lab Invest* 50:394-400.

Gago, FE, Tello, OM, Diblasi, AM, Ciocca DR. Integration of estrogen and progesterone receptors with pathological and molecular prognostic factors in breast cancer patients. *J Steroid Molec Biol* 1998; 5-6:431-437.

Garrison RJ; Havlik RJ; Harris RB; Feinleib M; Kannel WB; Padgett SJ. 1976. ABO blood group and cardiovascular disease: the Framingham study. *Atherosclerosis* 25:311-318.

Gong Y, Sun X, Huo L, Wiley EL, Rao MS. 2005. Expression of cell adhesion molecules, CD44s and E-cadherin, and microvessel density in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Histopathol* 46:24-30.

Grahn A, Elmgren A, Aberg L et al. 2001. Determination of Lewis *FUT3* gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. *Hum Mutat*, 18: 358-9.

Hammer, L.; Mansson, S.; Rohr, T.; Chester, M.A.; Ginsburg, V.; Lundblad, A.; Zopf, D. 1981. Lewis-phenotype of erythrocytes and Leb active glycolipid in serum of pregnant women. *Vox Sang* 40:27-33.

Henry NL, Hayes DF. 2006. Uses abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. *Oncologist* 11:541-52.

Henry SM. 1996. Review:phenotyping for Lewis and secretor histo-blood group antigens. *Immunoematol* 12:51-61.

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

Hurd EA, Domino SE. 2004. Increased susceptibility of secretor factor gene Fut2-null mice to experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 72:4279-81.

Ikehara Y, Nishihara S, Yasutomi H, Kitamura T, Matsuo K, Shimizu N, Inada K, Kodera Y, Yamamura Y, Narimatsu H, Hamajima N, Tatematsu M. 2001. Polymorphisms of two fucosyltransferase genes (Lewis and Secretor genes) involving type I Lewis antigens are associated with the presence of anti-*Helicobacter pylori* IgG antibody. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:971-7.

Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET. 1998. *Helicobacter pylori* adhesion binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279:373-377.

Jeschke U, Mylonas I, Shabani N, Kunert-Keil C, Schindlbeck C, Gerber B, Friese K. 2005. Expression of sialyl Lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis. *Anticancer Res* 25:1615-22.

Johansson I, Bratt P, Hay DI, Schluckebier S, Stromberg N. 2000. Adhesion of *Candida albicans*, but not *Candida krusei*, to salivary statherin and mimicking host molecules. *Oral Microbiol Immunol* 15:112-8.

Kabayama K, Ito N, Honke K, Igarashi Y, Inokuchi J. 2001. Suppression of integrin expression and tumorigenicity by sulfation of lactosylceramide in 3LL Lewis lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 276:26777-83.

Karlsson KA. 1998. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates, *Mol. Microbiol.* 29:1-11.

Kawaguchi T. Cancer metastasis: characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules, including carbohydrates. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 5:39-64.

Kelly RJ, Rouquyer S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. 1995. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group alfa(1,2)-fucosyltransferase gene (*FUT2*). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the nonsecretor phenotype. *J Biol Chem* 270:4640-4649.

Koda Y, Soejima M, Liu Y-H, Kimura H. 1996. Molecular basis for secretor type alfa(1,2)-fucosyltransferase gene deficiency in a Japanese population: a fusion gene generated by unequal crossover responsible for the enzyme deficiency. *Am J Hum Genet* 59:343-350.

Liu TC, Chang JG, Lin SF et al. 2000. Lewis (*FUT3*) genotypes in Taiwanese, Thai, and Filipino populations. *Ann Hematol* 79:599-603.

Liu Y, Koda Y, Soejima M, Pang H, Schlaphoff T, Du Toit E, Kimura H. 1998. Extensive polymorphism of the *FUT2* gene in an African (Xhosa) population of South Africa. *Hum. Genet* 103:204-210

Mackenzie, I.C.; Dabelsteen, E.; Rittman, G.; Junggren, L.; TOH, H. 1995. Expression of blood group-related glycoconjugates in the junctional and other oral epithelia of rodents. *Anat Rec* 241:310-318.

Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, Ahmed I, Vijayalekshmi NR, Balaram P. 2002. Down regulation of endothelial adhesion molecules in node positive breast cancer: possible failure of host defence mechanism. *Pathol Oncol Res* 8:125-8.

Madjd Z, Parsons T, Watson NF, Spendlove I, Ellis I, Durrant LG. 2005. High expression of Lewis y/b antigens associated with decrease survival in lymph node negative breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 7:780-7.

Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clément M, Le Pendu J. 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83:565-73.

Mattos LC; Cintra JR; Sanches FE; Silva RCMA; Ruiz MA; Moreira HW. 2002. ABO, Lewis, secretor and non-secretor phenotypes in patients infected or uninfected by the *Helicobacter pylori* bacillus. *São Paulo Med J* 120:55-58.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res* 16:1215.

Mizuguchi S, Nishiyama N, Iwata T, Nishida T, Izumi N, Tsukiota T, Inoue K, Kameyama M, Suehiro S. 2007. Clinical value of serum cytokeration 19 fragment and sialyl-Lewis x in non-smal cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 83:216-21.

Moldvay, J.; Scheid, P.; Wild, P.; Nabil, K.; Siat, J.; Borrelly, J.; Marie, B.; Farre, G.; Labib, T.; Pottier, G.; Sesboue, R.; Bronner, C.; Vignaud, J.M.; Martinet, Y.; Martinet, N. 2000. Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 6:1125-1234.

Nakagoe T, Fukushima K, Nanashima A, Sawai T, Tsuji T, Jibiki MA, et al. 2001. Comparison of the expression of ABH/Lewis-related antigens in polypoid and non-polypoid growth types of colorectal carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 16:176-183.

Narimatsu H, Iwasaki H, Nishihara S et al. 1996. Genetic evidence for the Lewis enzyme, which synthesizes type-1 Lewis antigens in colon tissue, and intracellular localization of the enzyme. *Cancer Res* 56:330-8.

Nishihara S, Narimatsu H, Iwasaki H et al 1994. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. *J Biol Chem* 269:292718.

Nozoe, T.; Ezaki, T.; Baba, H.; Kakeji, Y.; Maehara, Y. 2004. Correlation of ABO blood group with clinicopathologic characteristics of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*, 17:146-149.

Oberhuber G, Kranz A, Dejaco C, Dragosics B, Mosberger I, Mayr W, Radaszkiewicz T. 1997. Blood groups Lewis (b) and ABH expression in gastric mucosa: lack of interrelation with *Helicobacter pylori* colonization and occurrence of gastric MALT lymphoma. *Gut* 41:37-42.

Ohyama C, Kanto S, Kato K, Nakano O, Arai Y, Kato T, Chen S, Fukuda MN, Fukuda M. 2003. Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl Lewis x oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13789-94.

Olsson, M.L.; Chester, M.A. 1995. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O2 versus A/O2 discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang* 69:242-247.

Orlow I, Lacombe L, Pellicer I, Rabbani F, Delgado R, Zhang ZF, Szijan I, Cordon-Cardo C. 1998. Genotypic and phenotypic characterization of the histoblood group ABO(H) in primary bladder tumors. *Int J Cancer* 75:819-24.

Orntoft TF; Holmes H; Johnson J; Hakomori S; Clausen H. 1991. Differential tissue expression of the Lewis blood antigens: enzymatic, immunohistologic and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen expression in Le(a-b-) individuals. *Blood* 77:1389-1396.

Pinkston JA, Cole P. 1996. ABO blood groups and salivary gland tumors (Alabama, United States). *Cancer Causes Control*, 7:572-4.

Procter J, Crawford J, Bunce M, Welsh KI. 1997. A rapid molecular method (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) to genotype for ABO blood

group and secretor status and its potential for organ transplants. *Tissue Antigens*. 50:475-483.

Pyd M, Rzewnicki I, Suwayach U. 1995. ABO blood groups in patients with laryngeal and hypopharyngeal cancer. *Otolaryngol Pol*, 49:396-8.

Rakha EA, Abd El Rehim D, Pinder SE, Lewis SA, Ellis IO. 2005. E-cadherin expresión in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathol* 46:685-93.

Regidor PA, Callies R, Regidor M, Schindler AE. 1998. Expression of the cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in the cytosol of breast cancer tissue, benign breast tissue and corresponding sera. *Eur J Gynaecol Oncol* 19:377-83.

Serpa J; Almeida R; Oliveira C; Silva FS; Silva E, Reis C; Le Pendu J; Oliveira, G.; Ribeiro, L.M.C.; David, L. 2003. Lewis enzyme ( $\alpha$ 1-3/4 fucosyltransferase) polymorphisms do not explain the Lewis phenotype in the gastric mucosa of a Portuguese population. *J Hum Genet* 48:183-189.

Stigendal, L.; Olsson, R.; Rydberg, L.; Samuelsson, B.E. 1984. Blood group Lewis phenotype on erythrocytes and in saliva in alcoholic pancreatitis and chronic liver disease. *J Clin Pathol* 37:778-786.

Su M, Lu SM, Tian DP, Zhao H, Li XY, Li DR, Zheng ZC. 2001. Relationship between ABO blood groups and carcinoma of esophagus and cardia in Chaosan inhabitants of China. *World J Gastroenterol* 2001, 7:657-661.

Tursen, U.; Tiftik, E.N.; Unal, S.; Gunduz, O.; Kaya, T.I.; Camdeviren, H.; Ikizoglu, G. 2005. Relationship between ABO blood groups and skin cancers. *Dermatol Online J* 11:44.

Vengelen-Tyler V. 1996. Technical manual, 12th ed. American Association of Blood Banks.

Vestergaard EM, Hein HO, Meyer H, Grunnet N, Jotgensen J, Wolf H, Orntoft TF. 1999. Reference values and biological variation for tumor marker CA 19-9 in serum for different Lewis and secretor genotypes and evaluation of secretor and Lewis genotyping in a Caucasian population. *Clin. Chem* 45:54-61.

Viale, G. Histopathology of primary breast cancer 2003. *The Breast*. 2003; 12: 391-396.

Vidas I, Delajlija M, Temmer-Vuksan B, Stipetic-Mravak M, Cindric N, Maricic D. 1999. Examining the secretor status in the saliva of patients with oral pre-cancerous lesions. *J Oral Rehab* 26:177-182.

Vogel, F. 1970. ABO blood groups and disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 22(465-475).

Watkins WM. 1995. Molecular basis of antigenic specificity in the ABO, H and Lewis blood group systems. In: Montreuil J. Vliegthart JFG, Schachter H, editors. *Glycoproteins*. Amsterdam: Elsevier Science BV, p 313-390.

Yamamoto, F.; Clausen, H.; White, T.; Marken, J.; Hakomori, S. 1990. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 345:229-233.

Yazawa, S.; OH-Kawara, H.; Nakajima, T.; Hosomi, O.; Akamatsu, A.; Kishi, K. 1996 Histo-blood group Lewis genotyping from human hairs and blood. *Jpn J Human Genet* 41:177-188.

You WC, Ma JL, Liu WD, Gail MH, Chang YS, Zhang L, et al. 2000. Blood type and family cancer history in relation to precancerous gastric lesions. *Int J Epidemiol*, 29:405-407.

Zhang W, Alt-Holland A, Margulis A, Shamis Y, Fusenig NE, Rodeck U, Garlick JÁ. 2006. E-cadherin loss promotes the initiation of squamous cell carcinoma invasion through modulation of integrin-mediated adhesion. *J Cell Sci* 15:283-91.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)