

DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE ABH EM CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DA BEXIGA

Descrição do método e comparação com a histologia clássica

VENÂNCIO A. FERREIRA ALVES¹, MIGUEL SROUGI², RAIMUNDA T. DE MACEDO SANTOS³,
LUZIA UMEDA YAMAMOTO⁴, LUIZ CARLOS DA COSTA GAYOTTO⁵, SAMI ARAP⁶

Instituto Adolfo Lutz e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – São Paulo, SP

RESUMO

Perda dos antígenos de superfície ABH é relatada em diversas neoplasias malignas, incluindo-se os carcinomas de bexiga.

Estudos empregando técnica de aderência de hemácias (SRCA) sugerem que esta perda é mais significativa nas neoplasias menos diferenciadas, com pior prognóstico. Entretanto, o impacto destes achados em termos práticos foi atenuado por limitações metodológicas do SRCA.

*Sabendo da elevada eficácia dos métodos imuno-histoquímicos mais modernos, recorremos à lectina do *Ulex europaeus* para a detecção dos antígenos ABH, mediante amplificação com o complexo avidina-biotina-peroxidase, pesquisando correlação com a graduação histológica, critério clássico na avaliação prognóstica.*

Dos 66 casos estudados, 39 (59,1%) apresentavam manutenção dos antígenos em suas membranas. Nos casos grau I a positividade atingiu 85,0%, sendo quantificada como "intensa" em 69,2%. Nos casos graus II a positividade foi 82,7%, mas só em 58,6% mostrou-se "intensa". No outro extremo, apenas 17,0% dos casos grau III mostraram positividade, que foi "intensa" em 12,5%.

Concluímos, então, que este método imuno-histoquímico é de fácil execução e aplicação a amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, podendo vir a ser útil na rotina urológica com vistas à avaliação prognóstica.

UNITERMOS: *Carcinoma da bexiga; imuno-histoquímica; antígenos de superfície ABH.*

INTRODUÇÃO

Os carcinomas de células transicionais (CCT) de bexiga constituem a segunda neoplasia mais freqüente do trato urinário, sendo superados, em freqüência, apenas pelos adenocarcinomas de próstata¹. No Brasil, foram identificados 8.292 novos casos de câncer de bexiga no período de 1976 a 1980² e nos Estados Unidos da América estima-se que cerca de 40.000 novos casos tenham sido detectados em 1985³. Neste mesmo país, calcula-se que cerca de 10.800 pacientes terão ido a óbito pela doença em 1985³, o que atesta a importância do problema e justifica os esforços empreendidos no sentido de se melhor conhecer a história natural dos CCT de bexiga e com isto favorecer seu controle.

As neoplasias de bexiga são constituídas por clones celulares heterogêneos, de maior ou menor agressividade, o que confere a estes tumores

um comportamento biológico até certo ponto imprevisível^{4, 5}.

Isto estimulou a pesquisa de parâmetros que pudessem prever, de forma mais precisa, a tendência evolutiva da neoplasia em cada paciente, e neste sentido destacaram-se os estudos relativos ao valor prognóstico da graduação histológica da neoplasia, da extensão de envolvimento da parede vesical, das alterações histológicas da mucosa vesical aparentemente não-envolvida, da análise citogenética do tumor e, recentemente, da pesquisa dos antígenos de superfície ABH.

A importância dos antígenos de superfície ABH em patologia humana foi estabelecida a partir do trabalho pioneiro de Coombs e col., que, em 1956, demonstraram que a presença destes antígenos não se restringia às hemácias, mas distribuía-se por células de diferentes tecidos do organismo⁶. A confirmação deste achado por outros autores^{7, 8} serviu para firmar o con-

¹Diretor, Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, ²Professor Livre Docente do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), ³Biologista, Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, ⁴Professor Livre Docente, Departamento de Patologia (FMUSP), ⁵Professor Titular, Departamento de Urologia FMUSP. Endereço para correspondência: ¹Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 355, Caixa Postal 7027, São Paulo, SP, CEP 1000.

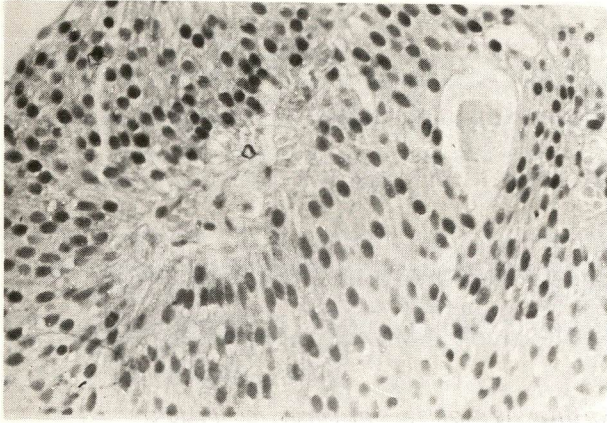


FIGURA 1 — Carcinoma de células transicionais Grau I. O pleomorfismo celular e as mitoses são escassos. HE x 500.

ceito de que os antígenos ABH são componentes normais da membrana celular de estruturas e órgãos tão diversos como endotélio, brônquios, trompa, pele, pâncreas, traquéia, esôfago, estômago, rim, epitélio transicional e outros.

Partindo de evidências que indicavam alterações na estrutura e composição da membrana celular nos processos de transformação maligna, Kay explorou, em 1957, possíveis alterações na expressão dos antígenos de superfície ABH em neoplasias vesicais⁹. Executou, para tanto, uma prova de hemaglutinação com suspensão de células obtidas de bexigas normais e de neoplasias vesicais. Enquanto as células normais evidenciaram preservação dos antígenos ABH em todas as amostras testadas, ausência de atividade antigênica foi observada em várias suspensões de células neoplásicas, principalmente naquelas provenientes de tumores mais indiferenciados e invasivos.

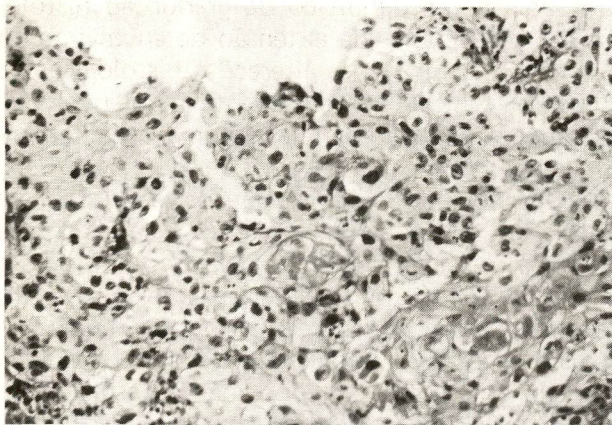


FIGURA 2 — Carcinoma de células transicionais Grau III. Acentuada anaplasia, freqüentes figuras de mitose bizarra e infiltração por neutrófilos. HE x 200.

Posteriormente, Davidsohn e seu grupo modificaram o método proposto por Kay, permitindo sua aplicação a cortes teciduais, técnica que passou a ser referida como "Teste de Aderência de Hemácias"^{10, 11}.

Utilizando esta metodologia, demonstrou-se que o desaparecimento dos antígenos de superfície ABH era observado em espécimens de CCT de bexiga, constatando-se perda dos antígenos em 45% das lesões diferenciadas, em 88% das lesões indiferenciadas e em 96% das lesões metastáticas¹⁰.

Conquanto as alterações na expressão dos antígenos ABH em neoplasias malignas da bexiga sejam um fato bem aceito e compreendido, algumas dificuldades têm sido relatadas com respeito à precisão do teste de aderência de hemácias (SRCA) no sentido de detectar este fenômeno: 1) O SRCA constitui um método de difícil padronização, de modo que pequenas diferenças de processamento podem alterar a aderência das hemácias na lâmina e falsear os resultados¹²⁻¹⁴; 2) os processos de fixação e desparafinização acarretam perda de antígenos da superfície celular^{14, 15}. Além disto, alguns dos antígenos ABH estão ligados a glicolipídeos da membrana e o emprego de etanol no processamento do material dissolve estes glicoconjugados, reduzindo sua expressão^{14, 15}. Desta forma, como o teste de Aderência de Hemácias não é extremamente sensível, alguns espécimens com antígenos ABH presentes apresentam resultado negativo após o processamento histológico; 3) a perda dos antígenos ABH não representa um fenômeno do tipo "tudo ou nada", mas se caracteriza por uma re-

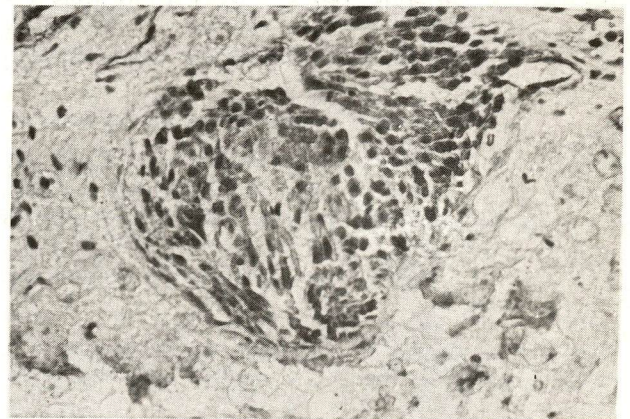


FIGURA 3 — Carcinoma de células transicionais Grau I. Intensa positividade para antígenos ABH mediante reação com UEA-ABC. Note-se a negatividade do tecido conjuntivo adjacente. UEA-ABC x 500.

dução quantitativa do número de determinantes antigênicos, variável de caso para caso^{1,2}. Desta forma, uma perda parcial dos antígenos ABH dentro do processo de transformação maligna às vezes não é detectada pelo SRCA, já que as hemácias indicadoras podem se fixar nos antígenos remanescentes e produzir resultados falso-positivos.

Vemos, então, que, apesar de seus resultados se mostrarem muito úteis na previsão da evolução de pacientes com neoplasias de bexiga, a pesquisa dos antígenos ABH através do teste de aderência de hemácias apresenta limitações que comprometem seu emprego rotineiro na prática clínica.

Por este motivo, tendo nosso grupo experiência prévia com aplicação de métodos imuno-histoquímicos em cortes teciduais^{16,17} resolvemos recorrer a uma técnica que utiliza a lectina do *Ulex europaeus* e o complexo avidina-biotina-peroxidase para a detecção de antígenos de superfície em CCT de bexiga, pesquisando uma correlação com a graduação histológica, critério clássico na avaliação prognóstica destes tumores.

MATERIAL E MÉTODOS

Sessenta e seis espécimens, obtidos por ressecção transuretral ou cistectomia em pacientes com carcinoma de células de transição de bexiga constituem o material do presente estudo. Em todos estes casos existiam informações sobre o

estado clínico e anatomopatológico da neoplasia.

De cada bloco foram preparadas lâminas para o estudo imuno-histoquímico de avaliação dos antígenos de superfície ABH e lâminas para o estudo histológico, incluindo avaliação do grau da neoplasia, coradas pela hematoxilina e eosina.

A pesquisa dos antígenos de superfície ABH foi feita através de técnica de imunoperoxidase envolvendo a utilização de lectina purificada do *Ulex europaeus*, anticorpo biotinado antilectina obtido em carneiro e o complexo avidina-biotina-peroxidase. Este procedimento, descrito para outras situações por Hsu e col.¹⁸, foi modificado e aplicado após a desparafinização de cortes dos espécimens neoplásicos. Os detalhes metodológicos são descritos na tabela I.

As lâminas submetidas ao estudo com UEA-ABC foram classificadas como "positivas" quando os plasmalemas das células epiteliais neoplásicas mostravam-se significativamente corados, podendo ser caracterizados 2 subgrupos mediante semiquantificação, um apresentando grau "intermediário" de positividade e o outro correspondente a coloração "intensa". Foram designadas "negativas" as lâminas cuja coloração foi mínima ou ausente.

As leituras das lâminas, tanto preparadas pela hematoxilina e eosina como pelo UEA-ABC, foram feitas separadamente e em código numérico, por um mesmo observador (V.A.F.A.) que não conhecia a relação entre ambas as lâminas

TABELA 1 — Técnica para detecção imuno-histoquímica de antígenos ABH utilizando lectina de *Ulex europaeus* e complexo avidina-biotina-peroxidase:

- 1) Remoção da parafina (xilol 2x10 min. etanol absoluto, 95%, 80% e 50%, 3 minutos cada).
- 2) Destruição das peroxidases endógenas (H₂O₂ 3% em metanol 20 minutos à temperatura ambiente).
- 3) Incubação com solução de lectina purificada do *Ulex europaeus*, diluído em PBS na concentração de 1 ug/ml*, durante 45 minutos a 37° C.
- 4) Incubação com imunoglobulina biotinilada anti-*Ulex*, obtida em carneiro** e diluída a 0,25 ug/ml em PBS, durante 30 minutos a 37° C.
- 5) Incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase, durante 30 minutos a 37° C. Esta solução é preparada no momento da sua utilização, através da mistura de 10 ug/ml de avidina-D com 2, 5 ug/ml de biotina conjugada à peroxidase***, em solução de PBS.
- 6) Revelação com substrato da peroxidase, recém-preparada (15 mg 3,3 Diaminobenzidina**** e 6 ml de H₂O₂ e 6% diluídos em 100 ml PBS 0,01 M, pH: 7,4). Esta incubação é feita durante 3 minutos a 37° C.
- 7) Contracoloração com hematoxilina de Mayer por 5 minutos.
- 8) Desidratação em álcoois, diafanização em xilol e montagem em Bálsamo do Canadá.

Obs.: Após as etapas números 2, 3, 4 e 5 efetua-se com tampão (PBS: 0,01M; pH 7,4), 3 x 5 minutos. Após a revelação (etapa número 6) efetua-se lavagem em água corrente por 5 minutos.

* Purified *Ulex europaeus* n° 1, Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

** Biotin-labelled anti-*Ulex europaeus* n° 1, Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

*** "VectastainTM ABC Reagent", Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

**** 3,3¹; 4,4¹ — Tetraaminobiphenyl tetrahydrochloride, grade II, Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

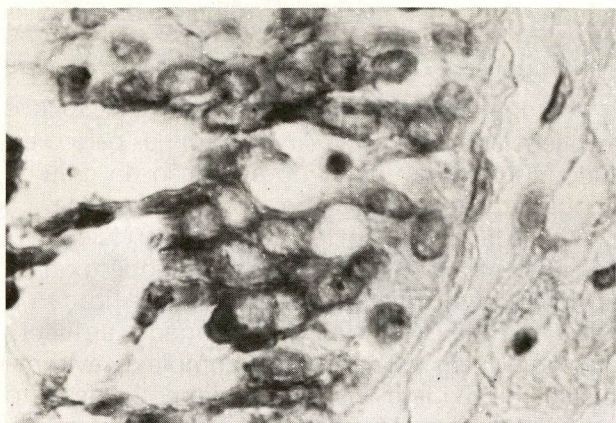


FIGURA 4 – Carcinoma de células transicionais Grau II. Intensa positividade para antígenos ABH é encontrada nas membranas nas células neoplásicas. UEA-ABC x 800.

e as características clínicas do paciente em questão. Desta forma, procurou-se evitar qualquer interferência tendenciosa do observador na interpretação das lâminas.

O controle de sensibilidade e de especificidade da reação imuno-histoquímica do UEA-ABC foi feito de 3 formas: 1) Controle positivo externo: consistiu no estudo do epitélio de espécimens de bexiga normal, obtidos em autópsias de indivíduos falecidos sem doença urológica. Estes espécimens foram processados pela técnica do UEA-ABC em concomitância com os espécimens neoplásicos em estudo; 2) Controle positivo interno: consistiu na análise do endotélio e das hemácias presentes nos vasos e capilares da parede vesical dos espécimens estudados. Outro controle positivo analisado foi o epitélio vesical normal adjacente à neoplasia;

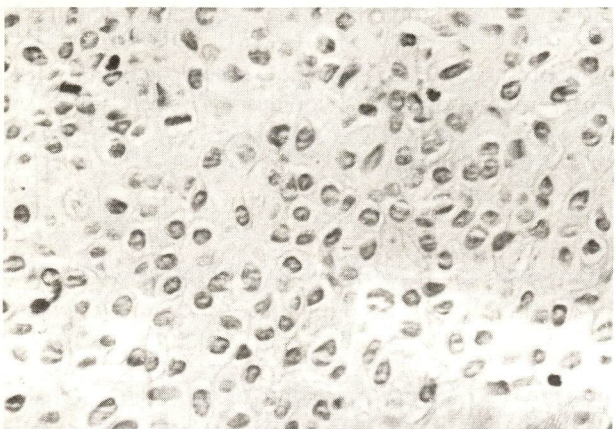


FIGURA 5 – Carcinoma de células transicionais Grau II. Negatividade para antígenos ABH. UEA-ABC x 625.

3) Controle negativo externo: consistiu no processamento de outra lâmina do mesmo bloco, omitindo-se a incubação com lectina do *Ulex europaeus*; 4) Controle negativo interno: consistiu no estudo dos tecidos muscular e conectivo da parede vesical não envolvida pela neoplasia, do espécimen em análise. A ausência de forte reatividade nos controles positivos, ou a ocorrência de qualquer reatividade nos controles negativos, indicavam processamento inadequado da lâmina e o procedimento era repetido em novo corte.

RESULTADOS

Dos 66 espécimens analisados, 27 (40,9%) apresentaram-se "negativos" e 39 (59,1%) positivos. Destes, 29 apresentaram positividade "intensa" e 10, "intermediária".

TABELA 2 – Correlação entre a Expressão dos Antígenos ABH e o Grau Histológico das Lesões Neoplásicas

Grau	Nº de Espécimens	Antígeno ABH	
		Positivo* Nº (%)	Negativo Nº (%)
I	13	11 (85%)	2 (15%)
II	29	24 (83%)	5 (17%)
III	24	4 (17%)	20 (83%)

* Abrange as lesões com reatividade forte e intermediária ao UEA-ABC.

A expressão dos antígenos de superfície ABH em cada grau está referida na tabela 2, observando-se presença destes antígenos em 11 dos 13 espécimens (85%) de grau I, em 24 dos 29 espécimens (83%) de grau II e em apenas 4 dos 24 espécimens (17%) de grau III.

TABELA 3 – Correlação entre Reatividade dos Espécimens Estudados Através do UEA-ABC e o Grau Histológico da Lesão Neoplásica

Grau	Nº de Espécimens	Reatividade ao UEA-ABC*		
		Forte	Intermediária	Ausente
I	13	9(69,2%)	2(15,4%)	2(15,4%)
II	29	17(58,6%)	7(24,1%)	5(17,3%)
III	24	3(12,5%)	1(4,2%)	20(83,3%)

* Teste de imunoperoxidase utilizando lectina do *Ulex europaeus* e o complexo avidina-biotina-peroxidase.

Como mostra a tabela 3, que correlaciona grau histológico com a reatividade ao UEA-ABC, as lesões de grau I e II evidenciam, com elevada frequência, forte reatividade, enquanto que as lesões de grau III demonstram, na maioria dos espécimens, reatividade ausente.

DISCUSSÃO

Um dos eventos que marcam o processo de transformação maligna das células normais é representado por alterações da estrutura da membrana celular, que sofre mudanças significativas do seu perfil glicoprotéico e glicolipídico^{19, 20}, dentre as quais destaca-se a expressão dos antígenos de superfície ABH. Em condições normais, a síntese dos antígenos ABH inicia-se a partir de um substrato protéico que, por interferência de uma glicosil transferase específica, incorpora uma molécula de α -L-fucose e se transforma no chamado antígeno H. Esta molécula, por sua vez, é precursora dos antígenos A e B, que resultam da adição de dois oligossacarídeos, respectivamente, a α -N-acetilgalactosamina e a α -D-galactose^{21, 22}. Nas células normais, estas reações são mediadas por glicosil-transferases específicas, e em células malignas surgem deficiências destas enzimas, o que explica a supressão ou a atenuação da expressão dos antígenos de superfície ABH em alguns destes casos¹⁹.

A compreensão destes fenômenos estimulou a realização de estudos sobre o comportamento dos antígenos ABH em diferentes neoplasias, inclusive vesicais, tendo ficado bem estabelecido o valor prognóstico deste parâmetro^{10, 23, 24}. Problemas metodológicos, contudo, têm interferido com a precisão da pesquisa dos antígenos de superfície ABH, razão pela qual diversas técnicas alternativas de avaliação dos mesmos têm sido testadas^{25, 26}.

O SRCA é um método de difícil padronização e reprodutibilidade, sua leitura é subjetiva e sujeita à influência de muitos artefatos técnicos e tem baixa sensibilidade para detectar os antígenos H^{12, 15}. As técnicas de imunofluorescência exigem material fresco e processamento especial; não permitem a observação concomitante de detalhes celulares; a leitura deve ser imediata, pois a fluorescência se esvaece com o tempo; e também não são eficientes para detectar os antígenos H²⁵. As técnicas de imunoperoxidase indireta e peroxidase-antiperoxidase contornaram alguns destes problemas, permitindo melhor reprodutibilidade e padronização da leitura, menor sujeição a artefatos técnicos, aplicação em blo-

cos parafinados, obtenção de coloração definitiva, que facilita reavaliações posteriores da mesma lâmina, e maior sensibilidade que os métodos anteriores na identificação dos antígenos de superfície ABH²⁴. Estudos comparativos entre o SRCA e as técnicas de imunofluorescência e de imunoperoxidase clássicas, em neoplasias vesicais, indicaram que SRCA e imunofluorescência equivalem-se em termos de eficiência e que as reações de imunoperoxidase são superiores a ambos^{25, 27}. Apesar da maior sensibilidade, as técnicas de imunoperoxidase clássicas também podem falhar na identificação dos antígenos H²⁷ em decorrência da menor antigenicidade do mesmo em relação aos antígenos A e B¹² e também em função de uma perda relativamente maior dos antígenos H durante os processos de fixação e desparafinação do espécimen a se ser estudado¹⁵.

O método ABC foi descrito por Hsu e col. em 1981⁸ e corresponde a uma reação imuno-histoquímica, cuja inovação é o acoplamento de anticorpos com a pequena molécula da vitamina biotina, de extraordinária afinidade pela avidina, uma glicoproteína extraída da clara do ovo. Este fato faz com que, quando se introduz o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC), as ligações covalentes avidina-biotina estabeleçam-se de forma virtualmente irreversível^{8, 28}. Além disso, a configuração estrutural deste complexo é tal que para cada determinante antigênico existente no tecido muitas moléculas de peroxidase sejam trazidas, implicando em sensibilidade muito elevada^{8, 28}. Este procedimento tem sido utilizado para a identificação de diferentes tipos de antígenos^{8, 28, 29}, mas só recentemente foi utilizado acoplado a reações bioquímicas envolvendo lectinas³⁰. A lectina purificada do *Ulex europaeus* liga-se firmemente aos resíduos terminais α -L-fucose dos antígenos H e de forma menos intensa aos resíduos terminais α -N-acetilgalactosamina e α -D-galactose, respectivamente, dos antígenos A e B^{31, 32}. Este fato não só aumenta a sensibilidade da técnica na identificação dos antígenos de superfície ABH, como também favorece a detecção dos antígenos H, reduzindo os elevados índices de resultados falso-negativos observados com os outros métodos. Ademais, torna desnecessário o conhecimento prévio do tipo sanguíneo do paciente, já que a lectina purificada do *Ulex* fixa-se em qualquer um dos 3 antígenos, diferente do que ocorre com as aglutininas anti-A e anti-B empregadas no SRCA³¹⁻³³.

O UEA-ABC tem todas as vantagens das técnicas clássicas de imunoperoxidase e as suplan-

ta em eficiência na identificação dos antígenos de superfície ABH²⁹, o que o torna atraente para ser empregado no estudo das neoplasias vesicais. Mesmo quando comparada com o emprego de anticorpos monoclonais anti-H, a reação da lectina do *Ulex europaeus* tem apresentado resultados favoráveis^{3,4}.

Alguns trabalhos têm apresentado a aplicação do UEA-ABC ao estudo de neoplasias^{3,3,4}, mas o único estudo comparativo empregando o UEA-ABC em epitélio de células de epitélio transicional foi realizado com espécimens normais de bexiga, pélvis renal e ureter³⁰. Neste trabalho, publicado em 1984 por McAlpine e col., foram correlacionados os índices de positividade do SRCA e do UEA-ABC em 43 espécimens não-neoplásicos e que deveriam, portanto, exprimir, sem exceção, reatividade positiva para os antígenos de superfície ABH. No material estudado pelo SRCA, os antígenos ABH foram identificados em 31 dos 43 espécimens (72%), e quando o mesmo material foi estudado pelo UEA-ABC, reação positiva foi observada em 42 dos 43 espécimens (98%). Esta diferença de comportamento deveu-se principalmente à maior precisão do UEA-ABC em detectar os antígenos H. Neste subgrupo, os índices de positividade das reações foram de, respectivamente, 46% e 94% no material avaliado pelo SRCA e pelo UEA-ABC. Este estudo, embora desenvolvido em tecido normal, demonstrou de maneira inquestionável a grande eficiência do UEA-ABC em detectar os antígenos de superfície ABH e sua superioridade sobre o SRCA.

Como bem resume Koss³⁵, a graduação de tumores malignos é uma tentativa de se expressar de modo semiquantitativo as diferenças histológicas e citológicas entre determinada neoplasia e o tecido normal correspondente. Com relação aos carcinomas de células transicionais da bexiga, há várias propostas de graduação histológica, sendo mais clássica a de Broders que subdivide as lesões de grau I até IV, com anaplasia crescente. Os graus I e II correspondem a lesões de prognóstico mais favorável enquanto os graus III e IV associam-se a comportamento biológico "desfavorável". Por motivos práticos, Koss³⁵ propõe que a divisão se faça em apenas 3 classes, com a fusão dos graus III e IV.

No presente estudo pudemos comprovar que este método pode ser executado em laboratório convencional de anatomia patológica, não requerendo equipamentos especiais para a feita das reações nem para a leitura dos resultados. Amostras fixadas rotineiramente em formol e incluída em parafina e seccionadas em micrótomo

comum mostraram-se perfeitamente adequadas para a análise. Efetuamos, retrospectivamente, uma comparação entre a reatividade dos espécimens ao UEA-ABC e o grau histológico segundo Koss.

Na tabela 2 fica evidente a tendência de redução da positividade à medida em que aumenta a anaplasia. Ainda que a diferença entre o grau I e II possa parecer pequena a esta análise, o estudo semiquantitativo apresentado na tabela 3 revela que a porcentagem de casos fortemente positivos atinge 69,2% no grau I, caindo para 58,6% no grau II, mostrando que a perda da ação enzimática se faz de modo gradativo, não sendo, na verdade, fenômeno do tipo "tudo-ou-nada". No outro extremo, os casos de grau III apresentaram apenas 17% de positividade.

Concluimos, a partir deste estudo, que o método UEA-ABC é de fácil execução e aplicação a amostras teciduais previamente fixadas em formol e incluídas em parafina e que sua utilização na análise de carcinomas de células transicionais da bexiga correlaciona-se muito bem com a graduação histológica. Devido a estas características, a técnica poderá ser introduzida na prática urológica, como mais um parâmetro de avaliação prognóstica. Restam, entretanto, questões acerca da correlação com a evolução dos pacientes. Passaremos, a seguir, a estudos clínicos de "follow-up" para avaliar a possibilidade de que, dentro de um grupo de pacientes com neoplasias de mesmo grau histológico, possam ser definidos subgrupos cuja diferente reatividade ao UEA-ABC possa corresponder a diversos comportamentos biológicos quanto à recidiva e/ou progressão da neoplasia.

SUMMARY:

Deletion of ABH surface antigens is associated with malignant cell transformation in a variety of human neoplasms, including bladder carcinomas.

Data from studies using the red cell adherence test (SRCA) suggested that loss of ABH antigens was associated with histologically high graded tumors, with a worse clinical outcome. However, the impact of these findings was attenuated due to the drawbacks of the technique.

*Based on the extraordinary accuracy of immunohistochemistry, the present study was performed using a *Ulex europaeus* lectin to detect ABH antigens, with amplification mediated by the avidin-biotin-peroxidase complex. The main goals were the evaluation of the applicability of this method and the correlation of the presence of antigens with histological grading.*

Thirty-nine (59,1%) out of 66 specimens evaluated were positive for ABH antigens. 85% of grade I tumors were positive, and "strong" staining was achieved in

69,2%. Grade II tumors showed 82,7% of positivity and this was "strong" only in 58,6%. On the other hand, only 17,0% high-graded lesions (grade III) were positive and, in this group "strong" staining was obtained only in 12,5%.

Our results showed that this new technique overcame the drawbacks of the red cell adherence test and its quite applicable to formalin-fixed paraffin embedded tissues. This technique, together with other prognostic parameters, can be very helpful in the elaboration of therapeutic strategy of patients with transitional cell carcinoma of the bladder.

UNITERMS: *Bladder carcinoma; imunohistochemistry; ABH surface antigens.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Srougi M, Góes GM. — Câncer urológico. II — Câncer de bexiga. *J Bras Urol* 1984; 10:110-116.
2. Brumini R, Torloni H, Henson DE, Gotlieb SLD, Souza JMP. Câncer no Brasil. Dados histopatológicos 1976-1980. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 1982; 231.
3. Silverberg E. — Cancer statistics, 1985. *Ca-A Cancer J* 1985; 35:19-35.
4. Hastings RJ, Franks LM. — Celular heterogeneity in a tissue culture cell line derived from a human bladder carcinoma. *BR J Cancer*, 1983; 47:233-244.
5. Slack NH, Prout GR, JR. — The heterogeneity of invasive bladder carcinoma and different responses to treatment. *J Urol* 1980; 123:644-652.
6. Coombs RRA, Belford D, Rouillard LM. — A and B blood-group antigens on human epidermal cells, demonstrated by mixed agglutination. *Lancet*, 1956; 1:461-463.
7. Glynn LE, Holborow EJ. — Distribution of blood-group substances in human tissues. *Br. Med Bull*, 1959; 15:150-153.
8. Szulman AE. — The histological distribution of blood group substances A and B in man. *J Exp Med* 1960; 11:785-799.
9. Kay HEM. — A and B antigens of normal and malignant cells. *Br J Cancer*, 1957; 11:409-414.
10. Davidsohn I, Stejskal R, Lill P. — The loss of isoantigens A, B, and H in carcinoma of urinary bladder. *Lab Invest*, 1973; 28:382.
11. Kovarik S, Davidsohn I, Stejskal R. — ABO antigens in cancer. Detection with the mixed cell agglutination reaction. *Arch Pathol*, 1968; 86:12-21.
12. Bishop MC. — Blood group antigens and bladder cancer. *Br Med J*, 1982; 284:1426-1427.
13. Gunter PA, Abela-Borg J, Pugh R.B.C. — Urothelium and specific red cell adherence test. *Br J Urol*, 1983; 55:10-16.
14. Lange PH, Limas C. — Tissue blood group antigen testing in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 1980; 124:304.
15. Limas C, Lange P. — Altered reactivity for A, B, H antigens in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. A study of the mechanisms involved. *Cancer*, 1980; 46:1366-1373.
16. Alves VAF, Moraes CF, Santos RTM, Takeda AK, Gayotto, L. C. C. Utilização da técnica de anticorpos não marcados (PAP) na detecção do antígeno de superfície da hepatite B em tecido hepático. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 1980; 40 (2): 101-6.
17. Alves VAF, Boise W, Abbo AH, Mendonça BB, Bisi H. — Identificação da origem de metástases de carcinoma da tireóide através do método da imunoperoxidase. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 1984; 28 (1):17-19.
18. 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.
19. Kim YS, Isaacs R, Perdomo JM. — Alterations of membrane glycopeptides in human colonic adenocarcinoma (lectins/glycosyltransferases/glycosidases). *Proc nat Acad Sci USA*, 1974; 71:4869-4873.
20. Steele JG, Rowlatt C, Sandall JK, Franks LM. — Identification of exposed surface glycoproteins of human bladder carcinoma cell lines. *Biochim Biophys Acta*, 1983; 732:219-228.
21. Bali JP, Magous R, Lecou C, Mousseron-Canet M. — Presence of blood group H on a carcinoembryonic antigen, and its enzymatic modification into blood group A and B specificities. *Cancer Res*, 1976; 36:2124-2129.
22. Hakomori SI — Blood group ABH and Ii antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their developmental change. *Semin Hematol* 1981; 18:39-62, 1981.
23. Bergman S, Javadpour N. — The cell surface antigen A, B or O (H) as an indicator of malignant potential in stage A bladder carcinoma: preliminary report. *J Urol*, 1978; 119: 49-51.
24. Finan PJ, Anderson JR, Doyle PT, Lennox ES., Bleeheh, NM. — the prediction of invasive potential in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol*, 1982; 54:720-725.
25. Cooper HS, D'Elia FL. — Comparison between the methods of indirect immunofluorescence and specific red cell adherence test in detecting ABH isoantigens in bladder carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 1982; 77:548-554.
26. Das G, Buxton NJC, Glashan RW. — Invasive potential of superficial bladder cancer. A study of the relative merits of predictive parameters *Br J Urol*, 1985; 57:32-36.
27. King CT, Clark TD, Lovett J, Cash JB, Primus FJ, McRoberts J, et al — A comparison of clinical course with blood group antigen testing by specific red cell adherence and immunoperoxidase in uretral and renal pelvic tumors. *J Urol*, 1983; 130:871-873.
28. Usu, SM, Raine L. — Versatility of biotin-labeled-lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 1982; 30: 157-161.
29. Hsu, SM, Raine L, Fanger H. — Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem*, 1981; 29:577-580.
30. Mac Alpine RG, Javadpour N, Vafier JA, Worsham GF, O'Connel KJ. Immunoperoxidase versus specific red cell adherence in detection of ABO (H) antigens on normal urothelium. *Urology* 1984; 153-156.
31. Alroy J, Szoka FC, Heaney JA, Ucc, AA. — Lectins as a probe for carbohydrate residues in non-neoplastic urothelium of human urinary bladder. *J Urol* 1982; 128:189-193.
32. Fenton JW, II, Duggleby CR, Otten C, Stone WH. — Isolation and fluorescent labeling of Ulex europaeus anti-H lectin. *Vox Sang*, 1965; 10:208-211.
33. Lee AK, Rosen PP., DeLellis RA, Saigo PE, Groshen S, Bagin R., et al — Immunohistochemical tumor marker profile and survival in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1985; 84:687-696.
34. Lee AK, De Lellis RA, Wolfe HJ. — Intramammary lymphatic invasion in breast carcinomas — Evaluation using ABH isoantigens as endothelial markers. *Am J Clin Pathol* in press.
35. Koss LG. — Tumors of urinary bladder. In *Atlas of tumor Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC*, 1975; 11:9-46.