

# Estudio inmunohistoquímico de la expresividad del antígeno T de Thomsen-Friedenreich en patología mamaria

F.J. Vera Sempere,  
M. Pérez Bacete,  
A. Llombart Bosch

## SUMMARY

*We present an immunomorphological study on 28 cases of diverse mammary pathology (dysplastic, benign and malignant tumors) by means of an immunoenzymatic technique, using conjugated antibodies with peroxidase against Peanut Lectin Agglutinin (PNA), which reveals the T antigen of Thomsen-Friedenreich. A distinct immunomorphological expression of T antigen in benign (membranous staining pattern) and malignant mammary pathology (cytoplasmic staining pattern) is found. Likewise, differences in immunostaining pattern is also found in relation to tumoral differentiation grade. We stress the utility of T antigen in the characterization of intracytoplasmic lumina of lobular carcinoma of the breast.*

## Palabras Clave

*Inmunohistoquimia, Patología mamaria, Lectina Peanut, Diferenciación*

El antígeno T (antígeno de Thomsen-Friedenreich) fue originalmente identificado por Friedenreich en 1930<sup>1</sup> como el antígeno responsable del fenómeno de hemoaglutinación sanguínea de Thomsen. Este antígeno es un precursor del segundo sistema de grupo sanguíneo MN<sup>2</sup> y presenta un determinante antigénico terminal de naturaleza disacárida.<sup>3</sup>

La presencia del antígeno T se establece no sólo a nivel de los hematíes, sino también a nivel de otras estructuras celulares,<sup>4</sup> si bien habitualmente se encuentra en forma críptica, cubierta por ácido neuramínico,<sup>5</sup> precisando del tratamiento con neuraminidasa para demostrarse su presencia.<sup>6</sup>

A nivel morfológico el antígeno T puede evidenciarse gracias a su alta afinidad por la lectina Peanut Aglutinina (PNA), derivado vegetal del cacahuete (*Arachis hypogaea*),<sup>3,7,8</sup> habiéndose utilizado el estudio morfológico de la PNA mediante técnicas de inmunofluorescencia,<sup>9-11</sup> autorradiografía<sup>9</sup> e inmunoperoxidasas<sup>12</sup> para detectar la presencia del antígeno T. El análisis morfológico del antígeno T, a nivel del tejido mamario, mediante la PNA, adquiere un especial interés, dado que se ha señalado que este antígeno es un marcador de diferenciación del tejido epitelial mamario.<sup>10</sup> Del mismo modo, se ha comprobado que este antígeno, inyectado en pacientes con cáncer de mama, provoca una reacción de hipersensibilidad tardía<sup>13</sup> que no tiene lugar al inyectarlo en población sana o en pacientes con patología mamaria benigna. Estos datos han hecho que algunos autores sugieran que el antígeno T es un antígeno asociado tumoral (AAT) al cáncer de mama.<sup>12</sup>

Departamento de Patología. Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

En el presente trabajo analizamos la expresividad morfológica del antígeno T libre en diferentes situaciones patológicas del tejido glandular mamario, empleando una técnica inmunohistoquímica que utiliza anticuerpos conjugados frente a la PNA.

## MATERIAL Y METODOS

Se han estudiado a nivel inmunohistoquímico, mediante una técnica de inmunotinción con anticuerpos conjugados con peroxidasa,<sup>14</sup> 28 casos biópsicos de patología mamaria, que comprenden 5 casos de displasias, 3 tumores benignos (fibroadenomas, papiloma intracanalicular) y 9 carcinomas (2 de origen lobulillar y 7 ductal). El estudio inmunohistoquímico en todos estos casos se ha efectuado sobre material tisular fijado en formaldehído con posterior procesado histológico e inclusión en parafina sintética.

Se incubaron secciones histológicas desparafinadas durante 20-30 min en una solución de metanol-agua oxigenada al 2 %. Tras posterior lavado en tampón tris-salino 0,05M, pH 7,6, se incubaron durante 20 min en suero de caballo no inmune al 20 %. Las secciones fueron luego incubadas en Lectina Peanut (Sigma Chemical Co.) (concentración 5 mcg/ml) durante 30-45 min. Tras realizar un lavado en tampón tris-salino, se incubó en un antisuero de conejo contra Lectina Peanut (Dakopatts, Ltda.) (dilución 1/1000), durante 30 min. A continuación se realizaron 3 lavados en tampón tris-salino y se incubó durante 30 min en inmunosuero de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo, conjugado con peroxidasa (Dakopatts, Ltda.) (dilución de 1/100). Tras varios lavados en tris-salino se reveló la reacción con una solución de DAB (3-3'diamino-bencidina tetrahidrocloruro) (Sigma Chemical Co.) durante 5-7 min. Los núcleos se contrastaron con hematoxilina de Harris y las secciones fueron finalmente deshidratadas, aclaradas y montadas en resina sintética (Entellan) (Merck).

Se establecieron testigos de positividad y negatividad a la reacción. Para el control positivo se hizo una técnica idéntica a la descrita pero usando secciones de próstata de probada positividad. Para el control negativo se sustituyó la PNA o el inmunosuero específico contra la PNA por suero de caballo al 10 %. La reacción positiva estudiada se establece por una coloración marrón oscura. Esta coloración es consecuencia de que las moléculas del cromógeno (DAB), oxidadas por el complejo peroxidasa-peróxido de hidrógeno, presentan una serie de radicales libres que reaccionan entre sí formando polímeros insolubles (polímeros de indamina y fenacina)<sup>15</sup> con esta coloración.

## RESULTADOS

### Displasias mamarias

Los 15 casos de displasia mamaria estudiados comprendían diferentes formas de mastopatía fibroquística, algunas de ellas (5 casos) con predominio de los fenómenos involutivos, con lesiones tales como fibromatosis mamaria, transformación quística glandular (con o sin metaplasia apocrina), ectasia canalicular y atrofia lobulillar. Las restantes formas de displasia analizadas (10 casos) eran lesiones de predominio proliferativo, con alteraciones tipo hiperplasia ductal y ductular (simple y atípica), epiteliosis, papilomatosis, adenosis glandular simple, adenosis microquística y adenosis esclerosante.

En todas estas lesiones el inmunomarcaje por la PNA se estableció a nivel de los límites membranosos celulares, siendo la tinción mucho más acusada a nivel del borde apical de las células ductales y ductulares. La inmunotinción no presentaba un carácter regular y homogéneo, de forma que no todas las unidades ductales y ductulares se marcaban con igual intensidad. En ningún caso se apreció una clara tinción intracitoplásmica. A nivel de los canales, al igual que en los quistes galactofóricos, el material de secreción era asimismo intensamente positivo (figs. 1 y 2).

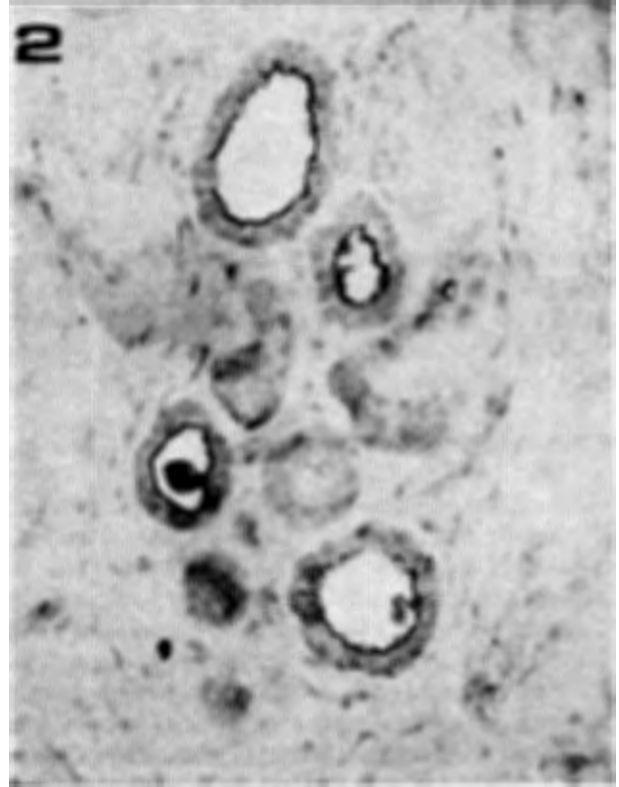
Las células de metaplasia apocrina presentaban un intenso marcate del borde apical, de forma que la inmunotinción por la PNA parecía delimitar el glucocálix, siendo de menor intensidad la positividad a nivel de los límites membranosos laterales y basales, donde el marcate era de carácter muy débil y discontinuo (figs. 3 y 4). Estas diferencias en la intensidad de la inmunotinción de los límites membranosos celulares eran menos acusadas a nivel de las células ductulares, si bien el predominio tincional era asimismo apical.

En ningún caso se comprobó la existencia de inmunotinción a nivel de las células estromales. Las células mioepiteliales eran generalmente negativas a la PNA y sólo de forma aislada existía alguna discreta positividad, siendo ésta de carácter membranoso. Esta aislada reactividad de carácter muy débil la pudimos comprobar sobre todo en los casos de adenosis esclerosante, donde aparecía algún débil reguero de positividad a nivel de las células mioepiteliales proliferantes.

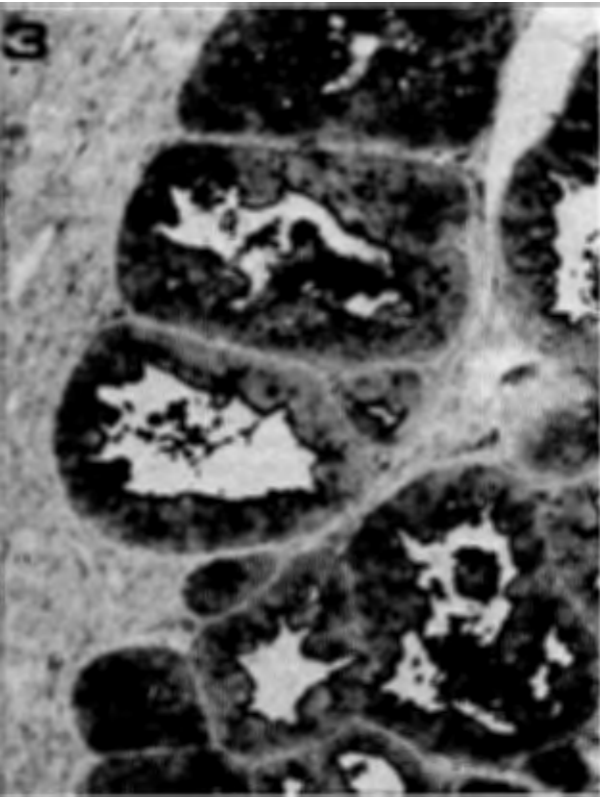
Analizando de forma comparativa los casos de displasia mamaria de tipo proliferativo frente a las formas de predominio involutivo-quiescente, no pudimos encontrar diferencias cuantitativas ni cualitativas en la inmunotinción por la PNA, existiendo en ambas formas un patrón similar



**Fig. 1.** Displasia mamaria. Lobulillos mamarios con inmunomarcado membranoso por la PNA en todas las unidades ductulares. El estroma intralobulillar es negativo. PNA 200x.



**Fig. 2.** Tinción casi exclusiva del borde apical o luminal de las células ductulares. PNA 300x.



**Fig. 3.** Hiperplasia ductal con metaplasia apocrina. Tinción apical membranosa y del material de secreción. PNA 200x.



**Fig. 4.** Metaplasia apocrina. Intensa inmunotinción membranosa exclusivamente apical. PNA 300x.

de tipo membranoso, con mayor intensidad en los bordes apicales. La expresividad de la PNA y, por tanto, del antígeno T no nos permitió establecer patrones de discriminación entre ambos tipos de displasia mamaria.

### Tumores mamarios benignos

Se han estudiado tres ejemplos de tumores benignos, correspondientes a dos fibroadenomas, uno de tipo intracanalicular, el otro mixto intra y extracanalicular, y un papiloma benigno intraductal.

A nivel de los fibroadenomas, la detección del antígeno T mostró una positividad de distribución similar a la encontrada a nivel de las displasias (fig. 5). La inmunotinción aparecía en el componente epitelial del fibroadenoma, marcando sobre todo los bordes membranosos apicales. La positividad fue irregular, con áreas de inmunotinción débil junto a otras zonas donde existía una tinción muy acusada. El estroma conjuntivo de tipo intralobulillar laxo de los fibroadenomas estaba desprovisto de positividad.

A nivel del papiloma intraductal, el inmunomarcaje por la PNA delimitaba también los contornos membranosos de las células epiteliales. Asimismo parecía existir un discreto marcateo del contorno de las células mioepiteliales, sobre todo a nivel de los ejes conectivos estrómicos del papiloma, donde existían numerosas células mioepiteliales de morfología alargada o fusocelular.

### Carcinomas mamarios

La expresividad morfológica de la PNA a nivel de los carcinomas mamarios ha sido diferente dependiendo del tipo histológico estudiado.

En el carcinoma lobulillar, y a nivel de la fase tumoral in situ, la inmunotinción ha sido muy constante y peculiar. Existía un marcateo débil membranoso periférico, junto a una acusada positividad intracitoplásmica, de carácter denso, en forma de pequeños glóbulos o vacuolas intracitoplásmicas. El tamaño de estas formaciones globulares intracitoplásmicas (figs. 6 y 7) era variado y se correspondían con las formaciones luminales intracitoplásmicas (luces o canaliculos intracitoplásmicos) que están presentes en las células del carcinoma lobulillar. La inmunotinción con la PNA se reveló como un marcador específico de estas luces intracitoplásmicas, ya que la positividad estaba presente en todos los casos de carcinoma lobulillar estudiados y en todas las áreas examinadas.

A nivel de los carcinomas ductales infiltrantes, la posi-

tividad a la PNA reveló no sólo un marcateo membranoso, sino también citoplásmico, si bien aquí era una tinción citoplásmica granular difusa, sin existir formaciones globulares o vacuoladas, como las encontradas en el carcinoma lobulillar (fig. 8). En general, la positividad fue más acusada en los casos de carcinoma ductal en los que la infiltración tumoral tenía lugar a expensas de células aisladas o disociadas, en comparación con los casos con infiltración por nidos sólidos, o por células conglomeradas, que mostraron una inmunotinción más débil.

A diferencia de las displasias mamarias y de los tumores benignos, la positividad en los carcinomas fue predominantemente intracitoplásmica más que membranosa. En los casos de carcinoma ductal bien diferenciado, y en los que existía abundante formación de túbulos o de estructuras glandulares neoplásicas, la inmunotinción fue, sin embargo, de predominio membranoso. Por el contrario, en las formas poco diferenciadas la inmunotinción citoplásmica se hacía predominante, existiendo un marcateo prácticamente total de toda la superficie celular.

### DISCUSION

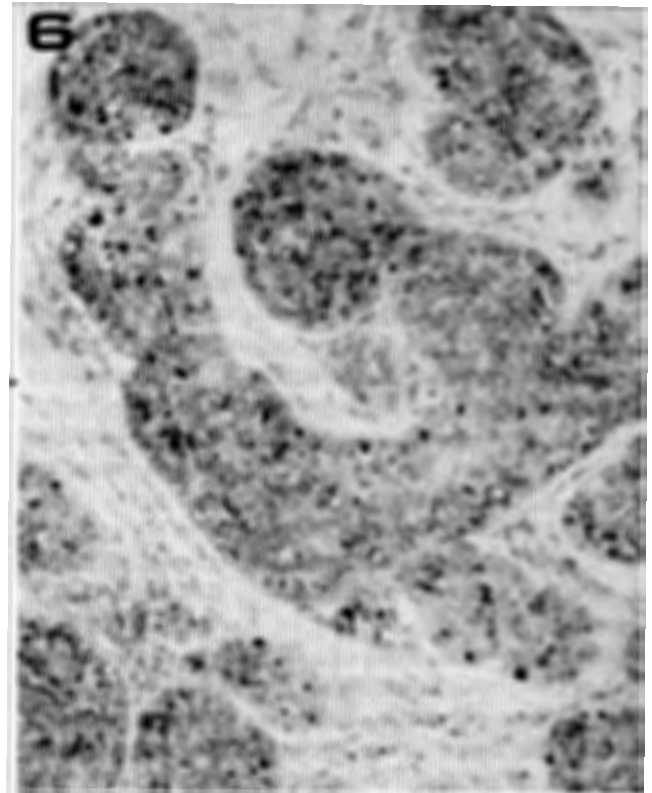
Las lectinas, en su conjunto, son proteínas o glucoproteínas de origen natural,<sup>16,17</sup> que originalmente se obtuvieron a partir de semillas vegetales, pero que hoy sabemos se hallan muy extendidas tanto en el reino vegetal como animal, habiéndose aislado de vegetales inferiores, microorganismos y animales tanto vertebrados como invertebrados. También se les ha denominado aglutininas vegetales, hemaaglutininas, fitohemaaglutininas o fitoaglutininas.<sup>17</sup> Estas lectinas presentan una específica capacidad para combinarse a residuos hidrocarbonados, siendo utilizadas frecuentemente para estudiar el glucocálix o cubierta de las superficies celulares.<sup>16,18</sup>

La PNA es una proteína de origen vegetal (*Arachis hypogaea*), que está constituida por 4 unidades o protómeros de idéntica composición.<sup>3</sup> Esta proteína tiene la capacidad de unirse específicamente a un residuo disacárido idéntico, en su estructura, al determinante antigénico terminal del antígeno T. Ello convierte el estudio de la PNA en un método de alta sensibilidad para detectar el antígeno T, que sobrepasa incluso a los resultados obtenidos con el estudio de los anticuerpos anti-T.<sup>18</sup>

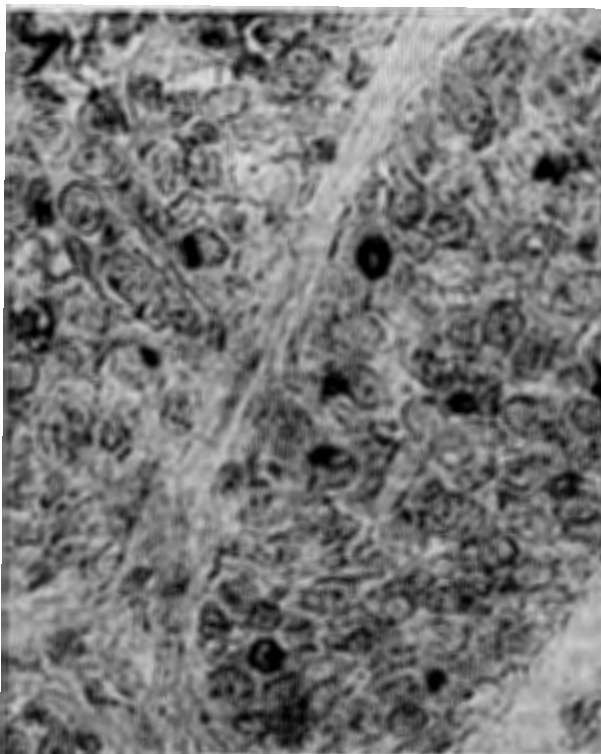
El análisis del antígeno T, de Thomsen-Friedenreich, reviste un especial interés a nivel de la patología mamaria por cuanto algunos autores<sup>12,19-21</sup> han considerado este antígeno un antígeno asociado tumoral (AAT) al cáncer de mama.



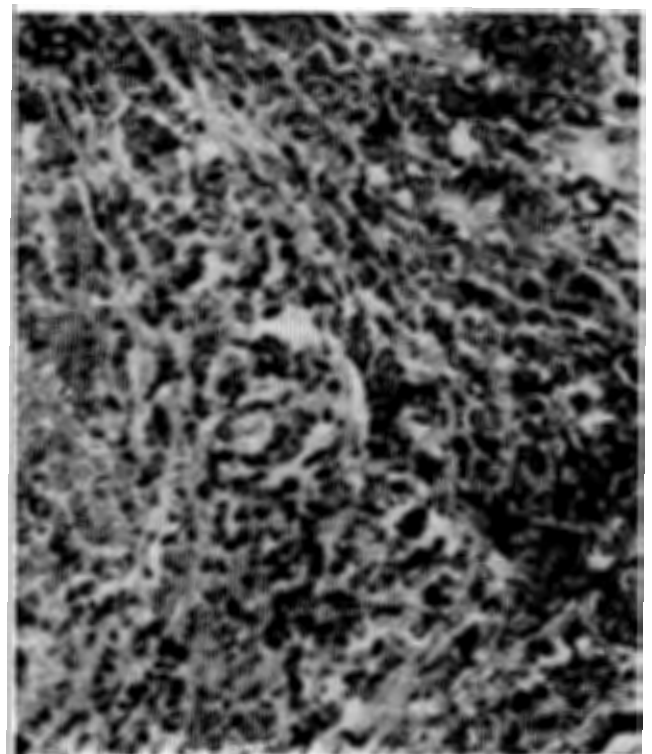
**Fig. 5.** Fibroadenoma intracanalicular. Inmunotinción membranaosa apical que delimita las hendiduras epiteliales del fibroadenoma. El estroma intralobulillar laxo del fibroadenoma es negativo. PNA 200x.



**Fig. 6.** Carcinoma lobulillar in situ. Existe marcaje de numerosas estructuras de carácter vacuolado, que a este aumento aparecen como formaciones puntiformes. PNA 200x.



**Fig. 7.** Carcinoma lobulillar in situ. Dúctulos con transformación neoplásica de carácter sólido. Obsérvese la presencia de estructuras globulares o vacuoladas intensamente positivas a la PNA y que corresponden a luces o canaliculos intracitoplásmicos. PNA 400x.



**Fig. 8.** Carcinoma ductal infiltrante. Tinción membranaosa y citoplásmica difusa de carácter heterogéneo e irregular en su distribución. En ocasiones, todo el citoplasma aparece marcado; en otros elementos la tinción es predominantemente periférica y membranaosa. PNA 200x.

A nivel inmunohistoquímico, los primeros trabajos realizados acerca del antígeno T,<sup>22,23</sup> utilizando anticuerpos anti-T, señalaron que tan sólo las neoplasias malignas mostraban expresividad del antígeno T, y estos resultados aparecían en concordancia con estudios bioquímicos<sup>19,20</sup> que indicaban que el antígeno T sólo se expresaba en la mama cancerosa. Sin embargo, los estudios realizados por Klein y cols.,<sup>9</sup> utilizando la PNA, demostraron que el antígeno T está presente tanto en la mama normal como en la cancerosa y que, por tanto, este antígeno no puede, en sentido estricto, considerarse un ATT al cáncer de mama.

Del mismo modo, Böcker y cols.<sup>5</sup> y Walker<sup>24</sup> encuentran la presencia del antígeno T a nivel del tejido glandular mamario normal y displásico, si bien con patrones de expresividad diferentes.<sup>25</sup> Nuestros resultados confirman esta posición, dado que la inmunotinción positiva a la PNA, indicadora de la presencia del antígeno T, aparece tanto en las displasias como en los carcinomas, de diferente tipo, analizados.

En nuestro estudio, además, el patrón de distribución encontrado es diferente en el cáncer que en la displasia mamaria. En los carcinomas la positividad es fundamentalmente intracitoplásmica, mientras que en las displasias el inmunomarcaje es sólo membranoso y predominantemente apical. Estos hallazgos están en concordancia con los referidos por Böcker y cols.,<sup>5</sup> quienes señalan asimismo que la positividad de la PNA en los carcinomas es diferente en los distintos tipos histológicos, y además en correlación con la presencia de receptores estrogénicos y progestérgicos positivos,<sup>5</sup> si bien no han encontrado otros autores<sup>25</sup> este último aspecto.

Por otra parte, Newman y cols.<sup>10</sup> señalan que existe una buena correlación entre la positividad a la PNA y el grado de diferenciación tumoral, de forma que los tumores bien diferenciados presentarían una acusada positividad frente a los carcinomas pobremente diferenciados, que tendrían una débil positividad o incluso negatividad. Nosotros hemos constatado esta correlación, si bien, más que en la intensidad del inmunomarcaje, las diferencias se establecen en el patrón del inmunomarcaje, citoplásmico o membranoso, de forma que los tumores bien diferenciados presentan un patrón predominante membranoso y en las formas indiferenciadas el patrón es predominantemente citoplásmico. Hay que indicar que Lloyd, Foley y Judd<sup>26</sup> han señalado también estas diferencias en la inmunotinción en relación al grado de diferenciación.

A pesar de la correlación existente entre grado de diferenciación e intensidad<sup>10</sup> o tipo de inmunotinción<sup>27</sup> por la PNA, no se ha podido comprobar que exista una rela-

ción entre el grado de positividad a la PNA y el pronóstico evolutivo de las pacientes con cáncer de mama, tanto referido a la tasa de recurrencias<sup>28</sup> como al número de metástasis axilares.<sup>26</sup>

Los resultados inmunohistoquímicos obtenidos en nuestro estudio demuestran que, si bien con una distribución topográfica diferente, tanto las lesiones benignas como los procesos cancerosos presentan expresividad del antígeno T. Estos hallazgos, al igual que los obtenidos por otros autores,<sup>5,9</sup> invalidan la idea de que el antígeno T sea un AAT al cáncer de mama. Al mismo tiempo, estos hallazgos entran en colisión con los datos obtenidos por Springer y cols.,<sup>13</sup> quienes indican que la inyección del antígeno T provoca una reacción de hipersensibilidad retardada en las pacientes con cáncer de mama, que está ausente en las pacientes con patología benigna o en la población femenina sin patología mamaria.

Howard, Ferguson y Batsakis,<sup>12</sup> sin embargo, han aportado datos que resuelven esta aparente contradicción. Estos autores señalan que la respuesta inmune frente al antígeno T, demostrable por una serología con anticuerpos anti-T, estaría en dependencia de la localización celular del antígeno. De forma que, cuando el antígeno T está localizado sólo a nivel de las membranas luminales o a nivel de la secreción intraluminal, este antígeno se encuentra en una situación inmunológicamente privilegiada, casi de secuestro inmunológico completo. Por el contrario, en los carcinomas el hecho de que el antígeno T se exprese a nivel citoplásmico difuso, así como la presencia de fenómenos de necrosis con liberación del antígeno T, permitiría el contacto y la información del sistema inmune frente al antígeno T. Esta hipótesis permite conciliar las diferencias señaladas por Springer y cols.<sup>13</sup> al inyectar el antígeno T a pacientes con y sin cáncer de mama y los resultados inmunohistoquímicos encontrados por nosotros en la patología displásica y maligna de la glándula mamaria.

Otro aspecto de interés es el peculiar inmunomarcaje del carcinoma lobulillar por la PNA. En nuestro material todos los casos de carcinoma lobulillar presentaban una inmunotinción intracitoplásmica de carácter globular o vacuolar intensamente positiva. Igualmente, Böcker y cols. indican que el 97,5 % de sus casos de carcinoma lobulillar eran positivos a la PNA con una morfología globular. Estas formaciones vacuoladas intracitoplásmicas teñidas por la PNA se corresponden con la imagen de las luces o canales intracitoplásmicos descritos en el carcinoma lobulillar a nivel de la microscopía óptica<sup>28</sup> y electrónica,<sup>29,30</sup> y que constituyen un dato muy característico de su morfología.<sup>31</sup>

Es conocido que estas vacuolas o luces intracitoplás-

micas son evidenciables en la microscopia óptica gracias a la técnica del Pas-Azul Alcían (PAS/AA)<sup>28</sup> (Martínez y Azzopardi, 1979), adoptando una imagen vacuolada o «en diana», con un núcleo central positivo y un ribete periférico a modo de anillo.<sup>28</sup> Para Böcker y cols.<sup>5</sup> la inmunotinción con la PNA sería una técnica más sensible que el propio PAS/AA para detectar la presencia de estas luces intracitoplásmicas, dato morfológico de gran utilidad a la hora de establecer el diagnóstico de un carcinoma lobulillar<sup>31</sup> y que nosotros hemos podido constatar en todos los casos analizados de esta neoplasia.

Comentar, por último, nuestros resultados en lo que hace referencia a las células mioepiteliales y la inmunotinción del antígeno T con la PNA. La mayoría de los autores no mencionan dato alguno con respecto a estas células en relación a la inmunotinción con la PNA,<sup>5,12,26</sup> o bien señalan de forma expresa que las células mioepiteliales son negativas a la PNA.<sup>9,10,32</sup> Tan sólo Howard y Taylor<sup>22,23</sup> señalan una focal positividad de las células mioepiteliales asociada a una hiperplasia intraductal, así como en los fibroadenomas, donde indican una débil positividad mioepitelial.

En nuestro estudio hemos encontrado asimismo una positividad muy discreta y generalmente débil en las células mioepiteliales, evidenciable sobre todo en un caso de fi-

broadenoma, en la adenosis esclerosante y en un papiloma intraductal, si bien hay que indicar que esta positividad fue siempre membranosa, irregular y heterogénea, lo que explica que la mayoría de los autores no mencionen la expresividad del antígeno T en estas células, que, por otra parte, juegan un papel importante en las displasias mamarias.

## RESUMEN

Se presenta un estudio inmunohistoquímico, llevado a cabo en 28 casos de patología mamaria de diferente naturaleza (displásica, tumoral benigna y maligna), utilizando anticuerpos conjugados con peroxidasa frente a la Lectina Peanut Aglutinina (PNA), que permite evidenciar el antígeno T de Thomsen-Friedenreich. Se señala la presencia de una distinta expresividad inmunomorfológica del antígeno T en la patología mamaria benigna (patrón tincional membranoso) y maligna (patrón tincional citoplásmico). Asimismo se indican diferencias en el patrón de inmunotinción en función del grado de diferenciación tumoral y se resalta la utilidad del antígeno T en la caracterización morfológica de las luces intracitoplásmicas del carcinoma lobulillar.

## REFERENCIAS

1. Friedenreich V. The Thomsen Hemagglutination Phenomenon. Levin and Munksgaard. Copenhagen 1930.
2. Landsteiner K, Levine P. On individual differences in human blood. *J Exp Med* 1928; 47: 757-775.
3. Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N. The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 1975; 250: 8518-8523.
4. Boorman KE, Dodd BE. The group-specific substances A, B, M, N, and Rh: Their occurrence in tissues and body fluids. *J Pathol Bacteriol* 1943; 55: 329-339.
5. Böcker W et al. Peanut lectin histochemistry of 120 mammary carcinomas and its relation to tumor type, grading, staging and receptor status. *Virchows Arch (pathol Anat)* 1984; 403: 149-161.
6. Springer GF, Desai PR. Extent of desialation of blood group MM, NN and MN antigens required for reactivity with anti-T antibody and *Arachis hypogaea* lectin. *J Biol Chem* 1982; 275: 2744-2746.
7. Bird GWG. Anti-T in peanuts. *Vox Sang* 1964; 9: 748-749.
8. Uhlenbruck G, Pardoe GI, Bird GWG. On the specificity of lectins with a broad agglutination spectrum. II. Studies on the nature of the T-antigen and the specific receptors for the lectin of *Arachis hypogaea* (ground nut). *Z Immunforsch* 1969; 138: 423-433.
9. Klein PJ et al. The presence and significance of the Thomsen-Friedenreich Antigen in mammary gland. II. Its topography in normal, hyperplastic and carcinoma tissue of the breast. *J Cancer Res Clin Oncol* 1979; 93: 205-214.
10. Newman RA, Klein PJ, Rudland PS. Binding of peanut lectin to breast epithelium, human carcinomas and a cultured rat mammary stem cell: use of the lectin as a marker of mammary differentiation. *JNCI* 1979; 63: 1339-1346.
11. Seitz RC, Fischer K, Stegner HE, Poschmann A. Detection of metastatic breast carcinoma cells by immunofluorescent demonstration of Thomsen-Friedenreich antigen. *Cancer* 1984; 54: 830-836.
12. Howard DR, Ferguson P, Batsakis JG. Carcinoma-associated cytostructural antigenic alterations: Detection by Lectin binding. *Cancer* 1981; 47: 2872-2877.
13. Springer GF, Murthy MS, Desai PR, Scanlon EF. Breast cancer patient's cell-mediated immune response to Thomsen-Friedenreich antigen. *Cancer* 1980; 45: 2949-2954.
14. Nakane PK, Pierce GB. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localizations of tissue antigens. *J Cell Biol* 1967; 33: 307-318.
15. Hanker JS. Catalytic osmiophilic polymer generation in the demonstration of membrane-bound enzymes and ultrastructural tracers in cytochemistry. En Barnett RJ, ed. Symposium in Electron Cytochemistry. Electron Society of America. 32nd Ann Meeting. John Wiley & Sons Inc. New York 1976.
16. Sharon N, Lis H. Lectins: Cell-Agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* 1972; 177: 949-959.
17. Palacín, A. Técnicas inmunohistoquímicas. Aspectos teóricos-prácticos. Atom SA. Barcelona 1984.
18. Alroy J, Ucci AA, Pereira MEA. Lectins: Histochemical probes for specific carbohydrate residues. En Advances in Immunohistochemistry, De Lellis, Masson Publishing Co. New York 1984.

19. Springer GF, Desai PR, Banatwala I. Blood group MN specific substances and precursor in normal and malignant human breast tissue. *Naturwissen* 1974; 61: 457-458.
20. Springer GF, Desai PR, Banatwala I. Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue. *JNCI* 1975; 54: 335-339.
21. Springer GF, Desai PR, Yang HI, Murthy MS. Carcinoma-associated blood group MN-precursor: Antigens against which all humans possess antibodies. *Clin Immunol Immunopathol* 1977; 7: 426-441.
22. Howard DR, Taylor CR. A method for distinguishing benign from malignant breast lesions utilizing antibody present in normal human sera. *Cancer* 1979; 43: 2279-2287.
23. Howard DR, Taylor CR. An antitumor antibody in normal human serum. Reaction of anti-T with breast carcinoma cells. *Oncology* 1980; 37: 142-148.
24. Walker RA. The binding of peroxidase-labelled lectins to human breast epithelium. I. Normal, hyperplastic and lactating breast. *J Pathol* 1984; 142: 279-291.
25. Springer GF et al. Tn, a carcinoma-associated antigen, reacts with anti TN of normal human sera. *Cancer* 1985; 55: 561-569.
26. Lloyd RV, Foley J, Judd WJ. Peanut Lectin Agglutinin and alpha-Lactalbumin. Binding and Immunohistochemical Localization in breast tissues. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 108: 392-395.
27. Barry JD, Koch TJ, Cohen C, Brigati DJ, Sharkey FE. Correlation of immunohistochemical markers with patient prognosis in breast carcinoma: A quantitative study. *Am J Clin Pathol* 1984; 82: 582-585.
28. Gad A, Azzopardi JG. Lobular carcinoma of the breast: a special variant of mucinsecreting carcinoma. *J Clin Pathol* 1975; 28: 711-716.
29. Fischer ER. Ultrastructure of the breast and its disorders. *Am J Clin Pathol* 1976; 66: 291-375.
30. Ahmed A. Atlas of the ultrastructure of human breast disease. Churchill Livingstone. Edinburgh 1978.
31. Battifora H. Intracytoplasmic lumina in breast carcinoma. A helpful histopathologic feature. *Arch Pathol Lab Med* 1975; 100: 620-621.
32. Walker RA. The binding of peroxidase-labelled lectins to human breast epithelium. I. Normal, hyperplastic and lactating breast. *J Pathol* 1984; 142: 279-291.