

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DO SISTEMA
SANGUÍNEO ABO ASSOCIADOS À PREDISPOSIÇÃO
E AO PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rochele Camila Rohde Pozzobon

**Santa Maria, RS, Brasil.
2010**

**EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DO SISTEMA SANGUÍNEO
ABO ASSOCIADOS À PREDISPOSIÇÃO E AO
PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA**

por

Rochele Camila Rohde Pozzobon

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Trevisan Beck

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DO SISTEMA SANGUÍNEO ABO
ASSOCIADOS À PREDISPOSIÇÃO E AO PROGNÓSTICO DE
CÂNCER DE MAMA**

elaborada por
Rochele Camila Rohde Pozzobon

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Sandra Trevisan Beck, Dra. (UFSM)
(Co-orientadora)

Cleci Menezes Moreira, Dra. (UNIPAMPA)

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 30 de agosto de 2010.

“Quando os acontecimentos escapam ao teu domínio, e te arrastam para onde não querias ir, o resultado é sempre surpreendente e enriquecedor. Forçado a desafios inesperados, vês brotar de ti forças e capacidades que desconhecias; cresces por dentro; descobres luzes novas e uma nova dimensão de todas as coisas; aprendes que não estás só. É como se alguém, com pena de ti, te conduzisse a um lugar maravilhoso onde nunca saberias chegar com os teus pequenos projetos.”

PAULO GERALDO

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Celito e Carmen, que me ensinaram os verdadeiros valores da vida,

Ao meu esposo Ricardo, que sempre me incentivou, inspirou e estimulou nos momentos de fraqueza.

“[...] talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito [...] Não somos o que deveríamos ser, mas somos o que iremos ser. Graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, Ser Supremo, que através de sua força infinita me ajudou nos momentos de angústia e desânimo, mostrando-me, sempre, a luz no final do túnel. Minha fonte de força para nunca desistir.

Aos meus amados pais, Celito e Carmen, pelos ensinamentos de que a vida é feita de desafios a serem vencidos.

Ao meu querido esposo Ricardo, pela dedicação e apoio incondicional.

Ao prof. Dr. José Edson Paz da Silva, pela orientação na realização deste trabalho.

A minha co-orientadora profa. Dra. Sandra Trevisan Beck pela amizade, ensinamentos, e contribuições na minha vida pessoal e profissional.

A todos que colaboram de alguma forma para a concretização desta etapa.

A Universidade Federal de Santa Maria por toda a minha formação profissional.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DO SISTEMA SANGUÍNEO ABO ASSOCIADOS À PREDISPOSIÇÃO E AO PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA

AUTORA: ROCHELE CAMILA ROHDE POZZOBON
ORIENTADOR: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA
CO-ORIENTADORA: SANDRA TREVISAN BECK
Santa Maria, 30 de agosto de 2010.

No Brasil, o câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais freqüente entre as mulheres. A identificação de marcadores que possam predizer o comportamento dos tumores é especialmente importante, devido, sobretudo, à variabilidade na progressão clínica da doença. Tem sido elevado o número de novos fatores prognósticos mencionados na literatura mundial nos últimos anos. A inclusão de novos fatores preditivos proporciona avanços que conduzem a uma seleção ainda melhor dos pacientes principalmente para terapias adjuntivas, podendo-se chegar a uma melhor individualização da conduta terapêutica. Muitos trabalhos mostraram uma associação entre determinado grupo sanguíneo e diferentes tipos de câncer, e têm relacionado a expressão de antígenos do sistema sanguíneo ABO nas células neoplásicas, com prognóstico mais ou menos favorável. O objetivo do trabalho foi avaliar a possibilidade da expressão de antígenos do sistema sanguíneo ABO ser aplicada como marcador de susceptibilidade genética e/ou prognóstico para o câncer de mama, e sua associação com outros fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos. Primeiramente, mediante um estudo de casos (n = 127) e controles (n = 67), analisou-se a relação entre tipo sanguíneo ABO e o risco de desenvolver câncer de mama. A freqüência do grupo sanguíneo A foi significativamente maior e a freqüência do grupo O significativamente menor nas pacientes com CM quando comparadas aos controles. Quando agrupadas as pacientes com câncer de mama segundo seu grupo sanguíneo, verificou-se um aumento estatisticamente significativo do risco para desenvolvimento de CM no tipo sanguíneo A. Os resultados sugerem que o tipo sanguíneo deva ser considerado, em conjunto com outros fatores, na compreensão do risco individual de cada paciente, podendo ser usado como um marcador de risco independente para o CM. Num segundo estudo, em um total de 80 amostras de tecidos (29 oriundas de lesões benignas da mama, e 51 de carcinoma mamário) foi realizada a pesquisa imuno-histoquímica da expressão dos antígenos sanguíneos A e B. Verificou-se uma diminuição, estatisticamente significativa, da expressão do antígeno sanguíneo A no câncer de mama, supondo-se que essa redução na expressão nos tecidos mamários malignos possa predizer um comportamento mais agressivo do tumor. Ao serem relacionados o padrão de expressão dos antígenos A e B, nas amostras de tecidos de pacientes com CM, com alguns fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos, e imuno-histoquímicos já estabelecidos, nenhuma associação significativa foi encontrada. A distribuição da expressão dos antígenos A e B em células malignas e benignas da mama não foi totalmente uniforme. A maioria das lesões benignas demonstrou manutenção da expressão

dos antígenos, mas algumas perderam a expressão, sugerindo que a perda da expressão de antígenos ABO em lesões benignas possa ser um marcador prematuro para a transformação neoplásica.

Palavras-chave: câncer de mama, grupo sanguíneo, fatores prognósticos, expressão de antígenos ABO.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

ABO BLOOD GROUP SYSTEM ANTIGENS EXPRESSION ASSOCIATED WITH THE PREDISPOSITION AND THE PROGNOSIS OF BREAST CANCER

AUTHOR: ROCHELE CAMILA ROHDE POZZOBON
ADVISER: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA
CO-ADVISER: SANDRA TREVISAN BECK
Santa Maria, 30 of august, 2010.

In Brazil, breast cancer (BC) is the most common malignant neoplastic diseases among women. The identification of markers that can predict the behavior of tumors is especially important, mainly due to variability in clinical disease progression. It has been a high number of new prognostic factors mentioned in literature in recent years. The inclusion of new predictors provides advances that lead to an even better selection of patients for adjuvant therapy primarily, being able to reach a better individualization of therapeutics. Many studies have shown an association between certain blood groups and different types of cancer, and have correlated the expression of antigens of the ABO blood groups in cancer cells, with more or less favorable prognosis. The purpose of this study was to evaluate the possibility of expression of antigens of the ABO blood system be applied as a marker of genetic susceptibility and / or prognosis for breast cancer and its association with other clinical prognostic factors, anatomopathological and immunohistochemical. First, through a case study (n = 127) and controls (n = 67), were analyzed the association between ABO blood type and the risk of developing breast cancer. The frequency of blood group A was significantly higher and frequency of group O significantly lower in patients with BC compared with controls. When the case study group was analyzed according to their blood group, there was a statistically significant increase in risk for BC in type A blood group patients. The results suggest that blood group type should be considered together with other factors to understand the individual risk of each patient and may be used as an independent risk marker for BC. In a second study, immunohistochemical were performed on a formalin-fixed paraffin sections of 80 tissue samples (29 benign lesions derived from breast and 51 breast carcinoma) to investigate the expression of the blood antigens A and B. There was a decrease in the tissue expression of antigen A in patients with BC, with statistical significance, assuming that the occurrence of decreased expression in malignant breast tissues can predict a more aggressive tumor behavior. No significant correlation was found between expression pattern of A and B tissue antigens in BC patients with clinical prognostic factors, anatomopathological and immunohistochemical characteristics. The distribution of the expression of antigens A and B in benign and malignant breast cells was not completely uniform. Most of the benign lesions showed maintenance of the expression of antigens, but some lost their expression, suggesting that the loss of ABO antigen expression in benign lesions may be an early marker for neoplastic transformation.

Keywords: breast cancer, blood group, prognosis, ABO antigens.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

TABELA 1 – Características da população estudada.....	37
TABELA 2 – Análises bivariadas das características da população estudada: risco relativo (OR) para as diferentes variáveis associadas ao câncer de mama.....	37

Capítulo 2

TABELA 1 – Número de pacientes com lesões benignas e malignas da mama por grupo sanguíneo e expressão positiva dos antígenos A e B.....	49
TABELA 2 – Distribuição da expressão dos antígenos sanguíneos A e B em tecidos malignos e benignos da mama.....	50
TABELA 3 – Padrão de expressão dos antígenos A e B em relação aos diferentes fatores prognósticos.....	50

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	68
APÊNDICE B – Declaração de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
APÊNDICE C – Técnica da Imunoperoxidase – Método Estreptavidina-Biotina.....	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Epidemiologia do câncer de mama.....	17
3.2 Carcinogênese mamária.....	17
3.3 Prevenção e detecção precoce do câncer de mama	18
3.4 Diagnóstico	19
3.5 Fatores de risco que predispõem ao câncer de mama.....	19
3.6 Fatores prognósticos.....	20
3.6.1 Fatores prognósticos Clínicos.....	21
3.6.1.1 Idade ao diagnóstico.....	21
3.6.1.2 Condição hormonal: estado menopausal.....	21
3.6.2 Fatores prognósticos Anatomopatológicos.....	22
3.6.2.1 Tamanho do tumor.....	22
3.6.2.2 Grau histológico do tumor.....	22
3.6.2.3 Comprometimento linfonodal.....	23
3.6.3 Fatores prognósticos Imuno-histoquímicos.....	23
3.6.3.1 Receptor de estrógeno (RE).....	23
3.6.3.2 Cerb-B2.....	24
3.7 Antígenos ABO e câncer.....	25
3.7.1 Sistema sanguíneo ABO.....	25
3.7.2 Relação entre grupo sanguíneo ABO e suscetibilidade ao câncer.....	26
3.7.3 Associação da expressão de antígenos sanguíneos ABO com prognóstico de	

câncer.....	27
4 CAPÍTULO 1. Artigo científico: Grupo sanguíneo ABO e risco de câncer de mama.....	31
5 CAPÍTULO 2. Artigo científico: Expressão de antígenos sanguíneos A e B em lesões mamárias malignas e benignas.....	43
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é uma das mais comuns e importantes doenças que afetam as mulheres de todo o mundo. No Brasil, é a neoplasia maligna mais frequente na mulher, tanto em incidência quanto em mortalidade (MENKE et al., 2000, INCA, 2009).

De acordo com os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de casos novos de CM esperados para o Brasil em 2010 é de quase 50 mil, com risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada a nível mundial. O Rio Grande do Sul é um dos estados que apresenta os mais altos índices deste câncer (51/100.000 mulheres).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial e a evolução genética dos precursores malignos até a doença invasiva é somente parcialmente entendida. Vários fatores de risco têm sido citados como agentes capazes de aumentar a predisposição ao CM, incluindo nuliparidade, menarca precoce, menopausa tardia, história de CM em parentes de primeiro grau, presença de uma mutação nos genes BRCA1 e/ou BRCA2, grupo sanguíneo, entre outros (HENDERSON et al., 1993; ANDRADE, 1999; BASEGIO, 1999; GULERIA et al., 2005).

A identificação de marcadores que possam predizer o comportamento dos tumores é especialmente importante no CM, devido, sobretudo, à variabilidade na progressão da doença. Os fatores prognósticos clássicos mais importantes para o CM são o tamanho do tumor e a condição dos linfonodos axilares. Outros fatores de relevância são o tipo e grau histológico do tumor, e a idade ao diagnóstico (ROCHA et al., 2002).

Além destes marcadores clássicos, marcadores tumorais bioquímicos e imuno-histoquímicos estão sendo amplamente estudados para auxiliar no estabelecimento de prognóstico e tratamento (ROCHA et al., 2002 SARAFIAN et al., 1993; ANDRIOLO, 1996; EISEMBERG & KOIFMAN, 2001,). Receptores hormonais, como receptor de estrógeno e progesterona, e oncogene *cerb-B2* estão entre os mais importantes marcadores tumorais imuno-histoquímicos para prognóstico de CM (ROSEN, 1999).

Os antígenos do grupo sanguíneo ABO tem atraído a atenção de muitos investigadores que os consideram como antígenos de diferenciação e como antígenos associados à tumor (SARAFIAN et al., 1993). Cientistas asseguram a importância da pesquisa do sistema sanguíneo ABO para o diagnóstico e terapia das doenças. Eles mostraram a associação entre tipagem sanguínea ABO e desenvolvimento de câncer, e também a relação entre expressão

dos antígenos sanguíneos ABO nas células neoplásicas com prognóstico (PRODBIELSKA & KROTKIEWSKI, 2002; BERMÚDEZ et al., 2006; WOLPIN et al., 2009). Os isoantígenos A e B são extensamente distribuídos em tecidos humanos, e a perda da expressão destes antígenos tem mostrado ser um marcador inicial na transformação cancerosa em alguns tecidos (STRAUCHEN et al., 1980).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a possibilidade da expressão de antígenos do sistema sanguíneo ABO ser aplicada como marcador de susceptibilidade genética e/ou prognóstico para o câncer de mama, e sua associação com outros fatores prognósticos clínicos (idade ao diagnóstico, condição hormonal: estado menopausal), anatomopatológicos (tamanho e grau histológico do tumor, condição dos linfonodos axilares) e imuno-histoquímicos (receptor de estrógeno e oncogene *cerbB2*).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Associar a expressão de antígenos do sistema sanguíneo ABO em hemácias e tecido mamário com predisposição e /ou prognóstico de câncer de mama.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar a prevalência dos diferentes grupos sanguíneos em mulheres submetidas à biópsia de mama, tanto em resultados malignos quanto benignos.

Avaliar a expressão dos antígenos do grupo sanguíneo ABO nas células de tumores benignos e malignos de mama através da imuno-histoquímica.

Associar a expressão dos antígenos ABO com a presença de fatores prognósticos clínicos (idade ao diagnóstico e condição hormonal: estado menopausal), anatomopatológicos (tamanho e grau histológico do tumor, comprometimento linfonodal) e imuno-histoquímicos (oncogene cerb-B2 e receptor de estrógeno).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna de maior incidência e maior causa de morte na mulher brasileira, representando cerca de 20% dos casos de neoplasias no sexo feminino e 15% das mortes (MENKE et al, 2007). De acordo com dados do INCA, o número de casos novos de CM esperados para o Brasil em 2010 é de quase 50 mil, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada a nível mundial. A frequência do CM varia nas diferentes regiões brasileiras, sendo maior nas áreas mais desenvolvidas. O Rio grande do Sul é um dos estados que apresenta os mais altos índices deste câncer. O pico de incidência encontra-se ao redor dos 50 anos, podendo ocorrer em qualquer idade, sendo raro antes dos 25 anos (ANDRADE, 1999). O CM é considerado o maior problema de saúde pública no mundo, com cerca de 5 milhões de novos casos previstos para os próximos 5 anos, tendo o seu quadro piorado bastante, pelo fato de o diagnóstico ainda ser realizado, na maioria das vezes, numa fase tardia da doença, em especial em populações menos favorecidas (MENKE et al, 2007).

3.2 Carcinogênese mamária

A carcinogênese é um processo complexo que se desenvolve em múltiplas etapas (iniciação, promoção e progressão), nas quais as células se tornam malignas através de uma série de mutações progressivas e cumulativas. Tais mutações surgem a partir de lesões provocadas pela interação de agentes físicos, químicos e biológicos com o material genético. Embora as células disponham de mecanismos de reparo que removam, eficientemente, a maior parte das lesões introduzidas em seu DNA, uma pequena parcela delas não chega a ser reparada ou é reparada de forma incorreta. Como consequência, surge a mutação. O processo de transformação neoplásica se inicia quando estas mutações alteram a função de genes que regulam direta ou indiretamente a proliferação ou a sobrevivência das células, levando a ativação de proto-oncogenes e à inativação de genes supressores da carcinogênese (MACLEOD, 2000).

A velocidade de crescimento do tumor e sua disseminação são importantes para o prognóstico das pacientes. O crescimento tumoral depende da velocidade de duplicação das células a partir do aparecimento da primeira célula tumoral, isto é, depende da velocidade do ciclo celular. O CM é uma doença heterogênea, e o tempo de duplicação celular varia de 30 a 200 dias (crescimento tumoral lento). Quando o tumor atinge um tamanho clinicamente detectável, ele já convive com o hospedeiro a aproximadamente 8 anos. Assim que o tumor atinge alguns milímetros, inicia o processo de angiogênese. A disseminação das células cancerosas ocorre via linfática e hematogênica, sendo que a propagação linfática junto ao acometimento dos linfonodos regionais tem forte relação com a sobrevida e o tipo de tratamento a ser realizado nas pacientes (MENKE et al., 2007).

3.3 Prevenção e detecção precoce do câncer de mama

Embora tenham sido identificados alguns fatores ambientais ou comportamentais associados a um risco aumentado de desenvolver o câncer de mama, estudos epidemiológicos não fornecem evidências conclusivas que justifiquem a recomendação de estratégias específicas de prevenção. É recomendada que alguns fatores de risco, especialmente a obesidade e o tabagismo, sejam alvo de ações visando à promoção à saúde e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis, em geral (INCA, 2004).

Não há consenso de que a quimioprofilaxia deva ser recomendada às mulheres assintomáticas, independente de pertencerem a grupos com risco elevado para o desenvolvimento do câncer de mama (INCA, 2004).

Para a detecção precoce do câncer de mama recomenda-se:

- Rastreamento por meio do exame clínico da mama, para as todas as mulheres a partir de 40 anos de idade, realizado anualmente. Este procedimento é ainda compreendido como parte do atendimento integral à saúde da mulher, devendo ser realizado em todas as consultas clínicas, independente da faixa etária;
- Rastreamento por mamografia, para as mulheres com idade entre 50 a 69 anos, com o máximo de dois anos entre os exames;
- Exame clínico da mama e mamografia anual, a partir dos 35 anos, para as mulheres pertencentes a grupos populacionais com risco elevado de desenvolver câncer de mama;

- Garantia de acesso ao diagnóstico, tratamento e seguimento para todas as mulheres com alterações nos exames realizados (NETTO et al., 2002; INCA, 2004).

3.4 Diagnóstico

O exame clínico da mama (ECM) é parte fundamental da propedêutica para o diagnóstico de câncer. Deve ser realizado como parte do exame físico e ginecológico, e constitui a base para a solicitação dos exames complementares. Como tal, deve contemplar os seguintes passos para sua adequada realização: inspeção estática e dinâmica, palpação das axilas e palpação da mama com a paciente em decúbito dorsal (NETTO et al., 2002; INCA, 2004).

A ultra-sonografia (USG) é o método de escolha para avaliação por imagem das lesões palpáveis, em mulheres com menos de 35 anos. Naquelas com idade igual ou superior a 35 anos, a mamografia é o método de eleição. Se houver lesões suspeitas deve-se buscar a confirmação do diagnóstico que pode ser citológico, por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), ou histológico, quando o material for obtido por punção, utilizando-se agulha grossa (PAG) ou biópsia cirúrgica convencional. A PAAF é um procedimento ambulatorial, de baixo custo, de fácil execução e raramente apresenta complicações, que permite o diagnóstico citológico das lesões. Esse procedimento dispensa o uso de anestesia. A PAG, ou *core biopsy* é também um procedimento ambulatorial, realizado sob anestesia local, que fornece material para diagnóstico histopatológico (por congelamento, quando disponível), permitindo inclusive a dosagem de receptores hormonais (INCA, 2004).

Nas lesões palpáveis com imagem negativa (mamografia e ultra-sonografia), prosseguir a investigação com PAAF, PAG ou biópsia cirúrgica (INCA, 2004).

3.5 Fatores de risco que predispõem ao câncer de mama

Apesar de numerosos estudos, a causa do câncer de mama (CM) ainda não está esclarecida. Vários fatores de risco têm sido citados como agentes capazes de aumentar a predisposição a este tipo de câncer. Entre os principais fatores destacam-se:

- fator genético (história familiar de CM): pesquisas indicam que mulheres com parentes de primeiro grau (mãe, irmã, filha) com história de CM têm um risco mais elevado para o desenvolvimento da doença (SATTIN et al., 1985, MUHONEN et al., 1997, WELSH et al., 2009). Não está bem esclarecido como os agentes genéticos induzem à neoplasia, porém acredita-se que possam influenciar a sensibilidade dos receptores hormonais nas células epiteliais (ANDRADE, 1999). Estudos têm demonstrado associação entre desenvolvimento de CM e portadores de mutações germinativas nos genes BRCA 1 e BRCA 2, que são genes supressores de tumor, os quais controlam o crescimento celular. Para as mulheres portadoras destas mutações, o risco de desenvolver este tipo de câncer excede 80% contra 10% da população em geral. Estima-se que fatores genéticos predispondo ao câncer familiar sejam responsáveis por 5 a 10% do total de câncer de mama (BASEGIO, 1998; BENNETT et al., 2000).

- fator hormonal: acredita-se que o excesso de estrógeno endógeno ou o desequilíbrio hormonal tenham papel importante no desenvolvimento do câncer de mama. Assim, pacientes com menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, poucas gestações e primigesta idosa são do grupo de maior risco, condições estas que detonam maiores períodos de exposição ao estrógeno. A obesidade também é encarada como fator de risco, pois está relacionada à maior síntese de estrógeno nas células do tecido adiposo.

- fatores ambientais: a dieta rica em gorduras, o consumo de álcool, fumo, sedentarismo, entre outros, constituem fatores predisponentes (ANDRADE, 1999).

3.6 Fatores prognósticos

A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e a sobrevida variam de paciente para paciente (CLARCK, 1996). Fatores prognósticos são parâmetros possíveis de ser mensurados no momento do diagnóstico e que servem como preditor da sobrevida do paciente. Com relação ao câncer de mama tem sido elevado o número de novos fatores mencionados na literatura mundial nos últimos anos. A inclusão de novos fatores preditivos certamente proporciona avanços que conduzem a uma seleção ainda melhor dos pacientes principalmente para terapias adjuntivas, podendo-se chegar a uma individualização da conduta terapêutica (ABREU & KOIFMAN, 2002).

3.6.1 Fatores prognósticos Clínicos

3.6.1.1 Idade ao diagnóstico

A influência da idade ao diagnóstico para o prognóstico da sobrevida no câncer de mama ainda é controversa (HOST & LUND, 1986; DE LA ROCHEFORDIERE et al., 1993; HAN & KANG, 2009). Um estudo recente mostrou que em pacientes mais jovens (menores de 35 anos), o risco de morte aumentou em 5% por cada ano de diminuição da idade (HAN & KANG, 2009). No entanto, Rezaianzadeh et al. (2009), não encontraram relação entre idade ao diagnóstico de CM e tempo de sobrevida.

Apesar das discordâncias mostradas em vários estudos, há uma predominância de estudos que destacam a faixa etária de pacientes na quarta e quinta décadas de vida, como as que apresentam melhor prognóstico. Já o pior prognóstico estaria reservado a mulheres com idade inferior a 35 anos e as com mais de 75 anos (HOST & LUND, 1986; ADAMI et al., 1986; PEER et al., 1996; KROMAN et al., 2000).

3.6.1.2 Condição hormonal: estado menopausal

Diversos autores estudaram a idade da menarca e da menopausa em mulheres com CM e não encontraram diferença estatisticamente significativa com relação às mulheres sadias (MAMEDE et al., 1992; SOBREIRA et al., 1992; HORZT et al., 1994). Uma observação contrária em relação à idade da menopausa foi abordada por Vogel (2000) em sua revisão. Considerando-se mulheres que entraram na menopausa entre os 45 e 55 anos como grupo de referência, mulheres que tiveram a menopausa aos 55 anos ou mais, possuíram 50% mais chances de desenvolverem, subseqüentemente, o câncer de mama, enquanto mulheres que cessaram a menstruação aos 45 anos ou mais jovens tiveram 30% menos chances de desenvolvê-lo. A explicação provável para essas observações seria o elevado nível de estrógenos circulantes, aos quais a mulher é exposta entre a menarca e a menopausa (ABREU & KOIFMAN, 2002).

3.6.2 Fatores prognósticos Anatomopatológicos

3.6.2.1 Tamanho do tumor

O tamanho do tumor juntamente com a condição dos linfonodos axilares são os dois mais importantes indicadores prognósticos para o CM (ABREU & KOIFMAN, 2002). Quanto maior o tamanho do tumor, maior o risco de comprometimento linfonodal, recorrência de doença e morte. Em pacientes com linfonodos negativos, o tamanho do tumor é o fator prognóstico mais poderoso e consistente da recorrência do CM. O tamanho tumoral também está sendo usado como desfecho substituto de mortalidade nas campanhas de detecção precoce do câncer de mama, tendo como ponto de corte o diâmetro de 1,5 cm, abaixo do qual a sobrevida melhora consideravelmente. A avaliação histológica do diâmetro tumoral (pT) também tem sua importância, quando considerado o prognóstico das mulheres com câncer de mama em estágios mais avançados (MENKE et al., 2007). Bonaddona et. al. (1998) descreveram sobrevida de 65, 36 e 16% em tumores menores de 5 cm, entre 5 a 10 cm e mais de 10 cm, respectivamente.

3.6.2.2 Grau Histológico do tumor

O grau histológico está claramente relacionado à possibilidade de recidiva mamária à distância. Seu emprego no prognóstico de CM possui controvérsias, devido, principalmente, a reprodutibilidade entre diferentes patologistas e entre diferentes serviços, visto a subjetividade de sua determinação (ABREU & KOIFMAN, 2002).

Os sistemas de estadiamento mais utilizados para o CM são a classificação de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), o qual foi modificado pelo grupo de Nottingham. O grau de diferenciação é avaliado de acordo com a habilidade do tumor em originar formações glandulares, papilares ou tubulares. O pleomorfismo descreve a forma do núcleo. E o índice mitótico avalia o número de mitoses encontradas no tumor. A soma dos pontos desses 3 componentes determina os graus: I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (pouco diferenciado). Quanto menos diferenciado o tumor, pior será o prognóstico (MENKE

et al., 2007). Segundo um estudo feito por Pinder et al. (1995) a sobrevida em 10 anos de mulheres com carcinoma mamário grau I foi de aproximadamente 85%, enquanto que nas com grau III esta taxa caiu para 45%.

3.6.2.3 Comprometimento linfonodal

O acometimento linfonodal-axilar é o fator prognóstico mais poderoso para as pacientes com CM recém diagnosticado. Os linfonodos axilares são as principais vias de drenagem das células tumorais do carcinoma da mama e não existem dúvidas sobre sua importância no prognóstico e tratamento desta patologia (BRONDI, 1987). As pacientes com axila positiva apresentam, em média, uma sobrevida em 5 anos de 21%, quando comparadas com as mulheres com axila negativa com uma sobrevida média de 75% (VALERO et al., 1996). O número absoluto de linfonodos mamários acometidos também apresenta importância significativa: pacientes com quatro ou mais linfonodos positivos têm pior prognóstico (TOOKEL, et. al., 1986; CARTER et. al., 1989). A maioria dos ensaios clínicos estratifica as pacientes em grupos de acordo com o número de linfonodos positivos: linfonodos negativos, 1 a 3 linfonodos positivos, 4 a 9 linfonodos positivos, e 10 ou mais linfonodos positivos (MENKE et al., 2007).

3.6.3 Fatores prognósticos Imuno-histoquímicos

3.6.3.1 Receptor de estrógeno (RE)

Beatson, em 1896, sugeriu pela primeira vez a dependência hormonal de um tumor, quando observou a regressão de lesões tumorais mamárias após ooforectomia. Em 1971, Jensen et al. demonstraram a existência de receptores hormonais, que são proteínas nucleares responsáveis pela mediação dos efeitos do estrógeno no epitélio mamário. A introdução do método de avaliação dos receptores hormonais nos anos setenta possibilitou o melhor entendimento desta técnica e sua relação direta com o prognóstico das pacientes (GAYLE,

2001). A imuno-histoquímica (IMH) é a técnica mais utilizada atualmente, por apresentar inúmeras vantagens: metodologia relativamente simples, rápida e de baixo custo, necessita de pequena amostra de tecido, permite a identificação de diferentes componentes teciduais, entre outras. A IMH detecta a super expressão do produto gênico (ALBERTS et al., 1996; TORRES et al., 1996).

O receptor de estrógeno tem a função de fator de transcrição, quando ligado ao hormônio. O crescimento de muitos cânceres de mama depende do efeito proliferativo do estrógeno e esta resposta esta correlacionada com a presença de seu receptor. Sua presença é demonstrada quando a paciente com tumor receptor positivo é tratada com antiestrogênio, o qual bloqueia o efeito proliferativo do estrógeno endógeno (FUQUA, 1994). Desde que foi demonstrado que o crescimento dos carcinomas de mama é regulado por estrógenos, a presença de receptores específicos para o estrogênio em tumores mamários e a terapia ablativa desse hormônio tem produzido remissão clínica nesses pacientes. Os tumores receptores negativos têm pouca possibilidade de regressão pela terapia endócrina, enquanto que, nos positivos, a taxa de resposta varia de 40% a 80% (PISANI, 1991). Muitos autores mostram que existe uma associação positiva entre a presença de receptor de estrógeno e um prognóstico mais favorável. Pacientes com tumores RE-positivos apresentam intervalo livre de doença de 74% e sobrevida geral de 92%, em cinco anos, enquanto tumores RE-negativos apresentam intervalo livre de doença e sobrevida geral de 66% e 82%, respectivamente (OSBORNE, 1990; BECKMANN et al., 1996).

3.6.3.2 Cerb-B2

Proto-oncogenes são genes que codificam proteínas que ajudam a regular o crescimento e diferenciação celular. Ao sofrerem mutação, alteram a proteína, desregulando a função celular. O proto-oncogene HER-2/neu (cerb-B2) está localizado no cromossomo 17 e codifica uma proteína transmembrana, com atividade semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico. A sobre-expressão do HER-2 origina um aumento do crescimento das células tumorais e um comportamento mais agressivo da doença (ERNBERG, 1990; HAERSLEV & JACOBSEN, 1995).

A proteína cerbB-2 é expressa em níveis baixos nas células epiteliais do tecido mamário normal. Segundo um estudo de Pavelic et al. (1992), a expressão dessa proteína em

tecido normal e tumoral (*in situ* e invasivo) de mama, por imuno-histoquímica, é de 29% de positividade nos tumores *in situ*, 45% nos invasivos e, nenhum, em tecido normal. Sua amplificação e super expressão está relacionada a um maior grau histológico, aumento da agressividade tumoral, redução da sobrevida, resposta ruim a hormonioterapia e aumento da recorrência e mortalidade. Portanto é relatada como indicador de mau prognóstico no CM (NISKANEN et al., 1997; MENKE et al., 2007). Ao avaliarem-se alguns fatores prognósticos de associação entre os tumores com *cerb-B2*, Andachi et al. (2004) assinalaram uma associação direta entre a positividade do *cerb-B2* e os tumores com diâmetros maiores, grau histológico elevado e receptores hormonais negativos . Com relação às metástases, sabe-se que as pacientes com a expressão aumentada de *cerb-B2* estão mais propensas a desenvolvê-las, observando-se, após a sua detecção, um curto período de sobrevida (DHINGRA & HORTOBAGYI, 1996). Como preditor de resposta terapêutica seu papel é controverso, podendo as pacientes com a expressão aumentada de *cerb-B2* apresentar uma maior resistência às drogas quimioterápicas (TETU & BRISSON, 1994).

3.7 Antígenos ABO e câncer

3.7.1 Sistema Sanguíneo ABO

O sistema do grupo sanguíneo ABO, descoberto por Karl Landsteiner no começo do século XX, é, até hoje, considerado o mais importante sistema de grupos sanguíneos. Sua importância está além da medicina transfusional, sendo utilizado em estudos genéticos, de transplante de órgãos, e mais recentemente de câncer (LEE et al., 1984; LEE & REID, 2000; YAMAMOTO, 2004).

Embora os antígenos ABO tenham sido inicialmente identificados como antígenos da superfície (membrana) do eritrócito e a sua significância tenha sido atribuída principalmente a sorologia, logo se tornou evidente que esses antígenos estão amplamente distribuídos nas células de diferentes órgãos. Os antígenos foram encontrados na maioria dos tecidos epiteliais, tais como tecido mamário, prostático, intestinal, gástrico, entre outros, e também nas secreções (RAVN & DABELSTEEN, 2000).

Os antígenos A e B são carboidratos presentes nas superfícies das células e nas secreções, sintetizados pela ação de enzimas glicosiltransferases específicas, codificadas no locus ABO. O antígeno H é um carboidrato produzido pela ação da enzima α -2-L-fucosiltransferase codificada pelo gene H. A expressão dos antígenos ABO é controlada por um conjunto independente de genes, tais como, o locus ABO localizado no braço longo do cromossomo 9, e o gene H determinado no cromossomo 19 (LEE & RAID, 2000; BATISSOCO & NOVARETTI, 2003).

O antígeno H é o substrato básico para a ação das enzimas glicosiltransferases codificadas pelos genes A e B. Em seguida, essas enzimas são responsáveis pela transferência dos resíduos específicos de açúcar N-acetil-D-galactosamina ou D-galactose ao substrato H, convertendo-os em antígenos A ou B, respectivamente, originando a heterogeneidade fenotípica do sistema ABO (BATISSOCO & NOVARETTI, 2003). O grupo sanguíneo A tem a atividade da glicosiltransferase codificada pelo gene A, originando o antígeno sanguíneo A. O grupo B tem a atividade de uma glicosiltransferase diferente, codificada pelo gene B, a qual origina o antígeno B. Já o grupo sanguíneo AB apresenta a atividade das duas transferases (codificadas pelos genes A e B), tendo então os dois antígenos A e B. E o grupo O não possui as transferases A e B, mas apresenta o antígeno H, sendo esse o antígeno encontrado na superfície das hemácias desse grupo (BATISSOCO & NOVARETTI, 2003).

3.7 2 Relação entre grupo sanguíneo ABO e suscetibilidade ao câncer

O grupo sanguíneo ABO têm sido associado com muitas doenças, especialmente com câncer, embora a explicação para isso ainda não esteja clara. Desde o primeiro relato de uma associação entre grupo sanguíneo A e câncer gástrico por Aird et al. (1953), muitos outros estudos tem documentado a relação entre suscetibilidade à câncer e grupo sanguíneo.

Segundo Vioque e Walker (1991), ao avaliarem a relação entre câncer pancreático e grupo sanguíneo, há um risco modesto entre pessoas do grupo A desenvolverem a doença; por outro lado, Annese et al (1990) demonstraram um número aumentado de casos de câncer pancreático em pacientes do grupo B e um número reduzido em pacientes do grupo O. Também Wolpin et al (2009) observaram um maior risco, estatisticamente significativo, para incidência de câncer pancreático em pacientes com antígenos A e/ou B comparados com o

grupo sanguíneo O. Um risco elevado foi observado nos pacientes do grupo sanguíneo B, e um risco intermediário para os pacientes dos grupos A e AB.

Um estudo piloto intitulado “Relação entre resultados de PSA e grupos sanguíneos ABO: uma amostra de 2521 pacientes” mostrou um maior risco de pacientes do grupo sanguíneo B desenvolverem adenocarcinoma prostático (BECKER et al., 2003).

Bermúdez et al (2006), encontraram uma associação significativa entre grupo sanguíneo A e câncer gástrico.

Ao estudar a relação entre grupo sanguíneo ABO e carcinoma de esôfago e de cárdia, Su et al (2001) concluíram que o grupo sanguíneo B está associado a uma maior incidência de câncer de cárdia e esôfago em uma população da China.

Vários estudos tem sugerido uma associação entre câncer de ovário e grupo sanguíneo A, considerando-se esse último como um marcador genético para a doença (OSBORN & DE GEORGE, 1963; MORI et al., 1984; HENDERSON et al., 1993).

De acordo com Guleria et al. (2005), em pacientes com câncer de mama e do trato gastro-intestinal, a incidência dos grupos sanguíneos A e B, respectivamente, foi significativamente mais alta que nos controles. Resultados semelhantes ao estudo descrito acima foram encontrados por Stamatakos et al. (2009), onde o grupo sanguíneo A mostrou forte associação com câncer de mama e com pior prognóstico.

Uma das sugestões do mecanismo pelo qual as pessoas do grupo A tem maior risco de câncer envolve uma diminuição da vigilância imunológica. Alguns tumores, especialmente de estômago, cólon, mama e ovário, expressam o antígeno de Forssmann, o qual é estruturalmente similar ao determinante antigênico A. Pessoas de outros grupos sanguíneos (B e O) produzem anticorpos anti-A. Devido a essa semelhança estrutural, esses anticorpos anti-A podem atacar também células cancerosas que expressam o antígeno de Forssmann, tendo-se assim um efeito protetor desses grupos sanguíneos no câncer. Portanto, as pessoas do grupo A e AB, por apresentarem o antígeno A, podem ter uma diminuição da resposta imunológica ao tumor, sendo assim, mais suscetíveis ao desenvolvimento de cânceres (HENDERSON et al., 1993).

3.7.3 Associação da expressão de antígenos sanguíneos ABO com prognóstico de câncer

Além da maior prevalência de um grupo sanguíneo em determinada neoplasia, alguns estudos demonstram que as células neoplásicas perdem ou diminuem a expressão dos antígenos A ou B, dependendo do grupo sanguíneo do paciente. Esse acontecimento se correlaciona com o desenvolvimento e agressividade da doença (YAMAMOTO, 2004; HAKOMORI, 1999).

Antígenos do grupo sanguíneo ABO são carboidratos expressos na superfície dos eritrócitos e em vários outros tipos de células epiteliais, com importante função na adesão intercelular. Modificações genéticas na glicosilação desses carboidratos de superfície celular têm sido descritas no câncer (HAKOMORI, 1999). Diversos estudos demonstraram que a expressão de antígenos do grupo sanguíneo ABO está alterada no câncer humano. A perda da expressão dos antígenos A e B gera diminuição da adesão intercelular, aumentando a motilidade das células, facilitando a ocorrência de metástases (STRAUCHEN et al., 1980; LEE & REID, 2000).

Em investigações laboratoriais, as células de pacientes com câncer pancreático expressaram os antígenos ABO em sua superfície com padrões de expressão diferentes daqueles das células pancreáticas normais; sugerindo que ocorrem modificações nas glicosiltransferases durante a tumorigênese pancreática (WOLPIN et al., 2009).

Em 1990, Perlman e Epstein demonstraram que os antígenos de grupo sanguíneo poderiam atuar como marcadores na oncogênese. O estudo analisou a expressão dos antígenos A e B no tecido prostático utilizando anticorpos monoclonais e evidenciou a sua ausência em células de adenocarcinomas e displasias, suportando a idéia de que algum distúrbio enzimático das transferases ocorrera.

Amostras de tecido gástrico foram avaliadas por método imuno-histoquímico para determinar a distribuição de antígenos ABO. Comparando casos de neoplasia com casos sem neoplasia gástrica, foi observado que ocorreu perda focal dos antígenos ABO, enquanto que o tecido normal apresentou os antígenos no epitélio foveolar (HIROHASHI, 1984a). A mesma forma de estudo de distribuição dos antígenos ABO foi realizada no tecido pulmonar normal e com um tipo de adenocarcinoma. Os antígenos A, B e H foram reduzidos ou ausentes nas células neoplásicas (HIROHASHI, 1984b).

A análise imuno-histoquímica para a pesquisa de antígenos sanguíneos A e B em amostras benignas e malignas do urotélio da bexiga demonstrou a perda da expressão dos antígenos naqueles com doença maligna. Nessas células houve perda da atividade das transferases específicas dos carboidratos A e B (ORNTOFT et. al, 1988). Em 1996 o mesmo grupo de pesquisa avaliou o mecanismo para a perda da atividade das glicosiltransferases A e

B dos antígenos sanguíneos. Através da metodologia da reação em cadeia da polimerase, a presença do RNAm do ABO ocorreu apenas no urotélio normal e em tumores de baixo grau enquanto que em tumores de alto grau estava ausente, sugerindo que a glicosilação dos antígenos ABO é regulada a nível de RNAm e que o mecanismo associado com a proliferação celular desencadeia a diminuição do RNAm. (ORNTOFT, 1996).

De acordo com Le Pendu et al. (2001) a localização do gene ABO no cromossomo 9 é uma região sensível a sofrer rearranjos e principalmente perda da heterozigosidade. Como consequência pode ocorrer a perda das transferases responsáveis pela transferência dos açúcares na superfície das células, originando ausência ou diminuição da expressão dos antígenos ABO

Na análise de carcinomas orais foi observada a perda da expressão dos antígenos A e B nas lesões. Além disso, os autores também analisaram o genótipo do grupo sanguíneo e observaram que em alguns casos houve perda dos alelos do grupo ABO, e por isso não havia a expressão no tecido. Os autores defendem a idéia de que a perda dos antígenos nas células carcinomatosas é uma alteração precoce e a modificação de seus precursores genéticos é um evento tardio do desenvolvimento neoplásico (GAO et al, 2004).

Strauchen et al. (1980) ao estudar a expressão dos antígenos ABO em lesões malignas (carcinoma ductal) e benignas (doença fibrocística) da mama, verificou uma diminuição da expressão em ambas as lesões. A perda prematura da expressão do isoantígeno AB nas lesões histologicamente benignas credita um possível elo entre a doença fibrocística e o carcinoma mamário, podendo ser um marcador de pré- neoplasia. Em contraste com outros tecidos, a diminuição da expressão do isoantígeno AB não é necessariamente evidência de malignidade.

No ano de 1984, Lee et al. demonstraram a perda não universal da expressão dos antígenos AB em carcinomas invasivos da mama, através da técnica de imuno-histoquímica. Os carcinomas das pacientes com grupos sanguíneos A, B e AB demonstraram perda total da expressão do isoantígeno em 64%, 77% e 74% dos casos, respectivamente. Mesmo os carcinomas com perda total dos antígenos A e B apresentaram expressão variável do antígeno H, o substrato precursor dos antígenos A e B. Um provável mecanismo para a diminuição da expressão do antígeno é a perda ou redução das enzimas glicosiltransferases necessárias para a síntese dos determinantes A, B e H. Essa perda das transferases como resultado da transformação maligna, conseqüentemente, conduz a falha na síntese dos isoantígenos A e B, e ao acúmulo do antígeno H. Isso pode explicar a presença do antígeno H mesmo nos carcinomas que perderam os antígenos A e B. Os resultados desse estudo indicaram não haver uma relação estatisticamente significativa entre a perda da expressão dos antígenos com

intervalo de recorrência da doença, metástases e outros parâmetros. Sendo assim, eles concluíram que a expressão de antígenos ABO em câncer de mama não é útil para avaliação de prognóstico.

4 CAPÍTULO 1

Grupo sanguíneo ABO e risco de câncer de mama

ABO blood group and risk of breast cancer

Rochele C. R. Pozzobon, Jose E. P. da Silva, Sandra T. Beck

**Artigo a ser submetido para publicação na revista The Breast Journal em setembro de
2010**

Grupo sanguíneo ABO e risco de câncer de mama

ABO blood group and risk of breast cancer

Rochele C. R. Pozzobon¹, Jose E. P. da Silva², Sandra T. Beck²

¹ Farmacêutica Bioquímica, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Av. Roraima 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: chelerothde@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

² Farmacêutico Bioquímico, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFSM.

Resumo

Vários fatores de risco, em especial, o grupo sanguíneo ABO, são citados como agentes capazes de aumentar a predisposição ao câncer de mama (CM). Existe uma alta incidência do grupo sanguíneo A em vários tipos de câncer, tais como, de útero, ovário, pâncreas, cólon e mama. O objetivo principal desse estudo foi determinar a possibilidade de associação entre determinado grupo sanguíneo e a presença de câncer de mama em uma população brasileira de pacientes atendidos na unidade de mastologia do Hospital Universitário de Santa Maria. Realizou-se um estudo de casos e controles, onde os casos (n=127) constituíram pacientes que realizaram biópsia com diagnóstico de câncer de mama. As biópsias com diagnóstico de lesão benigna da mama foram usadas como controle (n=67). Fatores como o grupo sanguíneo, idade, história familiar de câncer de mama e estado menopausal foram avaliados. Os fatores de risco estatisticamente significativos associados com a aparição de CM na população estudada foram o grupo sanguíneo A, a idade superior a 45 anos e estar na menopausa. Também foi verificado que as mulheres do grupo A possuem um risco aproximadamente 8 vezes maior para o desenvolvimento de câncer de mama que as de outros grupos sanguíneos (OR = 8,44; IC: 3,5-19,87; p<0,0001). Os resultados encontrados sugerem que o tipo sanguíneo deva ser considerado, em conjunto com outros fatores de risco, na compreensão do risco individual de cada paciente, podendo ser usado como um marcador de predisposição independente para o CM.

Palavras chave: grupo sanguíneo ABO, predisposição, câncer de mama.

Abstract

Several risk factors, in particular the ABO blood group, are known as factor that increases the predisposition to breast cancer. There is a high incidence of blood group A in a variety of cancers such as uterus, ovary, pancreas, colon and breast. The purpose of this study was to determine the correlation between blood groups type and the presence of breast cancer in a Brazilian population of patients treated in University Hospital of Santa Maria. In the present study, patients who breast biopsy result indicated cancer, were considered cases (n = 127) and women, with normal pathology results (no malignancy), were used as controls (n = 67). Factors such as blood group, age, family history of breast cancer and menopausal status were evaluated. The statistically significant risk factors that appear to show correlation with breast cancer in this study were: the blood group A, age over 45 years and be in menopause. We also demonstrated that women in group A have an approximately eight times greater risk for developing breast cancer than other blood groups (OR = 8.44, CI: 3.5 to 19.87, $p < 0.0001$). The results suggest that blood type needs to be considered together with other risk factors to understand the individual patient's risk, and could be used as an independent marker of susceptibility to BC.

Keywords: ABO blood group, predisposition, breast cancer.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer de mama (CM) é um problema de saúde pública, sendo a principal causa de morte por neoplasia no sexo feminino, tanto no estado do Rio Grande do Sul, como no Brasil. Vários fatores de risco são citados como agentes capazes de aumentar a predisposição a este tipo de câncer, incluindo idade avançada, história de CM em parentes de primeiro grau, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade ou primeira gravidez em idade acima de 30 anos, entre outros (HENDERSON et al., 1993; ANDRADE, 1999; BASEGIO, 1999). O grupo sanguíneo ABO têm sido associado com muitas doenças, especialmente com câncer, embora a explicação para isso ainda não esteja completamente entendida. Desde o primeiro relato de uma associação entre grupo sanguíneo A e câncer gástrico por Aird et al. (1953), muitos outros estudos tem documentado a relação entre

suscetibilidade ao câncer e grupo sanguíneo ABO . Existe uma alta incidência do grupo sanguíneo A em vários tipos de câncer, como de útero, ovário, pâncreas, cólon e mama (OSBORN & DE GEORGE, 1963; MORI et al., 1984; VIOQUE & WALKER, 1991; HENDERSON et al., 1993; BERMÚDEZ et al., 2006).

Antígenos do grupo sanguíneo ABO são carboidratos expressos na superfície dos eritrócitos e em vários outros tipos de células epiteliais, incluindo as células da mama, com importante função na adesão intercelular (HAKOMORI, 1999). São sintetizados pela ação de enzimas glicosiltransferases específicas, codificadas no locus ABO. O antígeno H é um carboidrato produzido pela ação da enzima α -2-L-fucosiltransferase codificada pelo gene H. A expressão dos antígenos ABO é controlada por um conjunto independente de genes, tais como, o locus ABO localizado no braço longo do cromossomo 9, e o gene H determinado no cromossomo 19 (LEE & RAID, 2000; BATISSOCO & NOVARETTI, 2003).

O antígeno H é o substrato básico para a ação das enzimas glicosiltransferases codificadas pelos genes A e B. Em seguida, essas enzimas são responsáveis pela transferência dos resíduos específicos de açúcar N-acetil-D-galactosamina ou D-galactose ao substrato H, convertendo-os em antígenos A ou B, respectivamente, originando a heterogeneidade fenotípica do sistema ABO (BATISSOCO & NOVARETTI, 2003).

Além da maior prevalência de um grupo sanguíneo em determinada neoplasia, alguns estudos demonstram que as células neoplásicas perdem ou diminuem a expressão dos antígenos A ou B, dependendo do grupo sanguíneo do paciente (YAMAMOTO, 2004; HAKOMORI, 1999). Modificações genéticas na glicosilação desses carboidratos de superfície celular foram descritas no câncer (HAKOMORI, 1999). A perda da expressão dos antígenos A e B gera diminuição da adesão intercelular, aumentando a motilidade das células, facilitando a ocorrência de metástases (STRAUCHEN et al., 1980; LEE & REID, 2000).

O objetivo principal desse estudo foi determinar a possibilidade de associação entre determinado grupo sanguíneo e a presença de câncer de mama em uma população brasileira de pacientes atendidos na unidade de mastologia do Hospital Universitário de Santa Maria.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de casos e controles. Os casos (n=127) foram obtidos através de prontuários de pacientes que realizaram biópsia no setor de Patologia Clínica do Hospital

Universitário de Santa Maria, com diagnóstico de câncer de mama, durante o período de agosto de 2005 a dezembro de 2008. As biópsias com diagnóstico de lesão benigna da mama, no referido local e período, constituíram o grupo controle (n=67). Fatores como o grupo sanguíneo, idade, história familiar de câncer de mama e estado menopausal foram avaliados. O grupo sanguíneo das pacientes foi obtido de seus prontuários, onde se encontrava o resultado do exame para tipagem sanguínea. Os demais fatores foram obtidos da história clínica das pacientes, também contidos nos prontuários médicos. Nos casos em que as informações estavam incompletas, realizou-se contato telefônico para esclarecimento das dúvidas. Pacientes onde não foi possível obter informações completas dos fatores avaliados foram excluídas do estudo.

A análise estatística dos dados foi realizada através do software STATISTICA 7.0. Para estimar o risco relativo (RR) associado com o tipo de sangue e as outras variáveis preditoras (idade, história familiar de câncer de mama e estado menopausal), calcularam-se as razões de *odds* (*odds ratios* – OR), com intervalo de confiança de 95%. As diferenças nas distribuições das variáveis entre grupo controle e casos foram avaliadas usando o teste do Qui-quadrado.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (número do processo: 23081003197/2007-66; certificado de apresentação para apreciação ética: 0048.0.243.000.07).

RESULTADOS

As características da população estudada encontram-se na tabela 1. As pacientes com câncer de mama (CM) têm uma média de idade de 57,89 anos, com idade mínima de 32 e máxima de 95 anos, sendo que 82,68% tinham mais de 45 anos no momento do diagnóstico. A média da idade nos controles foi de 41,45 anos, com uma idade mínima de 16 e máxima de 75 anos.

Com respeito ao estado menopausal a grande maioria dos controles (79,11%) não estão na menopausa, enquanto que um pouco mais da metade das pacientes com CM (56,69%) encontram-se no estado menopausal.

Segundo a presença de antecedentes familiares de primeiro grau com CM encontramos uma distribuição semelhante entre casos e controles: 88,98% das pacientes com carcinoma

mamário e 95,52% dos controles não tinham história prévia de parentes de primeiro grau com CM.

A frequência da distribuição dos grupos sanguíneos na população total (casos e controles) estudada foi de 44,84% para o grupo O, 36,08% para o grupo A, 12,89% para o grupo B e 6,19% para o grupo AB. Esses resultados são semelhantes à distribuição dos grupos sanguíneos na população brasileira. Agrupando as pacientes com CM segundo seu grupo sanguíneo foi possível verificar que 49,61% (63 pacientes) correspondiam ao grupo A, seguidos por 33,07% (42 pacientes) do grupo O, 10,24% (13 pacientes) do grupo B, e 7,09% (09 pacientes) do grupo sanguíneo AB. Nos controles a distribuição dos grupos sanguíneos encontrada foi de 10,45% (07 pacientes) pertencentes ao grupo A, 67,16% (45 pacientes) pertencentes ao grupo O, 17,91% (12 pacientes) ao B, e 4,48% (03 pacientes) ao grupo sanguíneo AB. A frequência do grupo sanguíneo A foi significativamente maior e a frequência do grupo O significativamente menor nas pacientes com CM quando comparadas aos controles (tabela 1).

Ao ser realizada uma análise de regressão logística encontrou-se uma associação estatisticamente significativa entre câncer de mama e grupo sanguíneo A, mostrando um OR de 8,44 (IC: 3,5-19,87; $p < 0,0001$) (tabela 2). Ficou evidente que 49,61% das pacientes com CM pertenciam ao grupo A, e 50,39% pertenciam aos outros grupos sanguíneos restantes (O, B e AB). Ter idade ao diagnóstico inferior ou igual a 45 anos apresentou-se como um fator protetor, com um OR de 0,08 (IC: 0,04-0,16; $p < 0,0001$), pois apenas 17,32% das pacientes com CM eram menores de 45 anos, e 82,68% tinham idade superior a 45 anos (tabela 2). Não se encontrou associação significativa entre CM e história prévia de familiares de primeiro grau com carcinoma mamário, com OR=2,64 (IC: 0,73-9,55; $p = 0,1252$) (tabela 2). Com relação ao estado menopausal, mostrou-se um maior risco das mulheres menopausadas desenvolverem CM, OR: 4,96 (IC: 2,5-9,84; $p < 0,0001$) (tabela 2).

Tabela 1. Características da população estudada

Características	Casos (pacientes com CM) (n=127)	Controles (n=67)
Idade		
≤ 45 anos	(22) 17,32%	(49) 73,13%
> 45 anos	(105) 82,68%	(18) 26,87%
Menopausa		
Sim	(72) 56,69%	(14) 20,89%
Não	(55) 43,31%	(53) 79,11%
Familiar com CM		
Sim	(14) 11,02%	(03) 4,48%
Não	(113) 88,98%	(64) 95,52%
Grupo sanguíneo		
A	(63) 49,61%	(07) 10,45%
B	(13) 10,24%	(12) 17,91%
AB	(09) 7,09%	(03) 4,48%
O	(42) 33,07%	(45) 67,16%

Tabela 2. Análises bivariadas das características da população estudada: risco relativo (OR) para as diferentes variáveis associadas ao câncer de mama

Características	Casos (n=127)	Controles (n=67)	Valor de <i>p</i>	OR	Intervalo de Confiança 95%
Idade					
≤ 45 anos	22	49	<i>p</i> <0,001	0,08	0,04 – 0,16
> 45 anos	105	18			
Menopausa					
Sim	72	14	<i>p</i> <0,001	4,96	2,50 – 9,84
Não	55	53			
Familiar com CM					
Sim	14	03	0,1252	2,64	0,73 – 9,55
Não	113	64			
Grupo Sanguíneo					
A	63	07	<i>p</i> <0,001	8,44	3,58 – 19,90
Outros (B, AB e O)	64	60			

DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado uma associação entre determinado grupo sanguíneo e diferentes tipos de câncer, e têm relacionado a expressão de antígenos do sistema sanguíneo ABO nas células neoplásicas, com prognóstico mais ou menos favorável (VIOQUE & WALKER, 1991; YOU et al., 2000; RAVN & DABELSTEEN, 2000).

A frequência dos grupos sanguíneos na população total estudada foi semelhante a encontrada em outros trabalhos. O grupo O tem sido o mais prevalente, seguido pelo grupo A. Taxas menores são encontradas para os grupos B e AB (FONTANA et al., 2006).

No presente estudo, agrupando as pacientes com câncer de mama segundo seu grupo sanguíneo, foi encontrado um aumento estatisticamente significativo do risco para desenvolvimento de CM no tipo sanguíneo A, enquanto o grupo sanguíneo O mostrou-se como um fator de proteção.

Essa associação do grupo sanguíneo ABO com muitas doenças, especialmente com câncer, vêm sendo pesquisada há alguns anos, porém a explicação para isso ainda não está completamente esclarecida. Desde o primeiro relato de uma associação entre grupo sanguíneo A e câncer gástrico muitos outros estudos tem documentado a relação entre suscetibilidade à câncer e grupo sanguíneo (AIRD et al., 1953). Indivíduos do grupo A demonstraram um risco moderadamente aumentado para o desenvolvimento de câncer gástrico, pancreático, de ovário, entre outros (OSBORN & DE GEORGE, 1963; MORI et al., 1984; VIOQUE & WALKER, 1991; HENDERSON et al., 1993; BERMÚDEZ et al., 2006; WOLPIN et al., 2009).

Mourali et al. (1980), ao avaliar características da rápida progressão do câncer de mama em mulheres na Tunísia, encontrou um risco aumentado para diagnóstico positivo no tipo sanguíneo A. De acordo com Guleria et al. (2005), também estudando pacientes com câncer de mama, a incidência do grupo sanguíneo A foi significativamente mais alta que nos controles. Resultados semelhantes aos descritos acima foram encontrados por Stamatakis et al. (2009), onde o grupo sanguíneo A mostrou forte associação com CM e com pior prognóstico. No entanto, segundo um estudo de Jayant et al. (1971), não houve relação do câncer de mama com nenhum grupo sanguíneo.

Especificamente no CM, Vogel (1970) informou que os grupos sanguíneos ABO podem influenciar o prognóstico, sendo um fator prognóstico independente. Diversos pesquisadores reconheceram igualmente os grupos sanguíneos ABO como um fator de

predisposição ou prognóstico no CM (MAJUPURIA et al., 1966; ANDERSON, 1971; COSTANTINI et al., 1990; GULERIA et al., 2005). Eles demonstraram que mulheres com grupo sanguíneo A são geralmente mais propensas a desenvolver neoplasias com pior prognóstico e comportamento biológico mais agressivo. Em contraste, as mulheres do grupo sanguíneo O podem ter alguma proteção contra o desenvolvimento de CM, e mesmo quando acometidas pela doença, o prognóstico é mais favorável (SKOLNICK et al., 1984; ANDERSON, 1971; EASTON, 2002). No presente estudo, também foi evidenciado que o grupo sanguíneo A pode ser considerado como um fator de predisposição ao CM, concordando com os dados descritos na literatura.

Uma das possibilidades sugeridas para explicar o mecanismo pelo qual as pessoas do grupo A tem maior risco de câncer, envolve uma diminuição da vigilância imunológica. Alguns tumores, especialmente de estômago, cólon, mama e ovário, expressam o antígeno de Forssmann, o qual é estruturalmente similar ao determinante antigênico A. Pessoas de outros grupos sanguíneos (B e O) produzem anticorpos anti-A. Devido a semelhança estrutural, esses anticorpos anti-A podem atacar também células cancerosas que expressam o antígeno de Forssmann, tendo-se assim um efeito protetor desses grupos sanguíneos no câncer. Portanto, as pessoas do grupo A e AB, por apresentarem o antígeno A, podem ter uma diminuição da resposta imunológica ao tumor, sendo assim, mais suscetíveis ao desenvolvimento de cânceres (HENDERSON et al., 1993).

Os fatores de risco estatisticamente significativos associados com a aparição de CM na população estudada foram o grupo sanguíneo A, a idade superior a 45 anos e estar na menopausa. Também demonstramos que as mulheres do grupo A possuem um risco aproximadamente 8 vezes maior para o desenvolvimento de câncer de mama que as de outros grupos sanguíneos.

Os resultados encontrados sugerem que o tipo sanguíneo deva ser considerado, em conjunto com outros fatores de risco, na compreensão do risco individual de cada paciente, podendo ser usado como um marcador de risco independente para o CM. No entanto, investigações adicionais, com um maior número de pacientes e controles são necessárias para confirmação desses achados e para determinar os mecanismos potenciais dos antígenos ABO na influência do risco de câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, I.; BENTALL, H. H.; FRASER ROBERTS, J. A. A relationship between cancer of the stomach and ABO blood group. **British Medical Journal**. v. 1, p. 799-801, 1953.

ANDERSON, D. E. Some characteristics of familial breast cancer. **Cancer**. v. 28, 1500-1504, 1971.

ANDRADE, L. A. Aparelho genital feminino. In: FARIA, J. L. et al. **Patologia especial: com aplicações clínicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 224-273.

BASEGIO, D. L. **Câncer de mama – abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. 371 p.

BATISSOCO, A. C. & NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 25, p. 47-58, 2003.

BERMÚDEZ, C.; INSUASTY, J.; GAMARRA, G. Grupo sanguíneo A y riesgo de cáncer gástrico en el Hospital Universitario de Santander (Bucaramanga, Colombia). **Acta Medica Colombiana**. v. 31, p. 400-410, 2006.

COSTANTINI M. et al. Role of blood groups as prognostic factors in primary breast cancer. **Oncology**. v. 47, p. 308-312, 1990.

EASTON, D. F. Familial risks of breast cancer. **Breast Cancer Research**. v. 4, p. 179-181, 2002.

FONTANA, B. et al. Prevalência da distribuição do sistema ABO entre doadores de sangue de um Hospital Universitário. **Revista da associação dos médicos do Rio Grande do Sul**. v.50, p. 277-279, 2006.

GULERIA, K. et al. ABO blood groups in gastrointestinal tract (GIT) and breast carcinoma patients. **The Anthropologist**. v. 7, p. 189-192, 2005.

HAKOMORI, S. Antigen structure and genetic basis of histo-blood group A, B and O: their changes associated with human cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1473, p. 247-266, 1999.

HENDERSON, J.; SEAGROATT, V.; GOLDACRE, M. Ovarian cancer and ABO blood groups. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 47, p. 287-289, 1993.

JAYANT, K. Relationship of ABO blood groups to certain types of cancer common in Western India. **Ind. J. Cancer**. v. 8, p. 185-188, 1971.

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

MAJUPURIA, K. C.; GUPTA, S. R.; GUPTA, L. C. The study of ABO blood groups and relationship with breast cancer. **Indian J Cancer**. v. 3, p. 182-183, 1966.

MOURALI, N. et al. Epidemiologic features of rapidly progressing breast cancer in Tunisia. **Cancer**. v. 46, p. 2741-2746, 1980.

MORI, M.; KIYOSAWA, H.; MIYAKE, H. Case-control study of ovarian cancer in japan. **Cancer**. v. 53, p. 2746-2752, 1984.

OSBORN, R. H. & DE GEORGE, F. V. The ABO blood groups in neoplastic disease of the ovary. **The American Journal of Human Genetics**. v. 15, p. 380-388, 1963.

RAVN, V. & DABELSTEEN, E. Tissue distribution of histo-blood group antigens: **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**. v.108, p.1-28, 2000.

SKOLNICK M. H. et al. Possible linkage of a breast cancer-susceptibility locus to the ABO locus: sensitivity of LOD scores to a single new recombinant observation. **Genet Epidemiol**. v. 1, p. 363-373, 1984.

STAMATAKOS, M. et al. Breast Cancer incidence in Greek women in relation to ABO blood groups and Rh factor. **International Seminars in Surgical Oncology**. v. 6, p. 14, 2009.

STRAUCHEN, J. A. et al. Expression of A and B tissue isoantigens in benign and malignant lesions of the breast. **British Journal of Cancer**. v. 45, p. 2149-2155, 1980.

VIOQUE, J. & WALKER, A. M. Pancreatic cancer and ABO blood type: a case-control study. **Medicina Clinica**. v. 96, p. 761-764, 1991.

VOGEL, V. G. Breast cancer prevention: a review of current evidence. **CA: A Cancer Journal Clinicians**. v. 50, p. 156-170, 2000.

YAMAMOTO, F. Review: ABO blood group system – ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. **Immunohematology**. v.20, p. 3-22, 2004.

YOU, W. et al. Blood type and family cancer history in relation to precancerous gastric lesions. **International Journal of Epidemiology**. v. 29. p. 405-407, 2000.

WOLPIN, B. et al. ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 101, p. 424-431, 2009.

5 CAPÍTULO 2

Expressão de antígenos sanguíneos ABO em lesões mamárias malignas e benignas

Expression of blood antigens A and B in malignant and benign lesions of the breast

Rochele C. R. Pozzobon, Jose E. P. da Silva, Sandra T. Beck, Cláudia B. dos Santos

Artigo a ser submetido para publicação na revista The Breast em setembro de 2010

Expressão de antígenos sanguíneos A e B em lesões mamárias malignas e benignas

Expression of blood antigens A and B in malignant and benign lesions of the breast

Rochele C. R. Pozzobon¹, Jose E. P. da Silva², Sandra T. Beck², Cláudia B. dos Santos³

¹ Farmacêutica Bioquímica, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Av. Roraima 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: chelerohde@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

² Farmacêutico Bioquímico, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFSM.

³ Farmacêutica Bioquímica, Departamento de Patologia, Setor de Imunohistoquímica, UFSM.

Resumo

Estudos prévios mostraram que o padrão de expressão dos antígenos ABO em tecidos normais difere do padrão encontrado em tecidos neoplásicos. Na maioria dos carcinomas, ocorre uma expressão diminuída dos antígenos A e B, e essa diminuição correlaciona-se com potencial metastático e pior prognóstico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão tecidual dos antígenos sanguíneos A e B em lesões malignas e benignas da mama, para uma possível aplicação como marcador tumoral, bem como determinar se os padrões da expressão dos antígenos estão associados a outros fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos. Num total de 80 amostras de tecidos (29 oriundas de lesões benignas da mama, e 51 de carcinoma mamário) foi realizada a pesquisa imuno-histoquímica da expressão dos antígenos sanguíneos A e B. Verificou-se uma diminuição, estatisticamente significativa, da expressão do antígeno sanguíneo A no câncer de mama, sugerindo que essa redução na expressão nos tecidos mamários malignos possa predizer um comportamento mais agressivo do tumor. Ao serem relacionados o padrão de expressão dos antígenos A e B, nas amostras de tecidos de pacientes com CM, com alguns fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos, e imuno-histoquímicos já estabelecidos, nenhuma associação significativa foi encontrada. A expressão dos antígenos ABO no CM não ofereceu um indicador prognóstico adicional aos marcadores já existentes. A distribuição da expressão dos antígenos A e B em células malignas e benignas da mama não foi totalmente uniforme. Supõe-se que a diminuição na expressão dos antígenos nos tecidos mamários malignos possa predizer um comportamento mais agressivo do tumor. Já a perda da expressão de antígenos ABO em lesões benignas pode ser um marcador prematuro para a transformação neoplásica.

Palavras chave: expressão de antígenos ABO, prognóstico, câncer de mama.

Abstract

Previous studies showed that the pattern of expression of ABO antigens in normal tissues differs from the pattern found in tumor tissue. In most carcinomas, there is a decreased expression of antigens A and B, and this decrease correlates with metastatic potential and worse prognosis. The aim of this study was to evaluate the expression of antigens A and B blood in malignant and benign breast tissue for a possible application as a tumor marker as well as determine whether the patterns of expression of the antigens are associated with other clinical prognostic, pathological and immunohistochemical factors. A total of 80 tissue samples (originating from 29 benign breast lesions, and 51 breast carcinoma) were investigated by immunohistochemical to verify the tissue expression of the blood antigens A and B. There was a significant decrease ($p=$), in the expression of antigen A blood group in breast cancer patient's, assuming that this reduction in expression in malignant breast tissues can predict a more aggressive tumor behavior. No significant correlation was found between expression pattern of A and B tissue antigens in BC patients and clinical prognostic factors, anatomopathological or immunohistochemical characteristics. Expression of ABO tissue antigens in BC not offered an additional prognostic indicator for existing markers. The distribution of the expression of antigens A and B cells in benign and malignant breast was not completely uniform. It is assumed that the decrease in expression of antigens in malignant breast tissues can predict a more aggressive tumor behavior. Already the loss of ABO antigen expression in benign lesions may be an early marker for neoplastic transformation.

Keywords: ABO antigen expression, prognosis, breast cancer.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é uma das mais comuns e importantes doenças que afetam as mulheres de todo o mundo. No Brasil, é a neoplasia maligna mais freqüente na mulher, tanto em incidência quanto em mortalidade (MENKE et al., 2000, INCA, 2009).

A identificação de marcadores que possam prever o comportamento dos tumores é especialmente importante no CM, devido, sobretudo, à variabilidade na progressão da doença.

Os fatores prognósticos mais importantes são o tamanho do tumor e a condição dos linfonodos axilares. Outros fatores de relevância são o tipo e grau histológico do tumor, e a idade ao diagnóstico (ROCHA et al., 2002). Além destes fatores clínicos e anatomopatológicos, marcadores tumorais imuno-histoquímicos como receptor de estrógeno e onogene *cerb-B2* também são fundamentais no estabelecimento de prognóstico e tratamento de CM (SARAFIAN et al., 1993; ANDRIOLO, 1996; ROSEN, 1997; EISEMBERG & KOIFMAN, 2001, ROCHA et al., 2002). Marcadores tumorais são substâncias presentes no tumor, no sangue, ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor. É importante que essa substância possa ser utilizada para diferenciar tecidos normais de neoplásicos (EISENBER & KOIFMAN, 2001).

Nas últimas décadas, avanços nas áreas de biologia molecular, histoquímica e genética tem proporcionado a descoberta de novos e potentes marcadores para o prognóstico de muitas doenças, especialmente de câncer. Estudos revelaram haver uma relação entre as mudanças genéticas nas células tumorais, seus produtos celulares, e comportamento do tumor. Com a tecnologia dos anticorpos monoclonais foi possível estudar com detalhes a distribuição histológica dos carboidratos de superfície celular, bem como suas mudanças, nos tumores sólidos (HAKOMORI, 1985; HAKOMORI, 1989; YAMAMOTO et al., 1990; TAKASHIMA et al., 2002).

Os antígenos do grupo sanguíneo ABO tem atraído a atenção de muitos investigadores que os consideram como antígenos de diferenciação e como antígenos associados à tumor (SARAFIAN et al., 1993). Cientistas asseguram a importância da pesquisa do sistema sanguíneo ABO para o diagnóstico e terapia das doenças. Eles mostraram a associação entre tipagem sanguínea ABO e câncer, e também a relação entre expressão dos antígenos sanguíneos ABO nas células neoplásicas com prognóstico (PRODBIELSKA & KROTKIEWSKI, 2002; BERMÚDEZ et al., 2006; WOLPIN et al., 2009).

Antígenos do grupo sanguíneo ABO são carboidratos expressos na superfície dos eritrócitos e em vários outros tipos de células epiteliais, com importante função na adesão intercelular. Modificações genéticas na glicosilação desses carboidratos de superfície celular têm sido descritas no câncer (HAKOMORI, 1999).

Estudos prévios mostraram que o padrão de expressão dos antígenos ABO em tecidos normais difere do padrão encontrado em tecidos neoplásicos. Na maioria dos carcinomas, incluindo carcinoma mamário, ocorre uma expressão diminuída dos antígenos A e B. A diminuição da expressão desses antígenos correlaciona-se com potencial metastático e pior

prognóstico em cânceres de pulmão, bexiga, colo uterino, ovário, próstata, entre outros (GUPTA et al., 1973; HIROHASHI et al., 1984; ORNTOFT et al, 1988) . Devido ao interesse cada vez maior na genética molecular dos antígenos do grupo sanguíneo, está sendo possível entender as razões pelas quais ocorrem alterações na expressão desses antígenos em neoplasias malignas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão tecidual dos antígenos sanguíneos A e B em lesões malignas e benignas da mama, para uma possível aplicação como marcador tumoral para prognóstico de CM, bem como determinar se os padrões da expressão dos antígenos estão associados a outros fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS:

Para a realização da pesquisa imuno-histoquímica dos antígenos sanguíneos A e B foram selecionados materiais (blocos de tecidos fixados em formalina e incorporados em parafina) de pacientes submetidos à biópsia mamária, no setor de patologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), no período de janeiro de 2006 à dezembro de 2008. O material foi selecionado de modo a incluir tanto tecidos mamários malignos quanto benignos, e de acordo com a disponibilidade armazenada. Um total de 80 amostras de tecidos foram analisadas, sendo 29 oriundas de lesões benignas da mama, e 51 de carcinoma mamário.

Foram realizados cortes histológicos da espessura de 3 micrômetros em todos os blocos, obtendo uma fita de parafina, que após banho-maria histológico, foi depositada em lâminas de vidro. Para cada amostra, foram realizados 3 cortes histológicos: um corte para anticorpo primário anti-A, um para anti-B e o terceiro para um controle negativo sem utilizar o anticorpo primário. As lâminas foram levadas à estufa a 60°C por 24h para adesão do tecido. Após, realizou-se a desparafinização em xilol, e posterior hidratação em diferentes concentrações de etanol. Finalizou-se com lavagem padrão.

As lâminas contendo os cortes histológicos estão desta forma, prontas para a realização da técnica de imuno-histoquímica pelo método avidina-biotina complexada à peroxidase, usando anticorpos monoclonais anti-A e anti-B, para verificar a expressão dos antígenos sanguíneos A e B. A imunoperoxidase indireta é um tipo de técnica com a

finalidade de detectar e localizar antígenos celulares utilizando microscopia óptica comum. O anticorpo que reage com o antígeno em estudo possui ligação covalente com a enzima peroxidase. A enzima converte o componente cromógeno adicionado (substrato + doador de hidrogênio) em produto insolúvel, o qual é visível ao microscópio óptico (coloração marrom) (FERREIRA & ÁVILA, 2001).

As informações referentes aos grupos sanguíneos, fatores clínicos (idade, estado menopausal), anatomopatológicos (tamanho e grau histológico do tumor, comprometimento linfonodal) e imuno-histoquímicos (receptor de estrógeno e oncogene *cerb-B2*), foram obtidos junto aos registros médicos das pacientes.

Aplicou-se o teste do Qui-quadrado para análise das possíveis associações entre as variáveis. Foram considerados como significantes os resultados associados a um *p* valor menor que 5%. O software utilizado foi o Statistica 7.0.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (número do processo: 23081003197/2007-66; certificado de apresentação para apreciação ética: 0048.0.243.000.07).

RESULTADOS

Na análise imuno-histoquímica para detecção dos antígenos sanguíneos A e B no tecido mamário foram analisadas amostras de tecido de 80 pacientes, sendo 51 com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo e 29 com lesão benigna da mama (fibroadenoma: 17; alterações fibrocísticas: 09; cistos: 03). A tipagem sanguínea das pacientes e a quantidade de amostras que expressaram os antígenos A e B encontram-se na tabela 1.

Os padrões da expressão de antígenos sanguíneos A e B nas amostras de tecidos mamários benignos e malignos encontram-se na tabela 2. A realização da técnica, utilizando ora anti-A como anticorpo primário, ora anti-B como anticorpo primário, mostrou que todas as pacientes do grupo sanguíneo O tanto com CM ou lesão benigna não apresentaram expressão dos antígenos A ou B. Os tecidos de pacientes com câncer de mama mostraram uma deleção parcial ou total dos antígenos A e B (expressão negativa), conforme o grupo sanguíneo, em 81,8% e 78% respectivamente. Em contrapartida, nas lesões benignas, 63,6% e 50% das amostras conservaram a expressão dos antígenos A e B (expressão positiva), respectivamente. Com isso, foi possível verificar que a expressão dos antígenos A e B no CM

e nas diferentes lesões benignas foram heterogêneas. Observou-se uma associação significativa entre deleção do antígeno A e câncer de mama ($p < 0,05$).

Nas pacientes com câncer, ao relacionarmos os padrões de expressão dos antígenos sanguíneos AB com os fatores clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos mencionados no material e métodos, nenhuma associação significativa foi observada (tabela 3).

Tabela 1. Número de pacientes com lesões benignas e malignas da mama por grupo sanguíneo e expressão positiva dos antígenos A e B.

Material histológico	Grupo sanguíneo	Número de pacientes (n)	Expressão + Ag A (n)	Expressão + Ag B (n)
Benigno				
Fibroadenoma	A	07	05	----*
	B	02	----*	01
	O	08	----*	----*
Aletrações fibrocísticas	A	03	02	----*
	B	01	----*	00
	O	05	----*	----*
Cistos	A	01	00	----*
	B	01	----*	01
	O	01	----*	----*
Maligno				
Carcinoma ductal	A	22	04	----*
	B	09	----*	02
	O	18	----*	----*
	AB	02	00	00

*Não houve expressão dos antígenos

Tabela 2. Distribuição da expressão dos antígenos sanguíneos A e B em tecidos malignos e benignos da mama

Material	Antígeno A			Antígeno B		
	Expressão +	Expressão -	p-valor	Expressão +	Expressão -	p-valor
Benigno	07 (63,6%)	04 (36,4%)	0,0175*	02 (50%)	02 (50%)	0,5301
Câncer	04 (18,2%)	18 (81,8%)		02 (22%)	07 (78%)	

* $p \leq 0,05$

Tabela 3. Padrão de expressão dos antígenos A e B em relação aos diferentes fatores prognósticos

Fatores prognósticos		Antígeno A			Antígeno B		
		Expressão + (n)	Expressão - (n)	p-valor	Expressão + (n)	Expressão - (n)	p-valor
Idade	≤ 45 anos	01	05	0,6341	01	01	0,4167
	> 45 anos	05	11		01	06	
Menopausa	Sim	05	10	0,6158	02	06	1,0
	Não	01	06		0	01	
Tamanho do tumor	≤ 1,5 cm	0	04	0,0947	01	02	NV
]1,5 cm - 3,0cm [06	08		01	05	
	≥ 3,0 cm	0	04		0	0	
Grau histológico	I	01	04	NV	0	01	NV
	II	05	09		2	06	
	III	0	03		0	0	
Comprometimento linfonodal	0	0	02	NV	01	01	NV
	1 - 3	04	06		01	03	
	4 - 9	01	06		0	02	
	≥ 10	01	02		0	01	
Cerb-B2	+	02	10	0,3476	0	01	1,0
	-	04	06		02	06	
RE	+	05	10	0,6158	02	01	1,0
	-	01	06		0	06	

RE: receptor de estrógeno; NV: qui-quadrado não válido

DISCUSSÃO

Os antígenos do grupo sanguíneo ABO são carboidratos expressos na superfície da membrana de eritrócitos e muitas outras células epiteliais. A localização dos antígenos nos diferentes tecidos humanos corresponde ao grupo sanguíneo nos eritrócitos (RAVN & DABELSTEEN, 2000). Mudanças na estrutura carboidrata desses antígenos de superfície celular foram demonstradas durante a maturação das células, e relacionadas ao desenvolvimento de malignidade (HAKOMORI, 1999; GAO et al. 2004). A perda da expressão dos antígenos ABO nos tecidos epiteliais malignos foi observada em carcinomas de pulmão, próstata, trato gastrointestinal, ovário, bexiga e mama (GUPTA et al., 1973; HIROHASHI et al., 1984; ORNTOFT et al, 1988; SARAFIAN et al., 1993). Além disso, há evidências sugerindo correlação entre diminuição da expressão dos antígenos ABO com um pior prognóstico em diferentes tipos de câncer (HAKOMORI, 1999; NAKAGOE et al., 1998; MARIANO et al., 2000; MOLDVAY et al., 2000).

Nesse estudo, foi possível verificar uma diminuição, estatisticamente significativa, da expressão do antígeno sanguíneo A no câncer de mama. Porém não foi possível verificar se essa redução na expressão estava associada com prognóstico, uma vez que não houve acompanhamento clínico posterior das pacientes estudadas. Embora também tenhamos observado uma maior redução na expressão do antígeno B nas pacientes com câncer do que naquelas com lesões benignas, essas diferenças não foram significativas. Isso pode ser devido ao reduzido número de amostras do grupo sanguíneo B, o qual tem baixa incidência na população geral, e conseqüentemente na população estudada. Nas amostras de tecido referentes à pacientes do grupo sanguíneo O não houve expressão dos antígenos A e B, tanto nas células neoplásicas quanto benignas da mama, uma vez que essas pacientes não possuem as transferases A e B para implantação dos resíduos de açúcar específicos nas superfícies das células (HENRY, 1999; BATISSOCO & NOVARETTI, 2003).

Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por IDIKIO & MANICKAVEL (1993). Segundo os autores, a expressão de antígenos sanguíneos A, B, H, foi reduzida em câncer de mama. Um provável mecanismo para a diminuição da expressão dos antígenos nos carcinomas é a ocorrência de problemas nas enzimas glicosiltransferases necessárias para a síntese desses antígenos. A perda das enzimas transferases como resultado da transformação maligna, conseqüentemente conduz à falha na síntese dos antígenos ABO (STELLNER et al., 1973; WATANABE & HAKOMORI, 1976). Essa deleção da expressão

pode ser uma evidência de agressividade e pior prognóstico, já que as células neoplásicas deixam de expressar tais resíduos na sua superfície (AGUIAR et al., 2002; HAKOMORI, 1999; YAMAMOTO, 2004) . A falta dos açúcares A e B na membrana celular pode atuar como um facilitador para que as células aumentem sua motilidade e possam se instalar em um local distante do sítio primário da doença, o que caracteriza a metástase, que também é um sinal de evolução da neoplasia, com pior prognóstico (LE PENDU, 2001).

Alguns estudos sobre o câncer de mama relataram perda uniforme da expressão dos antígenos ABO em todos os tumores invasivos e manutenção da expressão dos antígenos nas lesões benignas da mama (GUPTA et al., 1973; SHULL et al., 1981). No entanto, STRAUCHEN et al. (1980) encontrou redução na expressão dos antígenos A e B tanto no carcinoma como em algumas lesões benignas da mama (cistos, hiperplasia ductal, adenose esclerosante e papilomatose ductal). Resultados semelhantes, foram demonstrados por VOWDEN et al. (1986): diminuição ou ausência da expressão dos antígenos A, B e H em doença fibrocística e fibroadenoma, possível elo entre a doença fibrocística e o carcinoma mamário.

Em nosso estudo, a distribuição da expressão dos antígenos A e B em células malignas e benignas da mama não foi totalmente uniforme. A maioria das lesões benignas demonstraram expressão dos antígenos, mas algumas perderam a expressão, conforme igualmente já relatado por Strauchen e Vowden. Os resultado obtidos no presente estudo, assim como os encontrados pelos pesquisadores citados acima, sugerem que a perda da expressão de antígenos ABO em lesões benignas possa ser um marcador prematuro para a transformação neoplásica.

Quando o padrão de expressão dos antígenos A e B, nas amostras de tecidos de pacientes com CM, foram relacionados com alguns fatores prognósticos clínicos (idade e estado menopausal), anatomopatológicos (tamanho e grau histológico do tumor) e imunohistoquímicos (oncogene *Cerb-B2* e receptor de estrógeno) já estabelecidos, nenhuma associação significativa foi encontrada. IDIKIO& MANICKAVEL (1993), também não encontraram relação entre a diminuição na expressão dos antígenos A, B, H e o status dos receptores hormonais, assim como o desenvolvimento de metástases nos linfonodos axilares. Igualmente, num outro estudo, não houve relações significativas com o fator grau de diferenciação tumoral e com o intervalo de recorrência da doença (LEE et al., 1985).

A expressão dos antígenos ABO no CM, conseqüentemente, não parece oferecer um indicador prognóstico adicional aos marcadores já existentes. Supõem-se apenas que a ocorrência de diminuição da expressão nos tecidos mamários malignos possa predizer um

comportamento mais agressivo do tumor. No entanto, as mudanças na expressão no epitélio benigno mamário podem ser um marcador de risco para o desenvolvimento da doença maligna. Todas essas especulações impõem estudos prospectivos adicionais, afim de esclarecimento e melhor entendimento das funções imunológicas dos antígenos dos grupos sanguíneos como marcadores associados a tumor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. C. F. et al. Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré-neoplásicas na mucosa gástrica. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 39, p. 222-231, 2002.

ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 53, p. 641-653, 1996.

BATISSOCO, A. C. & NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 25, p. 47-58, 2003.

BERMÚDEZ, C.; INSUASTY, J.; GAMARRA, G. Grupo sanguíneo A y riesgo de cáncer gástrico en el Hospital Universitario de Santander (Bucaramanga, Colombia). **Acta Medica Colombiana**. v. 31, p. 400-410, 2006.

EISENBERG, A. L. A. & KOIFMAN, S. Câncer de Mama: Marcadores Tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 47, p. 377-388, 2001.

FERREIRA, W. & ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GAO, S. et al. Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**. v. 109, p. 230-237, 2004.

GUPTA, R. K.; SCHUSTER, R.; CHRISTIAN, W. D. Loss of isoantigens ABH in prostate. **American Journal Pathology**. v. 70, p. 439-448, 1973.

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

HAKOMORI, S. I. et al. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. **Advances in Cancer Research**. v. 52, p. 257-331, 1989.

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

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19 ed. São Paulo: Manole, 1999.

HIROHASHI, S. et al. Distribution of blood group antigens A, B, h and I(Ma) in muçus-producing adenocarcinoma of human lung. **Journal of the National Cancer Institute**. v.72, p. 1299-1305, 1984.

IDIKIO, A. H. & MANICKAVEL, H. A, B, H and Lewis-a and Lewis-b bood group antigens in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptor and disease status. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**. v. 119, p. 486-492, 1993.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência de câncer no Brasil para o ano de 2010. Disponível em: < <http://www.inca.gov/estimativa/2010/pdf>. Acesso em: 10 de abril de 2010.

LEE, A. K. et al. ABH blood group isoantigen expression in breast carcinomas – an immunohistochemical evaluation using monoclonal antibodies. **America Journal of Clinical Pathology**. v. 83, p. 308-319, 1985.

LE PENDU, J. et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**. v.109, p.9-31, 2001.

MARIANO, A. et al. Expression of Lewis carbohydrate antigens and chromogranin A in human prostatic cancer. **International Journal of Oncology**. v.17, p.167-171, 2000.

MENKE, C.H. et al. **Rotinas em mastologia**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 257 p.

MOLDVAY, J. et al. Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. **Clinical. Cancer Research**. v. 6, p. 1125-1234, 2000.

NAKAGOE, T. et al. Immunohistochemical expression of ABH/Lewis-related antigens in primary breast carcinomas and metastatic lymph node lesions. **Cancer Detection and Prevention**. v. 22, p. 499-505, 1998.

ORNTOFT, T. F.; WOLF, H.; WATKINS, W. M. Activity of the human blood group ABO, Se, H, Le and X gene-encoded glycosyltransferases in normal and malignant bladder urothelium. **Cancer Research**. v. 48, p. 4427-4433, 1988.

PODBIELSKA, M.; KROTKIEWSKI, H. ABO blood-group system: past and present. **Postepy Higieny Y Medycyny Doswiadczalnej**. v. 56, p. 439-460, 2002.

RAVN, V. & DABELSTEEN, E. Tissue distribution of histo-blood group antigens: **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**. v.108, p.1-28, 2000.

ROCHA, J. C. C. et al. Oncogenética e oncogenômica. In: KOWALSKI, L. P. et al. **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. São Paulo: Âmbito, 2002, p. 52-59.

ROSEN, P. P. **Breast Pathology**. Philadelphia: Lippincott - Williams & Wilkins, 1999, 311p.

SARAFIAN, V. et al. Expression of A, B and H blood-group antigens and carcinoembryonic antigen in human tumours. **Zentralblatt für Pathologie**. v. 139, p. 351-354, 1993.

SHULL, J.H. et al. The ABO(H) cell surface antigens in carcinoma and benign lesions of the breast. **Journal of Surgical Oncology**. v. 18, p. 193-196.

STELLNER, K.; HAKOMORI, S.; WARNER, G.A. Enzymic conversion of "H₁-glycolipid" to a or B-glycolipid and deficiency of these enzyme activities in adenocarcinoma. **Biochemical an Biophysical Research Communications**. v. 55, p. 439-445.

STRAUCHEN, J. A. et al. Expression of A and B tissue isoantigens in benign and malignant lesions of the breast. **British Journal of Cancer**. v. 45, p. 2149-2155, 1980.

TAKASHIMA, T. et al. 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.

VOWDEN, P. et al. 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. **British Journal of Cancer**. v. 53, p. 313-319, 1986.

WATANABE, K. & HAKOMORI, S. Status of blood group carbohydrate chains in ontogenesis and in oncogenesis. **Journal of Experimental Medicine**. v. 144, p. 644-653, 1978.

WOLPIN, B. et al. ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 101, p. 424-431, 2009.

YAMAMOTO, F. I. et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. **Nature**. v. 345, p. 229-233, 1990.

YAMAMOTO, F. Review: ABO blood group system – ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. **Immunohematology**. v.20, p. 3-22, 2004.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Antígenos do grupo sanguíneo ABO vem sendo amplamente pesquisados por sua associação com muitas doenças, especialmente com câncer. Conforme descrito neste trabalho, a tipagem sanguínea ABO deve ser considerada como um fator de predisposição ao câncer de mama, uma vez que pessoas do grupo A possuem oito vezes mais chance de desenvolverem câncer de mama que as de outros grupos sanguíneos. A expressão de antígenos ABO em células de diferentes tecidos está relacionada com diferentes estágios da carcinogênese e prognóstico em muitos tipos de cânceres. As células normais expressam esses antígenos na sua superfície. À medida que ocorre progressão das células normais à tumorais, a expressão desses antígenos tende a desaparecer. Neste estudo a expressão dos antígenos ABO no CM não oferece um indicador prognóstico adicional aos marcadores já existentes e bem estabelecidos. A distribuição da expressão dos antígenos A e B em células malignas e benignas da mama não foi totalmente uniforme. Grande parte das células malignas perderam a expressão dos antígenos, mas algumas a mantiveram, podendo-se relacionar essa perda na expressão com um comportamento mais agressivo desses tumores. A maioria das lesões benignas demonstraram expressão dos antígenos, porém algumas perderam a expressão, sugerindo que a perda da expressão de antígenos ABO em lesões benignas possa ser um marcador prematuro para a transformação neoplásica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABREU, E. & KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 58, p. 113-131, 2002.

ADAMI, H. O. et al. The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 315, p. 559-563, 1986.

AGUIAR, D. C. F. et al. Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré-neoplásicas na mucosa gástrica. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 39, p. 222-231, 2002.

ALBERTS, S. R. et al. Comparison of estrogen receptor determinations by a biochemical ligand-binding assay and immunohistochemical staining with monoclonal antibody ER1D5 in females with lymph node positive breast carcinoma entered on two prospective clinical trials. **Cancer**. v. 78, p. 764-772, 1996.

ANDACHI, N.; DIETZE, O.; HAUSER-KRONBERGER, C. Evaluation of Clinical significance of Her2 amplification by chromogenic in situ hybridisation in patients with primary breast cancer. **Anticancer Research**. v. 24, p. 2401, 2004.

ANDRADE, L. A. Aparelho genital feminino. In: FARIA, J. L. et al. **Patologia especial: com aplicações clínicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 224-273.

ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 53, p. 641-653, 1996.

ANNESE, V. et al. ABO blood groups and cancer of the pancreas. **International Journal of Pancreatologia**, v. 6, p. 81-88, 1990.

AIRD, I.; BENTALL, H. H.; FRASER ROBERTS, J. A. A relationship between cancer of the stomach and ABO blood group. **British Medical Journal**. v. 1, p. 799-801, 1953.

ANDERSON, D. E. Some characteristics of familial breast cancer. **Cancer**. v. 28, 1500-1504, 1971.

ANDERSON, D. E. & HAAS, C. Blood type A and familial breast cancer. **Cancer**. v. 54, 1845-1849, 1984.

BASEGIO, D. L. **Câncer de mama – abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. 371 p.

BATISSOCO, A. C. & NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 25, p. 47-58, 2003.

BECKER, C. B. et al. Relação entre resultados de PSA e grupos sanguíneos ABO: uma amostra de 2521 pacientes. In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2003.

BECKMANN, M. W. et al. Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu: no advantage of prediction of recurrence of survival in breast cancer patients. **Oncology**. v. 53, p. 441-447, 1996.

BENNETT, I. C.; GATTAS, M.; TEH, B. T. The management of familial breast cancer. **Breast**. v. 9, p. 247-263, 2000.

BERMÚDEZ, C.; INSUASTY, J.; GAMARRA, G. Grupo sanguíneo A y riesgo de cáncer gástrico en el Hospital Universitario de Santander (Bucaramanga, Colombia). **Acta Medica Colombiana**. v. 31, p. 400-410, 2006.

BONADONNA, G. et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer eight years experience at Milan Cancer Institute. **Journal of Clinical Oncology**. v. 16, p. 93-100, 1998.

BRONDI, L.A.G. Importância da linfadenectomia axilar no tratamento cirúrgico do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 33, p. 119-126, 1987.

CARTER, C. L.; ALLEN, C.; HENSON, D. E. Relation of tumor size lymph node status and survival in 247140 breast cancer cases. **Cancer**. v. 63, p. 181-187, 1989.

CLARCK, G. M. Prognostic and predictive factors. In: HARRIS J. R. et al. **Diseases of breast**. 5nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 461-470.

COSTANTINI M. et al. Role of blood groups as prognostic factors in primary breast cancer. **Oncology**. v. 47, p. 308-312, 1990.

DE LA ROCHEFORDIERE A., et al. Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma. **The Lancet**. v. 341, p. 1039-1043, 1993.

DHINGRA, K. & HORTOBAGYI, G. N. Critical evaluation of prognostic factors. **Seminars in Oncology**. v. 23, p. 436-445, 1996.

EASTON, D. F. Familial risks of breast cancer. **Breast Cancer Research**. v. 4, p. 179-181, 2002.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de Mama: Marcadores Tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 47, p. 377-388, 2001.

ERNBERG, I. T. Oncogenes and tumor growth factors in breast cancer. **Acta Oncologica**. v. 29, p. 331-334, 1990.

FERREIRA, W. & ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FONTANA, B. et al. Prevalência da distribuição do sistema ABO entre doadores de sangue de um Hospital Universitário. **Revista da associação dos médicos do Rio Grande do Sul**. v.50, p. 277-279, 2006.

FUQUA, S. A. W. Estrogen receptor mutagenesis and hormone resistance. **Cancer**. v.74, p. 1026-1029, 1994.

GAO, S. et al. Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**. v. 109, p. 230-237, 2004.

GAYLE, C. T. New class of hormonal modulators for the treatment of breast cancer women's health in primare care. **Cancer**. v. 4, p. 368-372, 2001.

GULERIA, K. et al. ABO blood groups in gastrointestinal tract (GIT) and breast carcinoma patients. **The Anthropologist**. v. 7, p. 189-192, 2005.

GUPTA, R. K.; SCHUSTER, R.; CHRISTIAN, W. D. Loss of isoantigens ABH in prostate. **American Journal Pathology**. v. 70, p. 439-448, 1973.

HAERSLEV, T. H. & JACOBSEN, G. K. Proliferation cell nuclear antigen in breast carcinomas. An immunohistochemical study with correlation to histopathological features and prognostic factors. **Virchows Archiv**. v. 424, p. 39-46, 1995.

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

HAKOMORI, S. I. et al. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. **Advances in Cancer Research**. v. 52, p. 257-331, 1989.

HAKOMORI, S. Antigen structure and genetic basis of histo-blood group A, B and O: their changes associated with human cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1473, p. 247-266, 1999.

HAN, W. & KANG, Y. S. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 119, p. 193-200, 2009.

HENDERSON, J.; SEAGROATT, V.; GOLDACRE, M. Ovarian cancer and ABO blood groups. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 47, p. 287-289, 1993.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19 ed. São Paulo: Manole, 1999.

HIROHASHI, S. et al. Distribution of blood group antigens and CA 19-9 in gastric cancers and non-neoplastic gastric mucosa. **The Japanese Journal of Cancer Research**. v. 75, p. 540-547, 1984a.

HIROHASHI, S. et al. Distribution of blood group antigens A, B, h and I(Ma) in muçus-producing adenocarcinoma of human lung. **Journal of the National Cancer Institute**. v.72, p. 1299-1305, 1984b.

HORTZ, J. L. et al. Câncer de mama: análise clínico-epidemiológica de 892 casos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 16, p. 220-225, 1994.

HOST, H. & LUND, E. Age as a prognostic factor in breast cancer. **Cancer**. v. 57, p. 2217-2221, 1986.

IDIKIO, A. H. & MANICKAVEL, H. A, B, H and Lewis-a and Lewis-b blood group antigens in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptor and disease status. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**. v. 119, p. 486-492, 1993.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência de câncer no Brasil para o ano de 2010. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>. Acesso em: 10 de abril de 2010.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Controle do câncer de mama: Documento de Consenso (abril de 2004) Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/publicacoes/Consensointegra.pdf>. Acesso em: 10 de abril de 2010.

JAYANT, K. Relationship of ABO blood groups to certain types of cancer common in Western India. **Ind. J. Cancer**. v. 8, p. 185-188, 1971.

JENSEN, E. V. et al. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. **National Cancer Institute Monograph**. v. 34, p. 55-79, 1971.

KROMAN, N. et al. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study. **British Medical Journal**. v. 320, p. 474-479, 2000.

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

LEE, A. K. et al. ABH blood group isoantigen expression in breast carcinomas – an immunohistochemical evaluation using monoclonal antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 83, p. 308-319, 1985.

LE PENDU, J. et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**. v.109, p.9-31, 2001.

MACLEOD, K. Tumor suppressor genes. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 10, p. 81-93, 2000.

MAJUPURIA, K. C.; GUPTA, S. R.; GUPTA, L. C. The study of ABO blood groups and relationship with breast cancer. **Indian J Cancer**. v. 3, p. 182-183, 1966.

MAMEDE, M. V. et al. Menarca-menopausa: quando ocorrem? **Jornal Brasileiro de Ginecologia**. v. 102, p. 441-444, 1992.

MARIANO, A. et al. Expression of Lewis carbohydrate antigens and chromogranin A in human prostatic cancer. **International Journal of Oncology**. v.17, p.167-171, 2000.

MENKE, C.H. et al. **Rotinas em mastologia**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 257 p.

MOLDVAY, J. et al. Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. **Clinical. Cancer Research**. v. 6, p. 1125-1234, 2000.

MORI, M.; KIYOSAWA, H.; MIYAKE, H. Case-control study of ovarian cancer in japan. **Cancer**. v. 53, p. 2746-2752, 1984.

MOURALI, N. et al. Epidemiologic features of rapidly progressing breast cancer in Tunisia. **Cancer**. v. 46, p. 2741-2746, 1980

MUHONEN, T. et al. Breast cancer risk estimation in families with history of breast cancer. **British Journal of Câncer**. v. 76, p. 1228-1231, 1997.

NAKAGOE, T. et al. Immunohistochemical expression of ABH/Lewis-related antigens in primary breast carcinomas and metastatic lymph node lesions. **Cancer Detection and Prevention**. v. 22, p. 499-505, 1998.

NETTO, M. M. et al. Câncer de mama: estádios clínicos iniciais. In: KOWALSKI, L. P. et al. **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. São Paulo: Âmbito, 2002, p. 645-646.

NISKANEN, E. et al. Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of primary tumour in metastatic breast cancer. **British Journal of Cancer**. v. 76, p. 917-922, 1997.

ORNTOFT, T. F.; WOLF, H.; WATKINS, W. M. Activity of the human blood group ABO, Se, H, Le and X gene-encoded glycosyltransferases in normal and malignant bladder urothelium. **Cancer Research**. v. 48, p. 4427-4433, 1988.

OSBORNE, C. K. Prognostic factors in breast cancer. **Principles & Practice of Oncology**. v. 04, p. 1-11, 1990.

OSBORN, R. H. & DE GEORGE, F. V. The ABO blood groups in neoplastic disease of the ovary. **The American Journal of Human Genetics**. v. 15, p. 380-388, 1963.

PAVELIC, Z. P. et al. c.myc, c-erb-B2, and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and noninvasive breast carcinoma. **Cancer Research**. v. 52, p. 2597-2602, 1992.

PEER, P. G. M. et al. Prognosis of younger and older patients with early breast cancer. **British Journal of Câncer**. v. 73, p. 382-385, 1996.

PERLMAN, E. J. & EPSTEIN, J. I. Blood group antigen expression in dysplasia and adenocarcinoma of the prostate. **The American journal of surgical pathology**. v. 9, p. 810-818, 1990.

PINDER, S. E.; ELLIS, I. O.; ELSTON, C. W. Prognostic factors in primary breast carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**. v. 48, p. 981-983, 1995.

PISANI, R. C. B. Receptores de estrógeno em mastologia. In: PINOTTI, J. A. **Compêndio de mastologia**. São Paulo: Manole, 1991. p.187-94.

PODBIELSKA, M.; KROTKIEWSKI, H. ABO blood-group system: past and present. **Postepy Higieny Y Medycyny Doswiadczałnej**. v. 56, p. 439-460, 2002.

RAVN, V. & DABELSTEEN, E. Tissue distribution of histo-blood group antigens: **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**. v.108, p.1-28, 2000.

REZAIANZADEH, A. et al. Survival analysis of 1148 womewn diagnosed with breast cancer in Southern Iran. **British Medical Cancer**. v. 9, p. 1-11, 2009.

ROCHA, J. C. C. et al. Oncogenética e oncogenômica. In: KOWALSKI, L. P. et al. **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. São Paulo: Âmbito, 2002, p. 52-59.

ROSEN, P. P. **Breast Pathology**. Philadelphia: Lippincott - Williams & Wilkins, 1999, 311p.

SARAFIAN, V. et al. Expression of A, B and H blood-group antigens and carcinoembryonic antigen in human tumours. **Zentralblatt für Pathologie**. v. 139, p. 351-354, 1993.

SATTIN, R. W. et al. Family history and the risk of breast cancer. **The Journal of the American Medical Association**. v. 253, p. 1908-1913, 1985.

SHULL, J.H. et al. The ABO(H) cell surface antigens in carcinoma and benign lesions of the breast. **Journal of Surgical Oncology**. v. 18, p. 193-196.

SKOLNICK M. H. et al. Possible linkage of a breast cancer-susceptibility locus to the ABO locus: sensitivity of LOD scores to a single new recombinant observation. *Genet Epidemiol.* v. 1, p. 363-373, 1984.

SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* v. 235, p. 177-82, 1987.

SOBREIRA, T. T. et al. Investigação sobre a idade da menarca e da menopausa em mulheres de Fortaleza-Ce. *Femina.* v. 20, p. 97-103, 1992.

STAMATAKOS, M. et al. Breast Cancer incidence in Greek women in relation to ABO blood groups and Rh factor. *International Seminars in Surgical Oncology.* v. 6, p. 14, 2009.

STELLNER, K.; HAKOMORI, S.; WARNER, G.A. Enzymic conversion of "H₁-glycolipid" to a or B-glycolipid and deficiency of these enzyme activities in adenocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* v. 55, p. 439-445

STRAUCHEN, J. A. et al. Expression of A and B tissue isoantigens in benign and malignant lesions of the breast. *British Journal of Cancer.* v. 45, p. 2149-2155, 1980.

SU, M., et al. Relationship between ABO blood groups and carcinoma of esophagus and cardia in Chaoshan inhabitants of China. *World Journal of Gastroenterology.* v. 7, p. 657-661, 2001.

TAKASHIMA, T. et al. 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.

TETU, B. & BRISSON, J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. The influence of pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer.* v. 73, p. 2359-2365, 1994.

TOONKEL, L. M. Locally advanced breast carcinoma: results with combined regional therapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.* v. 12, p. 1583-1587, 1986.

TORRES, L. F. B.; COLLAÇO, L. M.; WERNER, B. Contribuição da imunohistoquímica na avaliação do carcinoma de mama: análise dos receptores de estrogênio, progesterona e

antígeno carcinoembrionário em 320 casos. **Revista Médica do Paraná.** v. 53, p. 28-34, 1996.

VALERO, V.; BUZDAR, A. U.; HORTOBAGYI, G. N. Locally Advanced Breast Cancer **The Oncologist.** v. 1, p. 8-17, 1996.

VIOQUE, J. & WALKER, A. M. Pancreatic cancer and ABO blood type: a case-control study. **Medicina Clinica.** v. 96, p. 761-764, 1991.

VOGEL, V. G. Breast cancer prevention: a review of current evidence. **CA: A Cancer Journal Clinicians.** v. 50, p. 156-170, 2000.

VOWDEN, P. et al. 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. **British Journal of Cancer.** v. 53, p. 313-319, 1986.

YAMAMOTO, F. I. et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. **Nature.** v. 345, p. 229-233, 1990.

YAMAMOTO, F. Review: ABO blood group system – ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. **Immunohematology.** v.20, p. 3-22, 2004.

YOU, W. et al. Blood type and family cancer history in relation to precancerous gastric lesions. **International Journal of Epidemiology.** v. 29. p. 405-407, 2000.

WATANABE, K. & HAKOMORI, S. Status of blood group carbohydrate chains in ontogenesis and in oncogenesis. **Journal of Experimental Medicine.** v. 144, p. 644-653, 1978.

WEIDER, N. Pathologic prognostic factors in breast carcinoma. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology.** v. 02, p. 234-6, 1995.

WELSH, M. L. Population-based estimates of the relation between breast cancer risk, tumor subtype, and family history. **Breast Cancer Research and Treatment.** v. 114, p. 549-558, 2009.

WOLPIN, B. et al. ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer. **Journal of the National Cancer Institute.** v. 101, p. 424-431, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Sra está sendo convidada à participar, como voluntária, na realização da pesquisa intitulada : **EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DO SISTEMA SANGUÍNEO ABO ASSOCIADOS À PREDISPOSIÇÃO E AO PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA**, que tem por objetivo avaliar a possibilidade da expressão de antígenos do sistema ABO (grupo sanguíneo) ser aplicada como marcador de susceptibilidade genética e/ou prognóstico para o câncer de mama, quando associada a outros marcadores tumorais pesquisados. Como benefício você terá a possibilidade de melhora na qualidade de seu diagnóstico pelo acréscimo de mais um teste no auxílio ao diagnóstico clínico.

No desenvolver deste trabalho, você terá que autorizar o acesso ao prontuário onde estão registrados os resultados dos exames realizados, e que o material retirado de sua mama, para exames solicitados pelo seu médico, possa ser utilizado para mais uma pesquisa (expressão do grupo sanguíneo ABO no tecido mamário). Uma vez que a punção do material de sua mama seria colhida, mesmo que esta pesquisa não fosse realizada, pois seu médico faria o procedimento devido à outros exames, não haverá desconforto nenhum acrescido, por você estar participando deste trabalho.

Esta pesquisa terá caráter gratuito e espontâneo, não apresentando nenhum risco à sua integridade física, mental e/ou emocional. Caso você não queira participar, não haverá mudança na qualidade do seu tratamento. Não haverá nomes nem outra identificação dos pacientes em nenhum relatório ou publicação do estudo. Toda a informação médica adquirida durante este estudo será tratada como confidencial e será apenas dada a conhecer aos investigadores. Somente os dados anônimos serão usados para possível publicação em publicações científicas. O projeto de pesquisa não prevê ressarcimento.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (número do processo: 23081003197/2007-66; certificado de apresentação para apreciação ética: 0048.0.243.000.07).

Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM

Endereço: Avenida Roraima, 1000 – Prédio da Reitoria – 7º andar – Cidade

Universitária – Camobi – Santa Maria – RS

Telefone: (55) 3220-9362

APÊNDICE B - Declaração de Consentimento Livre e Esclarecido

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu.....,

RG..... residente à rua

na cidade de, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa, tendo sido devidamente informada e esclarecida pelo pesquisador sobre os procedimentos nela envolvidos e benefícios da minha participação. Os objetivos do estudo foram explicados de forma adequada, tive ampla oportunidade para fazer perguntas que foram respondidas satisfatoriamente.

Afirmo ainda que, de livre e espontânea vontade, permito que os dados e informações a meu respeito sejam utilizados da forma como estabelecida entre eu e o pesquisador.

Consinto em participar deste estudo como descrito nesta Declaração de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura do participante ou responsável

.....

Assinatura do pesquisador

.....

Local e data:

.....

APÊNDICE C - Técnica de imunoperoxidase – método estreptoavidina-biotina

TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE – MÉTODO ESTREPTOAVIDINA-BIOTINA

1. Bloqueio da peroxidase endógena:

A atividade da peroxidase é inibida tratando o tecido com solução de peróxido de hidrogênio 3% em 2 banhos de 10 min. Realizar lavagem padrão por 5 min com água corrente e 2 min em água destilada .

2. Recuperação antigênica:

As amostras fixadas em formol formam ligações aldeído-proteína que podem alterar, destruir ou mascarar alguns antígenos. Como recurso para recuperação desses antígenos são utilizados:

- enzimas proteolíticas (tripsina, pepsina, proteína se-K)
- calor (irradiação por microondas, vapor, banho-maria etc)

Nesta pesquisa foi utilizado o calor por microondas para a recuperação antigênica.

Colocar as lâminas em um suporte com fundo vazado, o qual é colocado num recipiente com capacidade de aproximadamente 1 litro e preenchido com tampão tris-EDTA pH 9,0.

A recuperação antigênica é alcançada em 25 min 30 s na potência máxima de um aparelho microondas de 800W.

Deixar esfriar por 1 h a temperatura ambiente para completar o processo de recuperação.

Proceder a lavagem padrão.

3. Bloqueio da avidina endógena:

Imergir as lâminas em solução de clara de ovo por 15 min.

Realizar a lavagem padrão.

4. Bloqueio das reações inespecíficas:

Mergulhar as lâminas em leite desnatado por 30 min.

Lavagem padrão por 5 min com água corrente e 2 min em água destilada.

Mergulhar em PBS por 5 min.

5. Incubação com anticorpo primário:

Secar cuidadosamente as lâminas e pingar sobre os cortes histológicos o anticorpo em diluição apropriada (1:50), deixando por 15-18h no refrigerador em câmara úmida.

Utilizar anti-A e anti-B humano de origem murina como anticorpo primário, utilizados em cortes diferentes. Como cada paciente terá 3 cortes histológicos, no primeiro adicionar o anti-A, no segundo anti-B e no terceiro não adicionar o anticorpo primário. Este último atua como um controle negativo da reação.

6. Incubação com anticorpo secundário:

Lavar as lâminas com um jato de PBS para interromper a reação com o anticorpo primário.

Colocar as lâminas em uma cuba contendo PBS e deixar por 10 min (trocar a solução a cada 5 min).

Secar as lâminas e incubá-las com o anticorpo secundário (anti IgG de origem murina) conjugado à biotina conforme tempo e temperatura indicada pelo fabricante. (kit LSAB: 30 min a temperatura ambiente).

7. Amplificação com avidina-biotina:

Realizar a lavagem padrão e pingar sobre o corte o complexo avidina-biotinaperoxidase. (kit LSAB: 30 min a temperatura ambiente)

8. Revelação:

Realizar a lavagem padrão e mergulhar as lâminas numa solução de cromógeno [DAB (diaminobenzidina)/PBS (salina tamponada com fosfato)/água oxigenada] por 3 min no escuro.

Lavagem padrão.

9. Contra-coloração:

A contra-coloração é feita com hematoxilina previamente filtrada deixando as lâminas em imersão por 1-3 min.

Lavagem padrão.

10. Desidratar, clarificar, montar, etiquetar:

A desidratação é feita deixando as lâminas mergulhadas em etanol de diferentes concentrações (96, 90, 80 e 70GL) por 2 min em cada. A clarificação é realizada deixando as lâminas mergulhadas por 2 min em 2 recipientes com xilol.

Montar lâmina e lamínula utilizando bálsamo.

Etiquetar as lâminas para identificação.

Preparo das soluções reagentes

Tampão PBS (Solução salina tamponada com fosfatos) 0,01M pH 7,2-7,4

Cloreto de sódio p.a.	7,2 g
Fosfato de sódio dibásico anidro p.a.	1,48 g
Fosfato de sódio monobásico di-hidratado p.a.	0,43 g
Água destilada	qsp 1000 ml

Solução tampão PBS-diluyente

Soroalbumina bovina (BSA)	1,0 g
Azida sódica p.a. (NaN ₃)	0,1 g
Tampão PBS	qsp 100 ml

Tris-EDTA pH 9,0

EDTA (ácido etileno diamino tetracético)	0,37 g
Tris base	1,21 g
Água destilada	qsp 1000 ml

Se necessário ajustar o pH com HCl 1N ou NaCl 1N

Solução substrato cromogênico (reveladora)

Diaminobenzidina (DAB)	72 mg
Peróxido de hidrogênio 3%	1,2 ml
Tampão PBS	qsp 120 ml

Solução de clara de ovo

Clara de ovo	2 unidades
Água destilada	200 ml

Solução de cloreto de cobalto 0,1%

Cloreto de cobalto	100 mg
Água destilada	100 ml

Solução de Ditiotreitól 1,5 mg/ml

Ditiotreitól	150 mg
Água destilada	100 ml

Solução de Cloreto de sódio 0,9%

Cloreto de sódio	0,9 g
Água destilada	100 ml