

# READQUISICION DE LOS ISOANTIGENOS A, B Y H EN EL CARCINOMA DE COLON IZQUIERDO Y RECTO

## EL VALOR DEL USO DE LA INMUNOMARCACION CON ANTICUERPOS MONOCLONALES A TRAVES DE LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA

Dr. José María Foscarini\* - Dr. Rubén Sambuelli\*\* - Dr. Raúl Armando\*\*\* - Dr. Luis Tosello\*\*\*\*  
Dr. Rafael Palencia\*\*\*\*\*

### RESUMEN

Los isoantígenos de los grupos sanguíneos A, B y H se hallan presentes en las membranas de los glóbulos rojos, así como también en la superficie celular de otros tejidos, como ser células endoteliales y epiteliales, y su detectabilidad depende de la integridad de la estructura y composición de la superficie celular.

La presencia de estos antígenos en mucosas normales decrece desde colon derecho hacia el recto.

Se evalúan 93 pacientes intervenidos quirúrgicamente por carcinoma primitivo del colon izquierdo-recto sobre un total de 143 cánceres colónicos operados. Con técnicas de inmunomarcación con anticuerpos monoclonales se observó una readquisición de los isoantígenos en los casos de cáncer de colon izquierdo, lo que está correlacionado con el grado de anaplasia cito-histológica y el grado C de Dukes de infiltración, lo cual podría ser la traducción de las alteraciones celulares que conducen a la desdiferenciación e invasión.

Los resultados de la aplicación de esta técnica permiten avizorar excelentes resultados, tanto en el diagnóstico como en la predicción pronóstica del cáncer de colon, para lo cual se ha encarado un estudio prospectivo de todos los pacientes, lo que será motivo de otra comunicación.

### SUMMARY

The iso antigens of blood groups A, B and H are present not only in the erythrocytes' membranes, but also on the cellular surface of other tissues, such as endothelial and epithelial cells, and their detection depends on the integrity of the structure and composition of the cellular surface.

The presence of these antigens in normal mucose decreases from the right colon down to the rectum. Ninety-three patients who underwent surgery for primitive carcinoma of left colon-rectum are evaluated over a total amount of 143 operated colonic carcinomas.

In the use of immunomarking techniques with monoclonal antibodies, a re-acquisition of isoantigens was observed in the cases of carcinoma of the left colon, and it is related to the degree of cyto-histological anaplasia and to Dukes' C degree of infiltrate and this, in turn, could be the translation of cellular alterations which lead to malignancy and invasion.

The results of the application of this technique may allow us to predict excellent results, both in the diagnosis and in the prognosis of colon carcinoma. Therefore a prospective study of all patients will be made and which will be the subject matter of another report.

### INTRODUCCION

Las sustancias de los grupos sanguíneos A, B y H están constituidas por glicoproteínas y glicolípidos que se encuentran en las membranas, tanto de los glóbulos rojos como así también en células de otros tejidos y su detección depende de la integridad de la estructura y composición de la superficie celular.<sup>(1)</sup>

Ha sido estudiada su distribución en el epitelio urinario, ginecológico y en el tracto digestivo, habiéndose en algunos casos demostrado que la pérdida de esas sustancias de grupo sanguíneo pueden ser indicadoras de células que van a sufrir transformación neoplásica, y también evaluadas como factor de pronóstico para algunos tumores malignos.<sup>(2, 9, 11, 15, 16)</sup>

En este trabajo efectuamos una evaluación de los resultados de la inmunomarcación de la mucosa de colon izquierdo, incluido el recto, en relación con la patología tumoral maligna, siendo una continuación del trabajo que presentáramos al 9º Congreso Mundial de Cirugía Digestiva en Israel el año próximo pasado.<sup>(10)</sup>

Han habido estudios previos como los de Davidsohn<sup>(6, 7)</sup> sobre este tema, pero usando técnicas de inmunofluorescencia. En nuestro trabajo, en cambio,

usamos anticuerpos monoclonales para identificar las sustancias A, B y H de grupo sanguíneo, aplicando técnicas de inmunoperoxidasa.

De los estudios se observa que las células epiteliales colónicas contienen cantidad de antígenos que varían de acuerdo con la edad del paciente, estado secretor y localización de la muestra.<sup>(3, 4)</sup>

Trabajos previos publicados indican que en condiciones normales, estas sustancias están presentes en cantidades importantes en el colon derecho y mitad del transverso, decreciendo progresivamente hasta el recto.<sup>(8, 19, 20)</sup>

Evaluándose neoplasias colónicas izquierdas sorprendentemente readquieren las sustancias de grupos sanguíneos al desdiferenciarse, como lo informaran Denk y col., y en particular cuando la invasión local y regional es más avanzada.

### MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 93 pacientes intervenidos quirúrgicamente de cáncer de colon izquierdo y recto sobre un total de 143 operaciones sobre colon y recto efectuadas en el Servicio de Cirugía de la Clínica Reina Fabiola y

\* Profesor Titular de Cirugía I, Universidad Católica de Córdoba.

\*\* Profesor Titular de Anatomía Patológica y Fisiopatología, Universidad Católica de Córdoba.

\*\*\* Profesor Adjunto de Anatomía Patológica y Fisiopatología, Universidad Católica de Córdoba.

\*\*\*\* Profesor Adjunto de Cirugía I, Universidad Católica de Córdoba.

\*\*\*\*\* Docente autorizado de Cirugía I, Universidad Católica de Córdoba.

Cátedra de Cirugía I de la Universidad Católica de Córdoba y cuyas piezas quirúrgicas fueron analizadas en la Cátedra de Anatomía Patológica y Fisiopatología de la misma universidad durante el período 1980-1987.

Analizando su distribución conforme a localización en el colon izquierdo, la misma ha sido la siguiente:

Cirugía colo-rectal total	143 (100 %)
Cirugía del cáncer de colon izquierdo y recto	93 (65,0 %)
Cirugía de cáncer del sigmoides	37 (39,8 %)
Cirugía del cáncer de recto	30 (32,2 %)
Cirugía del cáncer recto sigmoideo	16 (17,3 %)
Cirugía del colon descendente	10 (10,7 %)

En el estudio anatomopatológico se evaluó el tipo histológico, el grado de infiltración conforme a la clasificación de Dukes y se tomaron muestras representativas de mucosas normal y neoplásica para someterlas a la prueba de inmunoperoxidasa indirecta con anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en esta experiencia fueron:

1. Anticuerpo monoclonal contra el antígeno A del grupo sanguíneo humano, desarrollado en líquido ascítico de ratón, de la clase IgG, y fue usado en dilución 1:50 en 0,05 M Tris Buffer a pH 7,6 con incubación de 20 minutos a temperatura ambiente.
2. Anticuerpo monoclonal "anti-B", de características y dilución de trabajo similar a lo referido para el anticuerpo anti "A".
3. El antígeno "anti-H" es, en cambio, de la clase IgM, y se usó en dilución 1:50. Como los anteriores este anticuerpo se obtiene de sobrenadantes de cultivos libres de contaminantes presentes en el líquido ascítico de ratón, incluidas inmunoglobulinas.

Los anticuerpos conjugados con peroxidasa son preparados por la conjugación de inmunoglobulinas separadas por cromatografía, con peroxidasa de rábano altamente purificada.

Los cortes parafinados de 6 micras de espesor medio fueron desparafinados en xileno e hidratados con al-

coholes decrecientes. Tras el primer antisuero y los correspondientes lavados se usó el suero peroxidasa-antiperoxidasa desarrollado en ratón y el revelado se hizo con 3-3 tetracloruro de diaminobenzidina durante 5 minutos para producir un producto precipitado de color marrón.

Los controles positivos que aseguraron la tinción correcta fueron "internos" y correspondieron a tinción positiva de los endotelios vasculares y de los eritrocitos.

Los controles negativos se efectuaron absorbiendo el anticuerpo con glóbulos rojos lavados del grupo correspondiente.

El contraste de los preparados se efectuó con hematoxilina, y se completó con deshidratación con alcoholes crecientes, aclarado con xileno y montaje con bálsamo artificial.

### OBJETIVO DEL PRESENTE ESTUDIO

La finalidad del estudio que efectuamos ha sido la de fundamentar la hipótesis por la cual los antígenos de grupos sanguíneos tienen valor pronóstico, ya que tumores morfológicamente similares evolucionarían de manera diferente, según estén o no alterados los antígenos.

Para esto se estudiaron distintos tipos de tumores con diferente grado de diferenciación celular y diverso grado de invasión.

### Criterios para evaluar reactividad a antígenos

Se basó en el número de células que presentaban reactividad

Menos de 25 % células	...	(-) Negativo
Entre 25 y 35 %	.....	(+) Positivo débil
Entre 35 y 50 %	.....	(++) Positivo
Más del 50 %	.....	(+++)

El grado de diferenciación celular y el hallazgo de positividad antigénica en colon izquierdo exhibieron estrecho paralelismo.

### 93 pacientes - Colon izquierdo (65 % del total)

Casos	Celularidad	Casos	Marcación antigénica			
			(-)	(+)	(++)	(+++)
Dukes A 18 (19,3 %)	Bien diferenciado	12	0	1	4	7
	Moderadamente dif.	3	0	1	2	0
	Poco diferenciado	3	0	0	1	2
Dukes B 32 (34,4 %)	Bien diferenciado	4	0	1	1	2
	Moderadamente dif.	25	8	14	3	0
	Poco diferenciado	3	0	0	2	1
Dukes C 43 (46,3 %)	Bien diferenciado	4	0	4	0	0
	Moderadamente dif.	34	0	1	5	28
	Poco diferenciado	5	0	0	4	1

Es importante destacar que a mayor indiferenciación existe una relación más estrecha con la readquisición de los antígenos.

Todas las áreas de metástasis ganglionares observadas en los tumores del colon izquierdo fueron positivas (++) o (+++), observación idéntica en aquellos casos con metástasis hepáticas.

En la mucosa colónica izquierda normal no neoplásica la tinción fue siempre muy débil, tanto en la vacuola de mucina como en el citoplasma adyacente, y en algunos casos no hubo tinción.

En los pacientes con *cáncer de colon*, los tumores más diferenciados de la graduación A de Dukes mostraron que, en general, retenían los antígenos, mientras que

en las infiltraciones de las capas musculares y/o metástasis ganglionares de los grados B y C de Dukes, respectivamente, la tinción era muy débil o ausente.

En conclusión, la tinción se observó débil o negativa en mucosas normales alejadas de la neoplasia, pero francamente positivas en las neoplasias con mayor grado de infiltración y en mucosas inmediatamente vecinas a las neoplasias.

En los tumores mucosecretantes, la tinción se demostró más débil que en otras variedades.

## DISCUSION

Muchos trabajos de investigación se han realizado a los efectos de obtener marcadores celulares que pudiesen tener valor predictivo en el comportamiento tumoral. Muchos de estos esfuerzos estuvieron enfocados a examinar propiedades de la membrana celular, habiéndose señalado anomalías en su composición y estructura.

De los parámetros examinados hasta la fecha, los antígenos relacionados con los grupos sanguíneos aparecen como particularmente promisorios como potenciales marcadores.

La pérdida de los antígenos del grupo sanguíneo en el colon izquierdo normal es atribuida por algunos autores a la degradación bacteriana.

La reaparición de la tinción positiva en los carcinomas del colon probablemente represente una despresión de funciones genéticas embrionarias en el tumor. Así, Szulman demostró que las células mucosas del aparato digestivo embrionario contienen sustancias del grupo sanguíneo solubles en alcohol durante la vida fetal, pero que desaparecen durante su evolución al secretar sustancias del grupo sanguíneo hidrosolubles al comenzar la secreción mucosa.<sup>(19)</sup>

Esta producción de sustancias del grupo sanguíneo hidrosolubles es suprimida en el colon izquierdo.

Algunos autores han pensado en la aparición de un neoantígeno de grupos sanguíneos en las áreas tumorales no compatible con el grupo eritrocitario y como resultado de alguna mutación somática.<sup>(13)</sup>

Estos antígenos se hallan en la membrana celular y es conocida la importancia de la misma en la manutención de la cohesión epitelial. La pérdida de capacidad de contacto celular es manifiesta en las neoplasias.

Por ello, la adquisición de los antígenos del grupo sanguíneo en el colon izquierdo podría ser la traducción de las alteraciones celulares que conducen a la desdiferenciación.

Esto último constituiría la base para pronosticar la evolución favorable o no de las neoplasias colónicas, por lo que se ha encarado un estudio evaluativo prospectivo de los casos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 BERGMAN, S., y JAVADPOUR, N.: The all surface antigens A, B, O as indicator of malignant potential in stage A bladder carcinoma. *J. Urol.*, 119:49, 1978.
- 2 COOMBS, R.; BEDFORD, D., y AROUILLARD, I.: A and B blood group antigens in human epidermal cells demonstrated by mixed agglutination. *Lancet*, 1:461, 1956.
- 3 COOPER, H.: Blood group substances as tumor antigens in the distal colon. *Am. J. Clin. Pathol.*, 69:594-598, 1978.
- 4 COOPER, H., y REUTER, V.: Peanut lectin-binding sites in polyps of the colon and rectum. *Lab. Inv.*, 49:655-661, 1983.
- 5 CUMAR, F.; BRADY, R.; KOLODNY, E.; FARLAM, V., y MORA, P.: Enzymatic block in the synthesis of gangliosides in DNA virus transformed tumorigenic mouse cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 67:757, 1970.
- 6 DAVIDSOHN, I.; KOVARIK, S., y LEC, Ch.: A, B and O substances in gastrointestinal carcinoma. *Arch. Pathol.*, 81:381-390, 1966.
- 7 DAVIDSOHN, I.: Early immunologic diagnosis and prognosis of carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 57:715, 1972.
- 8 DAS, C.; BOXTON, N., y CLASHAN, R.: Invasive potential of superficial bladder cancer. A study of the relative merits of predictive parameters. *Brit. J. Urol.*, 57:32, 1985.
- 9 ERNST, C.; THURIN, J.; ATKINSON, B.; WURZEL, H.; HERLYN, M.; STROMBERG, N.; CIVIN, C., y KOPROWSKY, H.: Monoclonal antibody localization of A and B isoantigens in normal; and malignant fixed human tissues. *Am. J. Pathol.*, 117:451-461, 1984.
- 10 FOSCARINI, J. M.; SAMBUELLI, R. H.; ARMANDO, R.; TOSELLO, J. E.; PALENCIA, R.: Loss of isoantigens A, B and H in colonic carcinoma. The value of the indirect immunoperoxidase method with monoclonal antibodies. 9th World Congress of the Collegium Internationale Chirurgiae Digestive. Jerusalem, Israel, 1986.
- 11 GUITA, R.; SCHUSTER, R., y CHRISTIAN, W.: Loss of isoantigens A, B and H in prostate. *Am. J. Pathol.*, 70:439, 1973.
- 12 O'CORMAN, T., y LAMONT, T.: Glycoprotein synthesis and secretion in human colon cancers and normal colonic mucosa. *Cancer Res.*, 38:2784, 1978.
- 13 JONES, S.; QUINN, D.; WARD, H.; PIHL, E., y NAIRN, R.: Persistence of organ- and isoantigens in vitro in a long-term culture cell line of colonic carcinoma. *Pathol.*, 14:405-408, 1982.
- 14 LARREGINA, A.; PATERNO, E.; AVANIGANA, M.; ELSNER, B.; IOTTI, R.; DIAZ, E.: Determinación de isoantígenos de grupos sanguíneos en tumores vesicales. *Actas XXII Congr. Arg. Patol.*, 118, 1985.
- 15 MAGNANI, J.; STEPLEWSKY, Z.; KOPROWSKY, H., y GINSBURG, V.: Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res.*, 43:5489, 5492, 1982.
- 16 MC NUTT, N.; HERSHBERG, R., y WEINSTEIN, R.: Further observations on the occurrence of nexuses in benign and malignant human cervical epithelium. *J. Cell Biol.*, 51:805, 1971.
- 17 RADZUM, H.; PARWARESCH, M.; FELLER, A., y HANSMANN, M.: Monocyte macrophage specific monoclonal antibody Ki-Mi recognises interdigitating reticulum cells. *Am. J. Pathol.*, 117:441-450, 1984.
- 18 SAMBUELLI, R. H.; ARMANDO, R.; GOMEZ, S.; THEAUX, R.; PELLEGRINI, V., y BENGIO, R.: Valoración del uso como factor de predicción de pronóstico de la técnica de la inmunoperoxidasa indirecta con anticuerpos monoclonales para detección de antígenos de superficie de grupos sanguíneos en el urotelio neoplásico. *Actas XXII Congreso Argentino de Patología*, 117, 1985.
- 19 SAMBUELLI, R. H.; ARMANDO, R.; GOMEZ, S.; THEAUX, R.; FOSCARINI, J. M.: Inmunomarcación con anticuerpos monoclonales para antígenos de grupos sanguíneos A, B, H en cáncer de colon. *Actas XXIII Congreso Argentino de Patología*. Buenos Aires, 1986.
- 20 SZULMAN, A.: The histological distribution of blood group substance A and B in man. *J. Exp. Med.*, 11: 785, 1960.
- 21 WILEY, E.; MURPHY, P.; MENDELSON, G., y EGGLESTON, J.: Distribution of blood group substance in normal human colon. Use of the unlabeled antibody (PAP) immunoperoxidase technic to identify A and B blood group substances. *Am. J. Clin. Pathol.*, 76:806-809, 1981.