

PROPUESTA DE UN NUEVO METODO DE PUNTAJE PARA LA PREDICION DE LA EVOLUCION DEL CARCINOMA DE VEJIGA: UTILIDAD DE LA DEMOSTRACION DEL ANTIGENO ABO (H) CON ANTISUEROS MONOCLONALES

Dra. Sáenz de Chirife, Ana María* - Dra. Giménez, Liliana** - Dr. Scorticati, Carlos H.***

Introducción

Los tumores de vejiga, por sus características biológicas y evolutivas, presentan un comportamiento propio que se caracteriza por su alta incidencia de recidiva y progresión.⁽¹⁻³⁾

El pronóstico de los pacientes portadores de esta enfermedad depende del tipo histológico, grado de diferenciación y estadio evolutivo, siendo imprescindible un diagnóstico correcto para poder determinar la terapéutica adecuada.⁽⁴⁾

Desde el año 1978, en el Servicio de Urología del Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" de la Universidad de Buenos Aires, se trata de estadificar a los pacientes portadores de cáncer vesical teniendo en cuenta los siguientes factores⁽⁵⁾:

1. Valoración de los antecedentes personales, como el hábito de fumar, contacto con toxinas, contaminación ambiental, etc., y antecedentes de la enfermedad actual.
2. Estadio evolutivo clínico, reconocido por la palpación bimanual abdominorrectal, previa e inmediatamente posterior a la resección endoscópica.
3. Resección endoscópica (biopsica o terapéutica), en varias localizaciones, con el fin de determinar si la lesión es única o multicéntrica y evaluar las alteraciones uroteliales vecinas.
4. Estadio evolutivo anatomopatológico, por medio del estudio del material de biopsia, para la determinación del tipo histológico, grado de diferenciación y nivel de infiltración de la pared vesical.

Es indudable que el comportamiento de los tumores de vejiga presenta considerable variación, y que su curso clínico, en un porcentaje apreciable, no se puede predecir con la metodología actual.^(6, 7)

Es por eso que en los últimos años la investigación clínica y experimental se concentró en la búsqueda de elementos que puedan predecir con mayor exactitud la evolución de estos tumores.^(8, 9)

Ejemplos de estos esfuerzos son la investigación de cariotipo, por medio de la ploidía cromosomal; la actividad proliferativa del urotelio, por medio del índice mitótico con timidina marcada y la medición del DNA por medio de la inmunoflujocitometría.

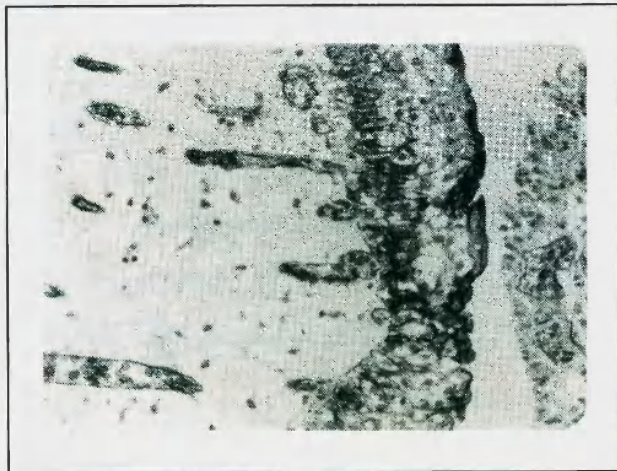
Los antígenos sanguíneos

Los antígenos sanguíneos ABO (H) son antígenos superficiales de la membrana celular, y están presentes en los glóbulos rojos, células endoteliales, células epiteliales de la vejiga, piel, cuello uterino y tracto gastrointestinal⁽¹⁰⁾ (fig. 1).

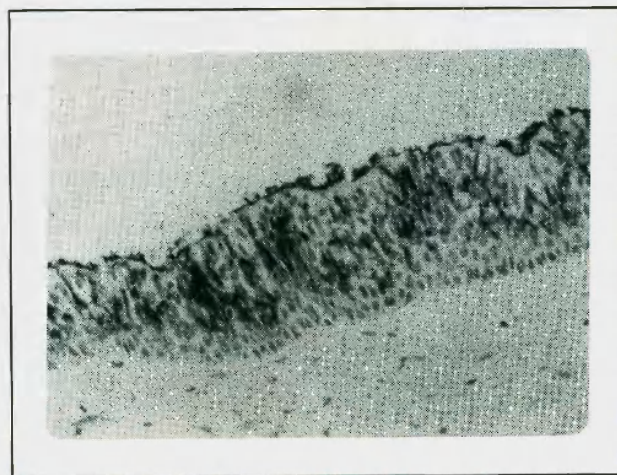
La sustancia H es una glicoproteína de poder antigénico débil, precursora de los antígenos A y B (altamente antigénicos).

La transformación de la sustancia H en antígenos A y/o B se realiza por medio de la acción de una enzima, la glicosiltransferasa. La sustancia H se halla en la membrana celular en las personas del grupo sanguíneo O (quienes no tienen antígenos A o B), pero su débil antigenicidad los hace de difícil determinación.⁽¹¹⁾

Se ha establecido, desde hace ya unos años, que ocurren cambios en la superficie celular de las neoplasias, y algunos de ellos pueden ser importantes para evaluar el comportamiento evolutivo de los tumores.⁽¹²⁾



A



B

Figura 1. A: Demostración del antígeno ABO (H) en el endotelio de los vasos sanguíneos y los glóbulos rojos, que se visualiza de color marrón. B: Demostración del antígeno ABO (H) en la superficie de la membrana celular del epitelio urotelial (color marrón).

La expresión antigénica anormal de los determinantes antígenicos normales ha sido descrita en una gran variedad de tumores.⁽¹³⁻¹⁵⁾

Varios trabajos han determinado que la pérdida de la antigenicidad ABO (H) de los carcinomas de vejiga es un indicador de pronóstico desfavorable.⁽¹⁶⁻²¹⁾

* Jefa de la Sección de Inmunopatología.

** Médica Concurrente, Sección de Inmunopatología.

*** Jefe del Departamento de Urología.

Instituto de Oncología "Angel H. Roffo", U.B.A.

Objetivos de este estudio

El propósito de este trabajo es corroborar el valor pronóstico de la determinación de los antígenos ABO (H) en las células tumorales de los carcinomas de vejiga y proponer un sistema de puntaje con los datos obtenidos de la biopsia inicial.

Este sistema de puntaje permitiría una mejor valoración pronóstica, particularmente en los casos de lesiones iniciales superficiales, de bajo grado de malignidad, o cuando haya discrepancias entre los métodos histológicos y antigénicos.

Material y métodos

Las biopsias de 35 pacientes, provenientes de una resección transuretral o cistectomía, fueron estudiadas histológicamente para su clasificación, efectuándose simultáneamente la determinación de los antígenos ABO (H) en la superficie celular.

En cada muestra se valoró el grado de anaplasia (de I a IV), según la clasificación de Ash⁽²²⁾ y el grado de infiltración de la pared vesical, según normas de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC).⁽²³⁾ Según esta última clasificación se considera:

- P_{1.S.} (PO): Tumor limitado a la mucosa (in situ).
- P₁: Tumor localizado en la mucosa y lámina propia.
- P₂: Tumor papilar con invasión muscular superficial.
- P₃: Tumor con invasión a la capa muscular profunda y/o tejidos perivesicales.
- P₄: Tumor que invade la capa muscular en su totalidad, tejidos perivesicales, linfáticos y/o metástasis ganglionares.

La determinación de los antígenos sanguíneos fue realizada usando una modificación de la técnica peroxidasa-antiperoxidasa descrita originalmente por Sternberger.⁽²⁴⁾

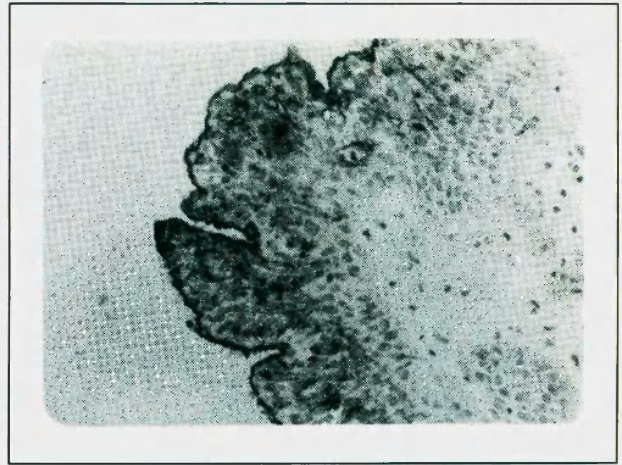
Las secciones desparafinadas fueron incubadas con el primer antisuero monoclonal de ratón, antigupo sanguíneo A, B o H, siendo la dilución óptima entre 1:50 y 1:250.

La segunda incubación se realizó con antisuero conjugado con peroxidasa de conejo antiinmunoglobulinas de ratón a una dilución de 1:10. A continuación se efectuó el lavado con tris buffer y el revelado con diamino-bencidina y agua oxigenada.

El tiempo de revelado en cada caso se estableció con los controles positivos conocidos, mucosa normal, endotelio vascular y glóbulos rojos. Al mismo tiempo se usó un control negativo correspondiente a una muestra de otro grupo sanguíneo.

En los casos en que el grupo sanguíneo del paciente se desconocía, éste se determinó usando los tres antisueros.

Los preparados a estudiar fueron considerados válidos cuando el endotelio y los glóbulos rojos demostraron el antígeno correspondiente. En las lesiones positivas, es decir aquellas en las que existe el antígeno ABO (H) celular, la intensidad de la tinción se estimó en una escala de 1+ a 4+, y el porcentaje de células tumorales positivas se estimó en relación al área total de tumor de la muestra en estudio (fig. 2).



B

Figura 2. A: Demostración del antígeno sanguíneo ABO (H) (positivo) en el 100 % del área examinada total. B: Una zona de la misma sección a mayor aumento que muestra presencia antigénica en todas las células epiteliales.

Los casos se clasificaron como positivos cuando más de 30 % de la superficie de tumor de la muestra poseía el antígeno sanguíneo y como negativos cuando dicho porcentaje era menor de 30%.⁽²⁵⁾

Sistema de puntaje

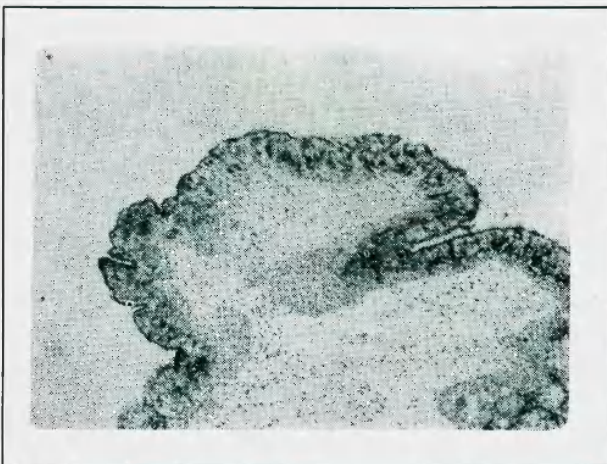
Como cada una de las determinaciones que se efectuaron en la biopsia inicial [grado histológico, penetración y antígeno ABO (H)] tienen un valor predictivo distinto (ver tabla I), no se puede asignar igual peso a cada una de estas variables en la obtención de un puntaje total. Por lo tanto, la suma de las variables debe hacerse asignando a cada una de ellas un "peso relativo" proporcional a su valor predictivo. Es decir que aquellas variables que están débilmente asociadas con lo que se quiere predecir tendrán un peso menor que aquellas que están fuertemente asociadas.^(26, 27)

Con el propósito de simplificar la valoración del puntaje, la clasificación de grado de anaplasia se reagrupó en 2 categorías (I-II y III-IV), lo mismo que la clasificación de infiltración (P₀-P₁ y P₂-P₄). La clasificación antigénica (+ y -) no se modificó. Para determinar el valor predictivo de cada una de estas categorías se consideraron todos aquellos pacientes que habían tenido recidivas con progresiones profundas (P₂-P₄) (n=9) y aquellos que no habían tenido recidivas demostrables (n=9). La suma de la sensibilidad (predicciones correctas de recidivas) y la especificidad (predicciones correctas de no-recidivas) da el valor predictivo de cada una de las categorías arriba mencionadas (tabla I).

TABLA I
Resultados de la biopsia inicial

	I-II	III-IV	P ₀ -P ₁	P ₂ -P ₄	ABO+	ABO-
a) Progresiones profundas n=9	4	5	5	4	3	6
b) No recidivas n=9	7	2	8	1	5	4
c) Valores predictivos	-11	+7	-13	+5	-8	+10

Sistema de puntaje y valor predictivo: la hilera a) corresponde a los resultados de la biopsia inicial en los pacientes con recidivas con progresiones profundas. La hilera b), a los pacientes que no tuvieron recidivas. La suma de cada una de las columnas determina los valores predictivos para cada uno de los métodos empleados en la biopsia inicial (hilera c). El puntaje en cada paciente se obtiene sumando los valores predictivos correspondientes a cada una de las tres determinaciones (clasificación de Ash, UICC y antigénica).



A

A fin de poder separar aún más los grupos de pacientes se asignó un signo positivo al valor predictivo si éste era de mayor magnitud para predecir una recidiva que una no-recidiva, y un signo negativo para lo opuesto. El puntaje final se obtiene sumando algebraicamente los tres valores predictivos así obtenidos. Dicho puntaje por lo tanto puede ser de signo negativo si la probabilidad de recidiva es remota o positivo si la probabilidad de recidiva es con progresión profunda.

Resultados

La tabla II muestra los resultados de las biopsias iniciales agrupadas según el grado de malignidad (clasificación de Ash), según la profundidad de la lesión en la pared vesical y la presencia o ausencia del antígeno ABO (H) en las células tumorales, en relación con el porcentaje de no-recidivas y recidivas con distinto grado de profundidad.

TABLA II

Biopsia	No rec.	Recidivas		P ₀ -P ₄
		P ₀ -P ₁	P ₂ -P ₄	
I-II	33 %	48 %	19 %	67 %
I-II ABO +	50 %	25 %	25 %	50 %
I-II ABO -	15 %	54 %	31 %	85 %
III-IV	22 %	22 %	56 %	78 %
P ₀ -P ₁	35 %	43 %	22 %	65 %
P ₀ -P ₁ ABO +	56 %	22 %	22 %	44 %
P ₀ -P ₁ ABO -	21 %	57 %	21 %	78 %
P ₂ -P ₄	14 %	29 %	57 %	86 %
ABO +	50 %	20 %	30 %	50 %
ABO -	20 %	50 %	30 %	80 %

Resultados: hallazgos de la biopsia inicial y su relación con los porcentajes de no-recidivas y recidivas, estas últimas clasificadas según la profundidad de penetración en la pared vesical (clasificación UICC).

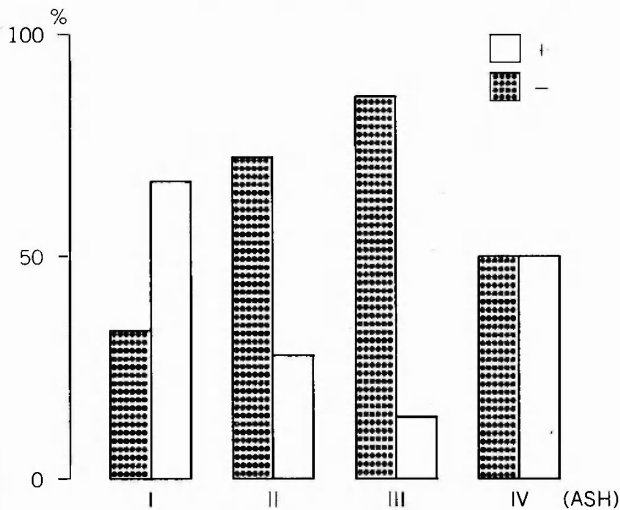
En los casos cuya biopsia inicial era de grado I o II de malignidad histológica hubo un total de 33 % de no-recidivas y de 67 % de recidivas con lesiones superficiales o profundas, estas últimas constituyendo 19 %. Cuando a la clasificación de Ash se le agrega la clasificación antigénica, se observa que en los pacientes con grado histológico bajo (I o II) aumenta el porcentaje de no-recidivas en aquellos que tienen antígenos sanguíneos presentes.

Cuando dado el mismo grado de malignidad de la lesión inicial, no se observa el antígeno ABO (H) en las células tumorales, el porcentaje de recidivas superficiales y profundas aumenta a 85 %, con una reducción del porcentaje de no-recidivas. En estos casos se nota también un aumento de la proporción de progresiones profundas de 19 a 31 %.

Resultados similares se encontraron al estudiarse las lesiones iniciales de acuerdo con la clasificación de grado de penetración con la presencia del antígeno ABO (H) o sin ella.

El grado histológico de malignidad de la biopsia inicial en relación con el porcentaje de pérdida del antígeno ABO (H) (antígeno-negativos) se observa en el gráfico I. Este demuestra que lesiones con alto grado de malignidad histológica presentan un alto porcentaje de pérdida del antígeno.

GRAFICO I

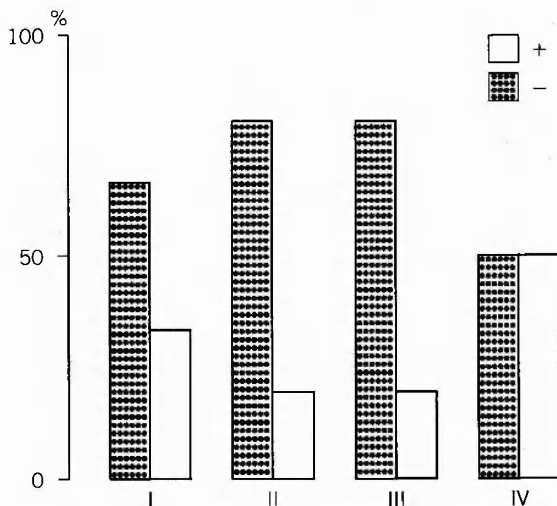


Proporción de pacientes con pérdida del antígeno ABO (H) celular en los diversos grados de la clasificación histológica de Ash. Las barras con puntos corresponden a los casos con pérdida del antígeno. Se nota una tendencia a aumentar el porcentaje con pérdida antigénica al aumentar el grado de malignidad histológica.

El gráfico II, por otra parte, muestra la misma relación, pero en la biopsia de la recidiva. Aquí también hay una tendencia a aumentar el grado de pérdida del antígeno en las lesiones más profundas.

Dado el escaso número de pacientes estas tendencias no alcanzan significatividad estadística.

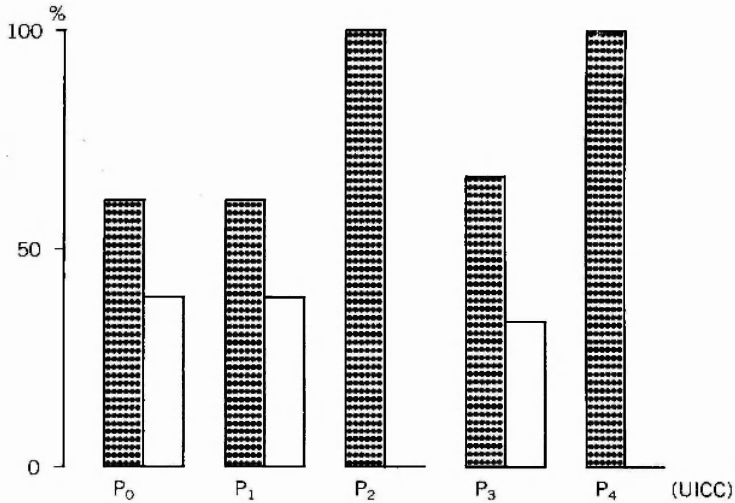
GRAFICO II



Proporción de pacientes con pérdida del antígeno ABO (H) celular en las biopsias de las recidivas. Se nota una mayor proporción de células antígeno-negativas (barras con puntos).

La progresión en profundidad de la lesión inicial también está relacionada con una mayor pérdida del antígeno en las células tumorales, como se observa en el gráfico III.

GRAFICO III



Proporción de pacientes con biopsias antígeno-negativas según el grado de infiltración (clasificación UICC). La gran mayoría de los pacientes con grados infiltrativos avanzados (P₂, P₃ y P₄) presentan pérdida del antígeno ABO (H) celular. (Las barras con puntos corresponden a las proporciones de pacientes antígeno-negativos.)

La posibilidad de poder predecir la evolución y el comportamiento del tumor en base a los datos de la biopsia inicial es de suma importancia, pero como se desprende de los resultados en la tabla II, esto es muy difícil, dado que hay pacientes con bajo grado de malignidad en la biopsia inicial que tienen una evolución desfavorable con progresiones profundas. La utilización del sistema de puntaje descrito en "métodos" permite una mejor separación de los pacientes, según su probabilidad de recidiva o progresión.

La tabla III muestra los valores medios de los puntajes obtenidos en cada uno de los grupos, con sus correspondientes desvíos estándar.

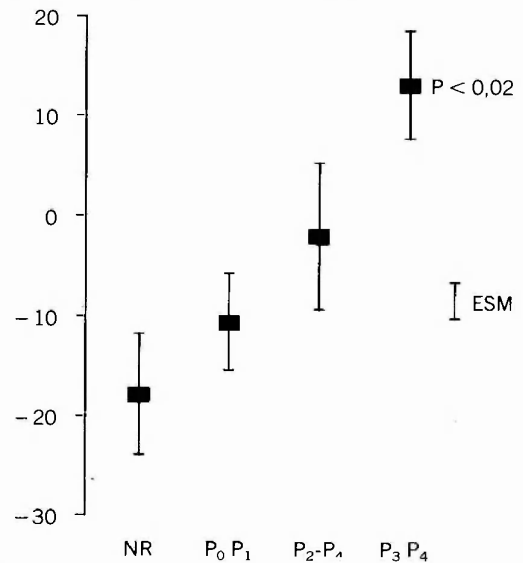
TABLA III

Sistema de puntaje. Puntaje medio con los desvíos estándar (D. E.) en los pacientes con recidivas de diverso grado y sin recidivas

	n	Puntaje medio	D. E.
NO-RECIDIVA	9	-18	±17,5
RECIDIVAS:			
Infiltración superficial	12	-11	±15,0
Infiltración profunda	9	-2	±22,0
Infiltración muy profunda o metástasis	4	+13	±10,4

El gráfico IV muestra los mismos hallazgos, pero en forma gráfica, con los errores estándar de la media, lo que permite ver que los puntajes son más altos (valores con signos positivos) cuanto más severa es la evolución del tumor inicial. Aquellos pacientes con progresión profunda y metástasis tuvieron un puntaje inicial significativamente mayor ($P < 0,02$) comparados con aquellos pacientes sin recidivas.

GRAFICO IV



Resultados del sistema de puntaje. El puntaje medio (rectángulos negros) con los errores estándar de la media, aumenta cuanto más severa es la evolución del tumor inicial. En otras palabras, cuanto más alto el puntaje obtenido en la biopsia inicial, más probable es una recidiva con infiltración profunda y/o metástasis (grados P₃ y P₄).

Como se dijo previamente, el puntaje obtenido en cada paciente corresponde a la suma de los valores predictivos de cada categoría diagnóstica de la biopsia inicial. Dos ejemplos típicos se presentan a continuación (los valores predictivos se obtuvieron de tabla I):

1. Paciente nº 15

<i>Biopsia inicial</i>		<i>Valor predictivo</i>
Grado de malignidad histológica	III	+ 7
Grado de infiltración	P ₂	+ 5
Antígeno ABO (H)	Neg.	+ 10
PUNTAJE TOTAL		+ 22

2. Paciente nº 6

<i>Biopsia inicial</i>		<i>Valor predictivo</i>
Grado de malignidad histológica	II	- 11
Grado de infiltración	P ₁	- 13
Antígeno ABO (H)	Pos.	- 8
PUNTAJE TOTAL		- 32

El paciente nº 15 tiene un puntaje positivo (+ 22) y presentó una recidiva infiltrativa profunda, mientras que el paciente nº 6 no tuvo recidiva con un tiempo de seguimiento de 6 años.

Discusión

La ausencia del antígeno ABO (H) de la superficie celular de los tumores de vejiga en las biopsias iniciales está generalmente relacionada con un pronóstico desfavorable.⁽¹⁶⁻²¹⁾

Estos tumores son los que generalmente presentan un alto grado de anaplasia y un comportamiento agresivo, manifestado por recidivas con invasión profunda en la capa muscular de la vejiga y en los tejidos perivesicales y linfáticos.

La evaluación de la profundidad de la invasión tumoral (UICC) es más difícil en las biopsias que en la pieza anatómica, ya que las primeras (biopsias) consisten a veces en fragmentos superficiales que no incluyen el espesor necesario para un diagnóstico de certeza.

Sin embargo, la proporción de pacientes con desaparición del antígeno ABO (H) celular tiende a ser mayor cuanto más profunda es la invasión tumoral, según se observa en el gráfico III, a pesar de lo mencionado arriba.

La posibilidad de poder predecir la recidiva con ulterior infiltración y/o metástasis del tumor es de suma importancia, ya que ello facilitaría las decisiones terapéuticas.

Como se desprende de los resultados de la tabla II, ninguno de los métodos de clasificación en forma aislada, aplicados a la biopsia inicial, puede predecir con certeza todas las recurrencias con infiltración profunda o una no-recurrencia. Esto se debe a que la malignidad del tumor inicial puede cambiar (espontáneamente o por el tratamiento) y a que existen deficiencias propias de los métodos diagnósticos.

Debe tenerse en cuenta que no fue posible, por cuestiones éticas, privar de tratamiento al grupo de pacientes estudiados, lo que naturalmente modificaría algo los resultados.

Bibliografía

- Royce, R. K., y Ackerman, L.: "Carcinoma of the bladder: clinical, therapeutic and pathologic aspects of 135 cases". *J. Urol.*, 65:66-86, 1951.
- Jewett, H. J., y Eversole, S. L. Jr.: "Carcinoma of the bladder: characteristics modes of local invasion". *J. Urol.*, 83:383-389, 1960.
- Jewett, H. J.; King, L. D., y Shelley, W. H.: "Study 365 cases of infiltrating bladder cancer; relation of certain pathological characteristics to prognosis after extirpation". *J. Urol.*, 92:668-678, 1964.
- Baker, R.: "Pitfalls of clinical vs. microscopic staging of cancer of the bladder and relationship to potential curability". *Ann. Surg.*, 36:269-275, 1970.
- Scorticati, C. H., y col.: "Tumores urogenitales: pautas de diagnóstico, tratamiento y seguimiento propiciadas por la Sociedad Argentina de Urología", 1980.
- Friedel, G. H., y col.: "Histopathology and classification of urinary bladder carcinoma". *Urol. Clin. N. Amer.*, 3:53-70, 1976.

La utilización de un sistema de puntaje permitiría una mejor predictibilidad de la evolución de la lesión, particularmente cuando los tres métodos de clasificación (Ash, UICC y antigénico) discrepan entre sí. Por ejemplo, hay pacientes que en la biopsia inicial tienen lesiones de bajo grado de malignidad, localizadas superficialmente, y sin embargo tienen ausencia antigénica total.

Para la realización del sistema de puntos se tuvo en cuenta el valor predictivo de cada prueba (es decir, la suma de la especificidad y de la sensibilidad).⁽²⁶⁾ Dado el escaso número de pacientes en relación con el número de determinaciones efectuadas, hubo que agrupar los estadios de clasificación en subgrupos (I-II, III-IV, P₀-P₁ y P₂-P₄), lo que probablemente pueda evitarse al aumentar la casuística.

La tabla III muestra los resultados para los diversos tipos de evolución. Se destaca que la gran mayoría de las no-recidivas tuvieron un puntaje de la biopsia inicial negativo, mientras que la totalidad de las recurrencias con infiltración profunda y/o metástasis tuvieron puntajes por encima del cero (positivo).

La pregunta que surge es por dónde trazar la línea divisoria en el puntaje para separar los grupos que se beneficiarían con distintas modalidades terapéuticas. La respuesta probablemente surja de estudios prospectivos controlados, donde la utilización de un sistema de puntaje como el propuesto permita asignar a los pacientes uno u otro modo terapéutico.

Conclusiones

- La pérdida de los antígenos sanguíneos ABO (H) de la superficie de las células tumorales está asociada con un peor pronóstico evolutivo.
- Dicho pronóstico es de muy difícil valoración, considerando las clasificaciones convencionales de malignidad de la biopsia inicial en forma aislada.
- Se propone un método de puntaje que tiene en cuenta las tres clasificaciones consideradas, para una valoración más precisa del pronóstico, en forma cuantitativa.
- Se sugiere la utilización de dicho sistema de puntaje en la realización de estudios prospectivos controlados de valoración terapéutica.

Para la confección del puntaje se suman los valores predictivos correspondientes a los resultados de las tres clasificaciones obtenidas en la biopsia inicial, según se detalla a continuación:

<i>Clasificación inicial</i>	<i>Valor predictivo</i>
I-II	- 11
III-IV	+ 7
P ₀ -P ₁	- 13
P ₂ -P ₄	+ 5
ABO (H) +	- 8
ABO (H) -	+ 10

- Si el puntaje obtenido en un paciente es de signo positivo, la probabilidad de una recidiva con invasión profunda y/o metástasis es alta, mientras que si el signo del puntaje es negativo, la probabilidad de una recidiva es muy baja.

12. Hall, L., y col.: "The use of the red cell surface antigen to predict the malignant potential of transitional cell carcinoma of the ureter and renal pelvis". *J. Urol.*, 127:23-25, 1982.
13. D'Elia, F.; Cooper, H. S., y Mulholland, S. G.: "ABH isoantigens in stage 0 papillary transitional cell carcinoma of the bladder: Correlation with biological behavior". *J. Urol.*, 127:665-667, 1982.
14. Gupta, R. K., y Schuster, R.: "Isoantigens A, B and H in benign and malignant lesions of breast". *Am. J. Pathol.*, 72:253-257, 1973.
15. Liu, P. I., y col.: "Carcinoma of the oral cavity evaluated by specific red cell adherence test". *Oral. Surg.*, 38:56-64, 1974.
16. Lange, P. H.; Limas, C., y Fraley, E. E.: "Tissue blood group antigens and prognosis in low stage transitional cell carcinoma of the bladder". *J. Urol.*, 52-55, 1978.
17. Limas, C., y col.: "A, B, H antigens in transitional cell tumors of the urinary bladder". *Cancer*, 44:2099-2107, 1979.
18. Emmott, R. C., y col.: "Correlation of the cell surface antigens with stage and grade in cancer of the bladder". *J. Urol.*, 121:37-39, 1979.
19. Richie, J. P.; Blute, R. D., y Waisman, J.: "Immunologic indicators of prognosis in bladder cancer: the importance of cell surface antigens". *J. Urol.*, 123:22-24, 1980.
20. Sadoughi, N., y col.: "Prognostic value of cell surface antigens using immunoperoxidase methods in bladder carcinoma". *Urol.*, 20:143-146, 1982.
21. Selli, C., y col.: "A, B, O (H) antigenic determinants in superficial transitional cell tumors of bladder". *Urol.*, 21:132-134, 1983.
22. Ash, J. E.: "Epithelial tumors of the bladder". *J. Urol.*, 44:135-145, 1940.
23. UICC, International Union against Cancer: "TNM Klassifikation der malignen Tumoren". Ed. Berlin-Heidelberg-Nueva York: Springer-Verlag, 1979.
24. Sternberger, I. A., y col.: "The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes". *J. Histochem. Cytochem.*, 18:315-333, 1970.
25. Flanigan, R. C., y col.: "Immunohistochemical demonstration of blood group antigens in neoplastic and normal human urothelium: a comparison with standard red cell adherence". *J. Urol.*, 130:499-503, 1983.
26. Afifi, A. A., y Asen, S. P.: "Statistical analysis: a computer-oriented approach". New York Academic Press, 1972.
27. Chirife, R.; Healy, R. W.; Leland O. S., y Neff, R. K.: "Computer analysis of left ventricular function in patients with ischemic heart disease". *Proceed. 4th New England Bioengineering Conference, Yale University, New Haven CT, 1976.*