

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE ABH NO CÂNCER COLORRETAL

RAUL CUTAIT, TSBCP
VENÂNCIO ALVES
JOSÉ LUIS ALVIM BORGES
LUIZ CÂMARA LOPES
JÚLIO SINGER
DAHER CUTAIT, TSBCP
FABIO GOFFI
MARCELO AVERBACH
EDUARDO CAPONE

CUTAIT R, ALVES V, BORGES JLA, LOPES LC, SINGER J, CUTAIT D, GOFFI F, AVERBACH M, CAPONE E – Contribuição ao estudo dos antígenos de superfície ABH no câncer colorretal. *Rev bras Colo-Proct.*, 1989; 9(3): 102-106.

RESUMO: Os antígenos de superfície ABH foram estudados por método imuno-histoquímico em 54 espécimes de câncer colorretal e avaliados quanto à sua expressão, distribuição no tumor e localização celular. Esses antígenos expressavam-se em 77,7% das peças, com distribuição difusa no tumor em 57,1% das vezes. Em nível celular, quando presentes, os antígenos ABH localizavam-se na superfície em 73,8% das vezes e intracelularmente em 16,7% das neoplasias. Os pacientes cujos tumores expressavam os antígenos ABH mostraram uma tendência a um melhor prognóstico ($P = 0,06$).

UNITERMOS: câncer colorretal; ABH antígenos

O câncer do intestino grosso é uma das neoplasias mais freqüentes do mundo ocidental. Em alguns países, como os Estados Unidos, a Austrália, o Canadá e a Inglaterra, constitui-se no segundo câncer em prevalência, sendo superado apenas pelo câncer do pulmão¹. No Brasil, o câncer do intestino grosso é, excluindo-se os tumores de pele, o quarto mais freqüente em homens e o terceiro em mulheres².

Quando da ocasião do diagnóstico da neoplasia, não raras vezes o enfermo já apresenta doença metastática. Por outro lado, entre os pacientes que são operados com intenção curativa, encontram-se aqueles que apresentam evolução desfavorável. Dessa forma, é evidente que as neoplasias de cólon e reto apresentam um comportamento biológico não padronizado. Essa variabilidade de comportamento pode ser compreendida, ao menos em parte, através da análise dos chamados fatores prognósticos, que traduzem clinicamente a agressividade dos tumores. Ultimamente, vem ganhando interesse o estudo de distintos

antígenos relacionados aos tumores. Tal fato tem sido possível graças ao desenvolvimento de modernas técnicas imuno-histoquímicas, que permitem identificar alguns desses antígenos nas células neoplásicas.

O presente trabalho foi elaborado com a finalidade de se investigar as características de expressão dos antígenos de superfície ABH e seu eventual valor prognóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 54 portadores de câncer colorretal operados entre 1977 e 1984. Trinta e um eram do sexo masculino e 25 do sexo feminino, com idade variando entre 31 e 85 anos (média = 60,2 anos, mediana = 61,5 anos). O tempo de acompanhamento clínico variou de 14 a 108 meses (média = 65,2 meses, mediana = 60,5 meses). Os tumores apresentavam as seguintes localizações: ceco – 3; cólon ascendente – 3; ângulo hepático – 1; cólon transversal – 2; ângulo esplênico – 3; cólon descendente – 2; cólon sigmóide – 9; retossigmóide – 11; reto – 19; não determinada (um de dois a quatro tumores sincrônicos – 3).

Os pacientes incluídos neste estudo foram selecionados após preencherem os seguintes pré-requisitos: a) cirurgia realizada com intenção curativa; b) gânglios linfáticos livres de comprometimento neoplásico à revisão histológica realizada por um único patologista; c) seguimento mínimo de dois anos ou até o óbito do paciente, quando relacionado com a doença. Esse último critério foi escolhido pelo fato de que pacientes com lesões Dukes A e B apresentam recidiva de doença na sua quase totalidade nos dois primeiros anos de evolução^{3, 4}.

Para o presente estudo, para que se pudesse obter homogeneidade do material a ser investigado, os blocos de parafina foram reprocessados tanto para o estudo por hematoxilina-eosina quanto para a pesquisa imuno-histoquímica. As lâminas incluem cortes da lesão primária, das margens cirúrgicas e dos gânglios linfáticos dissecados.

Trabalho realizado no Serviço de Colo-Proctologia do Hospital do Andaraí – RJ.

Foram analisadas as características microscópicas dos tumores, de acordo com os critérios definidos por *Dukes* e *Bussey*⁵ e *Jass* e cols.⁶, com a finalidade de se avaliar a interferência dos fatores histopatológicos na evolução dos pacientes. A seguir estão listados os aspectos estudados, com as respectivas classificações empregadas:

a) *Profundidade de invasão pelo tumor*: até camada muscular, até camada externa ou serosa.

b) *Padrão de crescimento do tumor*: expansivo, infiltrativo.

c) *Formação de glândulas*: túbulos simples, túbulos complexos, padrão tubular irregular, túbulos ausentes.

d) *Grau de diferenciação celular*: bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado.

e) *Tipos de tumor*: tubular, viloso, mucinoso e indiferenciado. Quando presentes, mais de um padrão foi assinalado.

f) *Presença de muco no tumor*: definida como a porcentagem da área do tumor examinado substituída por muco.

g) *Polaridade celular*: facilmente discernível, pouco discernível, indiscernível.

h) *Necrose*: ausente, presente.

i) *Fibrose*: intensa, moderada, pouca.

j) *Invasão vascular pelo tumor*: ausente, presente.

l) *Invasão neural pelo tumor*: ausente, presente.

A pesquisa dos antígenos de superfície ABH foi feita em cortes dos blocos parafinados, empregando-se o método de imunoperoxidase, que utiliza anticorpo biotinado antilectina em carneiro, e o complexo avidina biotina-peroxidase, conforme descrito por *Hsu* e cols.^{7, 8}. Como controle positivo utilizou-se lâmina com tumor sabidamente expressando antígenos ABH e, como controle negativo, lâmina à qual não se adicionou o anticorpo primário.

Tabela 1 - Aspectos histopatológicos dos tumores

Aspecto	Variável	N	Evolução*	
			F	D
Profundidade de invasão	Dukes A	20	15	5
	Dukes B	36	26	10
Padrão de crescimento	Infiltrativo	56	42	14
	Expansivo	0	0	0
Formação glandular	Ausente	1	1	0
	Túbulos complexos (TC)	35	29	6
	Túbulos simples (TS)	1	1	0
	TC + TS	19	11	8
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	4	3	1
	Moderadamente diferenciado	50	38	12
	Pouco diferenciado	2	1	1
Tipo de tumor	Tubular (T)	34	23	11
	Viloglandular (VG)	3	3	0
	Indiferenciado (I)	3	3	0
	Viloso (V)	4	3	1
	T + I	9	8	1
	VG + T	1	0	1
	V + T	2	2	0
% Muco	0%	46	34	12
	5%	4		
	10%	4		
	20%	2	8	2
Polaridade celular	Bem discernível	39	28	11
	Pouco discernível	10	8	2
	Indiscernível	7	6	1
Presença de necrose	Ausente	23	17	6
	Pouca	28	22	6
	Moderada	5	3	2
	Intensa	0	0	0
Presença de fibrose	Pouca	19	13	6
	Moderada	34	27	7
	Intensa	3	2	1
Invasão vascular	Positiva	0	0	0
	Negativa	56	42	14
Invasão neural	Positiva	6	3	3
	Negativa	50	39	11
Total		54		

* F - favorável D - desfavorável

A expressão dos antígenos ABH foi estudada sob os seguintes aspectos: quantidade global no tumor, distribuição preferencial no tumor e localização intracelular. O critério empregado para avaliar os antígenos ABH nos espécimes examinados foi o da análise semiquantitativa:

a) *Quantidade global no tumor*: ausentes, discreta, pouca, média, muita.

b) *Distribuição preferencial no tumor*: ausentes, na superfície, na profundidade, polar (no pólo oposto/luz intestinal), difusa, irregular (focos irregularmente dispostos pelo tumor).

c) *Localização intracelular*: ausentes, membrana (quando na região apical das membranas das células), difusa (espalhados pelo citoplasma de maneira regular ou irregular), polar (quando mais concentrados no pólo citoplasmático oposto à luz), irregular.

Todas as lâminas preparadas por imunoperoxidase foram examinadas por um só patologista, o qual não tinha conhecimento dos achados histopatológicos do outro patologista, e vice-versa.

Para que se pudesse verificar a significância estatística da associação entre as variáveis de interesse, foram empregados os testes estatísticos de *Pearson* e, quando pertinentes, o teste exato de *Fisher*⁹. O grau de significância estipulado foi de 5%.

RESULTADOS

Os achados quanto aos 11 parâmetros histopatológicos estudados e a evolução dos pacientes estão representados na *Tabela 1*. A análise estatística desses parâmetros não mostrou interferência de nenhum deles quanto à evolução dos pacientes, favorecendo a interpretação dos achados quanto aos antígenos ABH em relação à evolução.

As características de expressão dos antígenos ABH estão apresentadas na *Tabela 2*.

Os antígenos ABH (*Fig. 1*) expressaram-se em 77,7% dos 54 tumores examinados, com intensidades variáveis. A distribuição no tumor foi difusa em 57,1% dos espécimes onde se identificaram esses antígenos e irregular ou localizada em áreas específicas em 48,9% das vezes.

Em nível celular, quando presentes, os antígenos ABH localizaram-se preferencialmente na membrana das células, em 73,8% dos casos (*Fig. 2*). Em 16,7% das neoplasias, os antígenos ABH expressaram-se no interior do citoplasma (*Fig. 3*).

Todas as manifestações dos antígenos ABH estudadas foram analisadas em relação à evolução dos pacientes, não tendo sido possível demonstrar associações estatisticamente significantes entre essas variáveis. Porém, observou-se entre os pacientes que não expressavam esses antígenos uma tendência a um melhor prognóstico ($p = 0,06$).

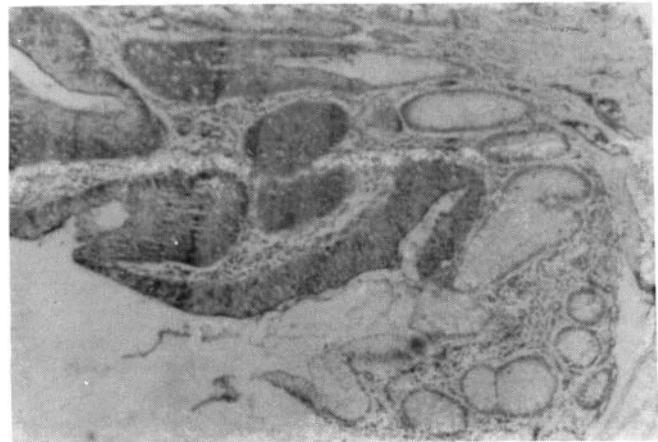


Fig. 1 - Antígenos de superfície ABH no tumor com mucosa adjacente normal (imunoperoxidase, x 20).

Tabela 2 - Características de expressão dos antígenos ABH

Característica	Variável	N (%)	Evolução*	
			F (%)	D (%)
Expressão N = 54	Ausente	12 (22,2)	11 (91,7)	1 (8,3)**
	Presente	42 (77,8)	28 (66,7)	14 (33,3)
Intensidade de expressão N = 42	disc reta	10 (23,8)	6 (60)	4 (40)
	Pouca	9 (21,4)	5 (55,6)	4 (44,4)
	Média	12 (28,6)	7 (58,3)	5 (42,7)
	Muita	11 (26,2)	10 (90,9)	1 (9,1)
Distribuição preferencial no tumor N = 42	Superfície	4 (9,5)	4 (100)	0 (0)
	Profundidade	3 (7,1)	0 (0)	3 (100)
	Difusa	24 (57,2)	17 (70,8)	7 (29,2)
	Irregular	11 (26,2)	7 (63,6)	4 (36,4)
Localização nas células N = 42	Membrana	31 (73,8)	20 (64,5)	11 (35,5)
	Citoplasma	7 (16,7)	5 (71,4)	2 (28,6)
	Polar	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Irregular	4 (9,5)	3 (75,0)	1 (25,0)

* F - favorável

D - desfavorável

** $p = 0,06$

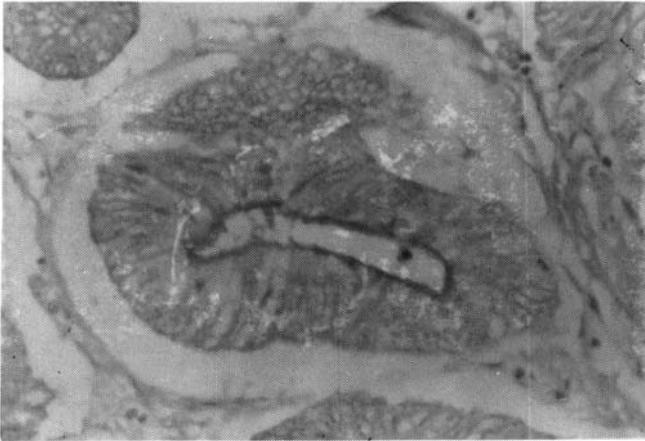


Fig. 2 - Antígenos de superfície ABH localizando-se nas membranas celulares (imunoperoxidase, x 100).

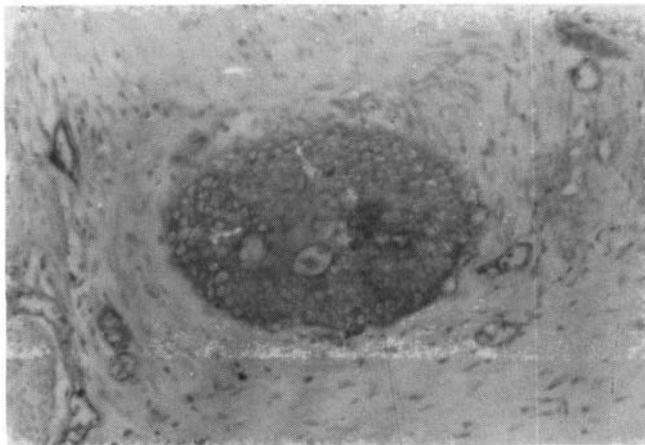


Fig. 3 - Antígenos de superfície ABH localizando-se difusamente em citoplasma (imunoperoxidase, x 100).

DISCUSSÃO

Os antígenos de superfície do sistema ABH foram inicialmente reconhecidos em hemácias¹⁰, sendo mais tarde identificados como componentes de membranas celulares de vários tecidos^{11, 12}. Além disso, esses antígenos foram também descritos em tumores de bexiga¹³, estômago^{14, 15}, cólon e reto^{16, 17, 18}, pulmões¹⁵, pâncreas¹⁵ e cervix uterino¹⁵.

Em câncer colorretal, os primeiros estudos dos antígenos ABH foram conduzidos com técnicas de aderência de hemácias^{14, 19, 20} e de reações de aglutinação e imunofluorescência^{16, 21}. Essas técnicas, entretanto, apresentavam baixa sensibilidade, mormente para o antígeno H, que é a substância precursora para a formação dos antígenos A e B²². Mesmo com o emprego da imunoperoxidase clássica não se detectou alta positividade de expressão dos antígenos ABH²³, o que pode ser explicado por uma perda considerável do antígeno H durante os processos de fixação e de desparafinação²⁴.

De fato, foi apenas com os métodos empregando aglutininas de *Ulex europaeus* (UEA) que, bem recentemente, Yonezawa e cols.²⁵, Shoentag e cols.²⁶, Yuan e

cols.²⁷ Cordon-Cardo e cols.²⁸ alcançaram sensibilidade suficiente para identificar, de maneira mais adequada, os antígenos ABH nos adenocarcinomas colorretais. Esses autores observaram positividade em 77,5 a 95% dos casos. No presente estudo, onde se empregou a técnica da imunoperoxidase pelo complexo avidina-biotina, os antígenos de superfície ABH foram constatados em 77,8% das lesões.

A impressão existente de que a ausência de expressão desses antígenos está associada a um pior prognóstico é decorrente dos trabalhos iniciais realizados com métodos de baixa sensibilidade^{15, 16, 17, 19}. Nas publicações onde os antígenos ABH foram estudados com o método mais sensível do UEA, em apenas uma delas²⁶ procurou-se associar a expressão do antígeno H com a evolução, mas o número pequeno de casos desse estudo não permitiu que se firmassem conclusões a respeito. No presente estudo, embora sem alcançar significância estatística, observou-se no material avaliado uma tendência para um melhor prognóstico quando os antígenos ABH não se manifestaram, o que abre uma nova perspectiva para a análise desses antígenos.

Na mucosa cólica normal, os antígenos ABH estão habitualmente expressos no colo direito, mas muito pouco presentes no cólon esquerdo^{17, 27, 28, 29}. Portanto, o padrão de normalidade para esses antígenos é distinto de acordo com a região anatômica do cólon. A análise da evolução apenas para as lesões situadas no cólon esquerdo mostrou que 90,9% dos pacientes, cujos tumores se encontravam nessa localização e que não expressavam os antígenos ABH, apresentavam bom prognóstico, contrastando com os 67,7% que, expressando os antígenos, tiveram evolução favorável. Ainda que no cólon esquerdo a ausência de antígeno ABH demonstre uma tendência para um melhor prognóstico, não houve confirmação estatística para esse fenômeno. De qualquer forma, é razoável supor que a não expressão dos antígenos ABH nos tumores de cólon esquerdo signifique uma condição de semelhança entre eles e a mucosa normal. Assim, os mecanismos que regulam a atuação das glicosil-transferases, que são as enzimas que promovem a síntese dos antígenos H, A e B³⁰ atuam de maneira semelhante no tumor e na mucosa normal, não manifestando fenotipicamente alterações da membrana celular neoplásica para esse antígeno.

A distribuição dos antígenos ABH pelo tumor, aspecto esse não descrito por outros autores, foi também aqui estudada. Esses antígenos, quando presentes, apresentaram um padrão de distribuição heterogêneo. Esta situação pode representar uma caracterização do conceito de heterogeneidade fenotípica de expressão antigênica das células neoplásicas³¹ ou a existência de distintos clones celulares dentro do mesmo tumor³².

Um outro aspecto estudado foi quanto à localização intracelular dos antígenos ABH. Com os métodos de imunoperoxidase que empregam o UEA, os antígenos ABH foram identificados na membrana celular e, às vezes, também no citoplasma^{25, 26, 27, 28}. No material avaliado, a presença de antígenos ABH no citoplasma pode ser especulada como um excesso de produção desses antígenos ou, então, como decorrente de um bloqueio das

transferases que regulam a utilização do antígeno H como precursor dos antígenos A e B, causando um acúmulo de antígeno H no citoplasma, o qual se cora pela técnica imuno-histoquímica empregada.

A associação entre a localização do antígeno H nas células e o grau de diferenciação foi analisada por Schoentag e col.²⁶, que descreveram esse antígeno, em lesões moderadamente diferenciadas, como posicionado apenas na membrana ou na região apical do citoplasma. Este achado diferiu, em parte, do observado no presente estudo, onde nas lesões de moderado grau de diferenciação os antígenos ABH foram encontrados na membrana e em todo o citoplasma. A análise estatística, contudo, não mostrou valor prognóstico desse aspecto para os pacientes estudados.

Ao terminar, pode-se dizer que os achados deste trabalho abrem a perspectiva de se conhecer melhor o comportamento biológico do câncer colorretal através do sistema ABH e, portanto, estimulam o prosseguimento de investigações concernentes a este intrigante tema.

CUTAIT R, ALVES V, BORGES JLA, LOPES LC, SINGER J, CUTAIT D, GOFFI F, AVERBACH M & CAPONE E - A contribution to the study of ABH surface antigens in colorectal cancer.

SUMMARY: ABH surface antigens were studied in 54 colorectal cancer specimens and evaluated according to: their expression, tumor distribution, cell location. ABH antigens expressed in 77.7% of the tumors, presenting diffuse distribution in the tumor in 57.1% of the cases. When expressed, the ABH antigens were located in the cell surface in 73.8% and intracellular in 16.7%. Patients who did express ABH antigens showed a tendency to a better prognosis (P = 0.06)

KEY WORDS: colorectal cancer; ABH antigens

REFERÊNCIAS

1. Silverberg E, Lubera J. Cancer Statistics, Ca-Cancer J Clinicians 1987; 37: 2-19.
2. Brumini R. Câncer no Brasil, Dados histopatológicos 1976-1980, Ministério da Saúde, Rio 1982; 37-39.
3. Olson RM, Perencevich NP, Malcolm AW, Chaffey JT, Wilson RE. Patterns of recurrence following curative resection of adenocarcinoma of the colon and rectum, Cancer 1980; 45: 2969-2974.
4. DeLeon ML, Schoetz Jr. DJ, Collier JA, Veidenheimer MC. Colorectal Cancer: Lahey Clinic Experience, 1972-1976: An Analysis of Prognostic Indicators, Cancer 1987; 30: 237-242.
5. Dukes CE, Bussey HJR. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. Brit J Cancer 1958; 12: 309-320.
6. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJR, Morson BC, Northover JMA, Todd IP. The grading of rectal cancer: historical perspective and a multivariate analysis of 447 cases. Histopathology 1986; 10: 437-459.
7. Hsu SM, Raine LM, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. Am J Clin Pathol 1981; 75: 816-821.
8. Hsu SM, Raine LM, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 1981; 29: 577-580.
9. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. New York, Wiley 1973.
10. Landsteiner K, Levine P. On group specific substances in human spermatozoa. J Immunol 1926; 12: 415-418.
11. Glynn LE, Holborow EJ. Distribution of blood-group substances in human tissues. Brit Med Bull 1959; 15: 150-153.
12. Ernst C, Thurin J, Atkinson B, Wurzel H, Herlyn M, Stromberg N, Civin C, Koprowski H. Monoclonal antibody localization of A and B isoantigens in normal and malignant fixed human tissues. Amer J Path 1984; 117: 451-461.
13. Weinstein RS, Coon IV, Alroy J, Davidsohn I. Tissue-associated blood group antigens in human tumors. In DeLellis RA. Diagnostic immunohistochemistry. Masson, New York, 1981: 239-261.
14. Sheahan DG, Horowitz SA, Zamcheck N. Deletion of epithelial ABH isoantigens in primary gastric neoplasms and in metastatic cancer. Amer J Dig Dis 1971; 16: 961-969.
15. Davidsohn I. Early immunological diagnosis and prognosis of carcinoma. Amer J Clin Path 1972; 57: 715-730.
16. Denk H, Tappeiner G, Davidovits A, Eckerstorfer R, Holzner JH. Carcinoembryonic antigen and blood group substance in carcinomas of the stomach and colon. J Nat Cancer Inst 1974; 53: 933-942.
17. Cooper HS, Hasler Jr. WE. Blood group substances as tumor antigens in the distal colon. Amer J Clin Path 1978; 69: 594-598.
18. Wiley EL, Mendelsohn G, Eggleston JC. Distribution of carcinoembryonic antigens and blood group substances in adenocarcinoma of the colon. Lab Invest 1981; 44: 507-513.
19. Davidsohn I, Kovarik S, Lee CL. A, B, and O substances in gastrointestinal carcinoma. Arch Path 1966; 81: 381-390.
20. Kovarik S, Davidsohn I, Stejskal R. ABO antigens in cancer. Detection with the mixed cell agglutination reaction. Arch Path 1968; 86: 12-21.
21. Abdelfattah-Gad M, Denk H. Epithelial blood group antigens in human carcinomas of the distal colon: further studies on their pathologic significance. J Nat Cancer Inst 1980; 64: 1025-1028.
22. Pittiglio DH. Genetics and biochemistry of A, B, H and Lewis antigens. In Wallege ME, Gibbs FL. Blood Group Systems: ABH and Lewis. Arlington, American Association of Blood Banks 1986; 1-15.
23. Wiley EL, Mensehohn G, Eggleston JC. Distribution of carcinoembryonic antigens and blood group substances in adenocarcinoma of the colon. Lab Invest 1981; 44: 507-513.
24. Leatham A, Atkins N. Lectin binding to formalin fixed paraffin sections. J Clin Pathol 1983; 36: 747-750.
25. Yonezawa S, Nakamura T, Tanaka S, Sato E. Glycoconjugate with Ulex europeus agglutinin-I-binding sites in normal mucosa, adenoma and carcinoma of the human large bowel. J Nat Cancer Inst 1982; 69: 777-785.
26. Schoentag R, Williams B, Kuhns W. The distribution of blood group substance H and CEA in colorectal carcinoma. Cancer 1984; 53: 503-509.
27. Yuam M, Itzkowitz SH, Palekar A, Shamsuddin AM, Phelps PC, Trump BF, Kim YS. Distribution of blood group antigen A, B, H, Lewis^a, Lewis^b in human normal, fetal, and malignant colonic tissue. Cancer Res 1985; 45: 4499-4511.
28. Cordon-Cardo C, Lloyd KO, Sakamoto J, McGroarty ME, Old LJ, Melamed MR. Immunohistologic expression of blood-group antigens in normal human gastrointestinal tract and colonic carcinoma. Int J Cancer 1986; 37: 667-676.
29. Ernst C, Thurin J, Atkinson B, Wurzel H, Herlyn M, Stromberg N, Civin C, Koprowski H. Monoclonal antibody localization of A and B isoantigens in normal and malignant fixed human tissues. Amer J Path 1984; 117: 451-461.
30. Pittiglio DH. Genetics and biochemistry of A, B, H and Lewis antigens. In Wallace ME, Gibbs FL. Blood Group Systems: ABH and Lewis. Arlington, American Association of Blood Banks, 1986; 1-56.
31. Arends JW, Bosman FT, Hilgers J. Tissue antigens in large-bowel carcinoma. Biochim Biophys Acta 1985; 780: 1-19.