

Estudio inmunohistoquímico de los receptores de estrógeno y su relación con parámetros morfológicos

M. T. Salvadó*,
J. J. Sirvent*, **

SUMMARY

Seventy cases of breast carcinoma were studied for estrogen receptors (ER) with monoclonal antibody anti-rat H-222 (Abbot Laboratories, North Chicago, IL) (ER-ICA). The results were correlated with several morphologic parameters (tumor size, histologic type, tumor necrosis and lymphocyte infiltration), obtaining a stadistic significant data between ER and tumor differentiation, as well between ER and lymphocitic infiltration. A tendence of those tumors with a greater amount of necrosis of being ER negatives was also noted. In summary, the correlation of these parameters with a reliable method of ER determination allows a better understanding of the breast neoplastic disease and its clinical behavior.

* Servicio de Anatomía Patológica.
Hospital Verge de la Cinta.
Tortosa (Tarragona).

** Unidad de Anatomía Patológica
del Departamento de Ciencias
Médicas Básicas de la Facultad
de Medicina del Camp de
Tarragona. Reus (Tarragona).

Correspondencia:
María Teresa Salvadó Usach.
Servicio de Anatomía Patológica.
Hospital Verge de la Cinta.
43500 Tortosa (Tarragona).

Palabras clave

Receptores de estrógeno, Estudio inmunohistoquímico, Parámetros morfológicos, Cáncer de mama.

Key words

Estrogen receptors, Immunohistochemical study, Morphological parameters, Breast cancer.

INTRODUCCION

La relación que existía entre secreción ovárica y el crecimiento de algunos carcinomas de mama humana fue visto por Cooper en el año 1836.¹ Mientras que Beatson² observó que extirpando los ovarios de mujeres jóvenes, con cáncer avanzado de mamá, existía en algunas pacientes una evidente remisión de lesiones metastásicas. Estos hechos y otros hallazgos posteriores acuñaron el concepto de hormonodependencia.

El mecanismo de acción de estas hormonas en las

células tumorales vendría condicionado por la existencia de receptores (R), a los que se uniría la hormona, y ésta interactuaría con el DNA, aumentando la síntesis de RNA, que conduce, eventualmente, al crecimiento y la división celular.^{3,4}

La identificación de los R ha sido muy importante para entender la fisiología endocrina y ha sido de gran aplicación en el tratamiento del cáncer de mama.

La presencia de receptores de estrógeno (RE) en carcinomas humanos fue demostrado por Jensen y col. en 1960.⁵

La determinación de RE en el cáncer de mama se

ha venido llevando a cabo por el método del carbón recubierto con dextrano (DCC).⁶ Con este método, aproximadamente, un 55-65% de tumores primarios de mama y un 45-55% de los tumores metastásicos contienen más de 10 fmol/mg de proteína del citosol de RE, es decir, son positivos.⁷

En los últimos años se han obtenido anticuerpos monoclonales (Acm) contra RE derivados del útero de ternera y de células de carcinoma mamario que se han podido utilizar en técnicas inmunocitoquímicas⁸ en tejido congelado, con una excelente correlación con los estudios bioquímicos, e incluso en cortes de tejido incluido en parafina.⁹ La positividad por este método se localiza en el núcleo de la célula.

Durante muchos años se ha intentado encontrar en el carcinoma de mama hallazgos morfológicos (tipo histológico, tamaño tumoral, infiltrado linfocitario, etc.) que definan parámetros de valor pronóstico, aunque estos parámetros por sí solos no sirven para discriminar aquellos pacientes que son tributarios de una terapéutica hormonal. Es por ello que se buscan relaciones entre los RE y estos parámetros morfológicos. Así, se ha visto una asociación entre RE y algún tipo histológico (carcinoma lobulillar), infiltrado linfocitario y diferenciación.¹⁰

En cualquier caso, la mayoría de estos estudios se han realizado con RE, determinados por métodos bioquímicos. El motivo del presente trabajo es correlacionar los RE determinados inmunohistoquímicamente con parámetros morfológicos (tamaño tumoral, tipo histológico, grado histológico, necrosis e infiltrado linfocitario), con el fin de definir, si es posible de una forma más detallada, el perfil de la paciente con cáncer de mama tributaria de tratamiento hormonal.

MATERIAL Y METODOS

Se han estudiado un total de 70 casos de cáncer de mama, todos en mujeres, intervenidos en el hospital de Tortosa Verge de la Cinta, con una edad que oscila entre los 27 y 91 años ($X = 60,2$ años; $DS = 13,2$ años), entre enero de 1986 y junio de 1989.

En estos casos se determina lo siguiente:

- A) Estudio inmunohistoquímico de RE.
- B) Tamaño tumoral.
- C) Tipo histológico.
- D) Diferenciación del tumor (grado histológico).

- E) Necrosis tumoral.
- F) Infiltrado inflamatorio.

El método aplicado ha sido:

a) Estudio inmunohistoquímico de RE

1. Recogida de la muestra en quirófano, en un recipiente con hielo y envuelta en una gasa previamente humedecida con suero fisiológico. Traslado inmediato al laboratorio de anatomía patológica.
2. Corte de la tumoración y toma de una pequeña parte representativa que se congela en un Criocool, mod. CC-100 II (Neslab, USA), con isopentano. Se practica una sección con el criostato a 6 micras, que se tiñe con hematoxilina-cosina (HE) para confirmación diagnóstica, y el resto de la muestra se guarda en un congelador a -80° C.
3. El resto de la pieza se fija en formol-tamponado, incluyéndose de 3 a 5 bloques en parafina.
4. *Realización del método inmunohistoquímico:*
 - Secciones de 6 micras son sometidas a un método PAP con el Acm anti-RE de rata H222 (Abbott Laboratories), previa fijación de los cortes en formaldehído-PSB y paso por metanol y acetona fríos, siguiendo las instrucciones del fabricante.
 - Revelar con DAB (diaminobencidina-4HCl).
 - Contrastar con hematoxilina, deshidratar y montar con DPX.
 - La positividad, cuando existe, es de color marrón en el núcleo de la célula.
 - En todos los casos se utiliza un control negativo (corte en el que se sustituye el anti-suero primario por suero normal de rata), y en cada grupo de casos, un control positivo (muestra celular que se sabe previamente positiva).
 - La valoración se realiza teniendo en cuenta dos parámetros.
 - Intensidad de la tinción (i) (de 0 a 3).
 - % de células positivas (p).

Con estos valores podemos obtener el *histoscore* = $(i + 1) \times p$, considerando un tumor como positivo cuando es igual o superior a 100.

b) **Tamaño tumoral**

Se determina por la medición de eje mayor, en cortes seriados, incluyéndose en alguno de los grupos (T1 a T4) según las normas de la IUCC.¹¹

Los siguientes parámetros se estudian en las secciones de HE obtenidas de las muestras incluidas en parafina.

c) **Tipo histológico**

Se tienen en cuenta los tumores de la clasificación de la OMS.¹²

d) **Diferenciación del tumor**

Se obtiene mediante la valoración de tres parámetros: formación de túbulos, atipia nuclear y números de mitosis, siguiendo los criterios de Elston,¹³ dando a cada uno el valor de 1 a 3 y obteniendo una suma que va de 3 a 9. De 3 a 5 corresponde a un tumor grado I, 6 y 7 sería grado II y 8 y 9 corresponden a un grado III.

e) **Necrosis tumoral**

Le asignamos un valor de 0 a 3, dependiendo de si en ninguna sección se observan focos de necrosis (0), hasta aquellos casos en que las áreas de necrosis ocupan gran parte del tumor.³

f) **Infiltrado inflamatorio linfocitario peritumoral**

Se refiere al infiltrado linfocitario que acompaña, en mayor o menor grado, a gran parte de los tumores mamarios. Su ausencia se valora como 0, discreta cantidad de linfocitos tiene valor 1, cuando el infiltrado rodea en gran cantidad todos los nidos tumorales se le da valor 3 y el 2 sería una situación intermedia.

g) **Estudio Estadístico**

La correlación entre RE, tamaño del tumor, infiltrado linfocitario, necrosis y grado de diferenciación se ha realizado por el análisis de la varianza.

RESULTADOS

a) **Estudio inmunohistoquímico de RE (RE*ICA)**

La positividad se localiza en el núcleo de la célula, de color marrón, en grados variables de intensidad. En algunos casos se observa una variabilidad en la positividad según las áreas, aunque en los casos que dicha intensidad es máxima la tinción suele ser bastante uniforme (figs. 1 y 2 B). En el caso del carcinoma ductal, la positividad puede observarse tanto en el componente intraductal (fig. 2 A) como en el infiltrante. Las células del estroma no suelen ser positivas y éstas se distinguen perfectamente de las células tumorales por la forma y disposición. Ocasionalmente (en 2 de los 70 casos) existen algunos lobulillos que también son marcadamente positivos (fig. 3) y la sección tisular nos permite determinar la existencia de los RE en células normales.

Los resultados inmunohistoquímicos se expresan en la tabla I. Se observa una desviación estándar muy amplia debido a que los valores varían mucho, puesto que en los positivos el rango va de 106 a 400, mientras que en los negativos va de 0 a 94.

b) **Tamaño tumoral**

En la tabla II se expresan los valores de los diferentes grupos de tamaños tumorales, según sean los RE positivos o negativos. Cabe destacar una tendencia de

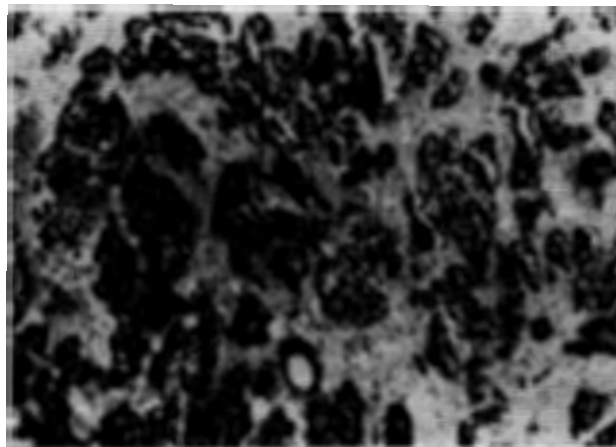


Fig. 1. Carcinoma ductal infiltrante. Inmunohistoquímica para RE. Nidos de células tumorales, en gran parte intensamente positivas (PAP contrastada con hemotoxilina, 100X).

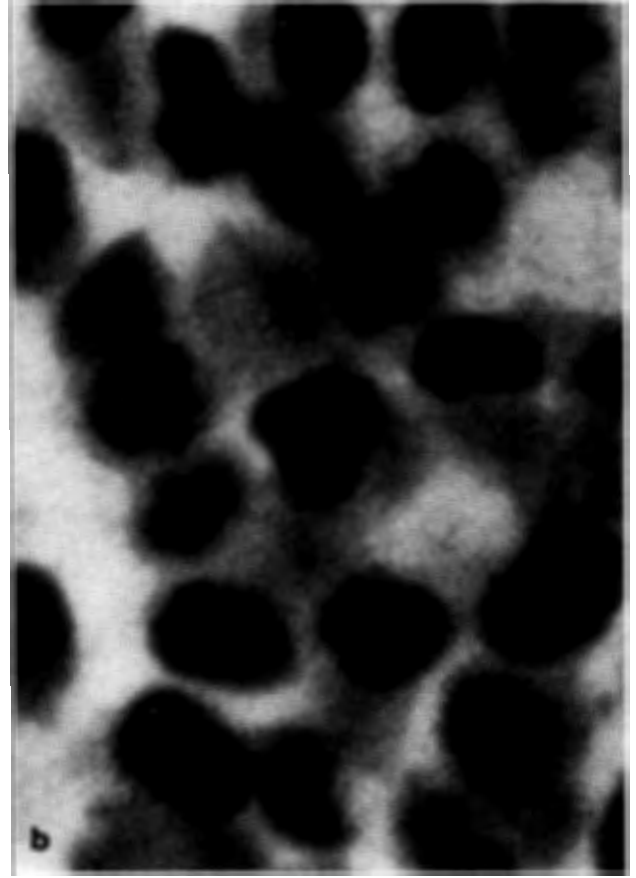
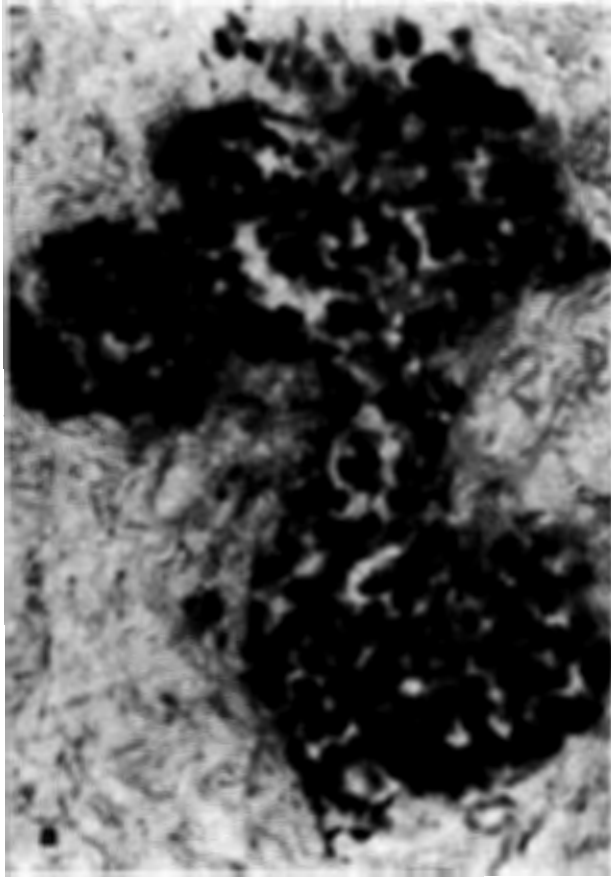


Fig. 2. A) Componente intraductal de un carcinoma ductal. Inmunohistoquimia para RE. Todas las células muestran intensa positividad en el núcleo de las células (PAP, contrastada con hematoxilina, 250X). B) Nido de células tumorales de un carcinoma ductal. Inmunohistoquimia para RE. Células con positividad nuclear (valor 3). (PAP, contrastada con hematoxilina, 1.000X).

los T2 a ser positivos; sin embargo, como puede apreciarse, no hay significación estadística entre tamaño tumoral y estado de los RE.

c) Tipo histológico

La distribución de los casos positivos y negativos según el tipo histológico lo tenemos expresado en la tabla II. Casi un 60% de los casos de carcinoma ductal son positivos; la mayor parte de carcinoma lobulillar también lo son (7/8), mientras que ninguno de los carcinomas medulares lo fue.

d) Diferenciación del tumor

En la tabla III tenemos la distribución de los casos en los tres grados de diferenciación. Existe un claro

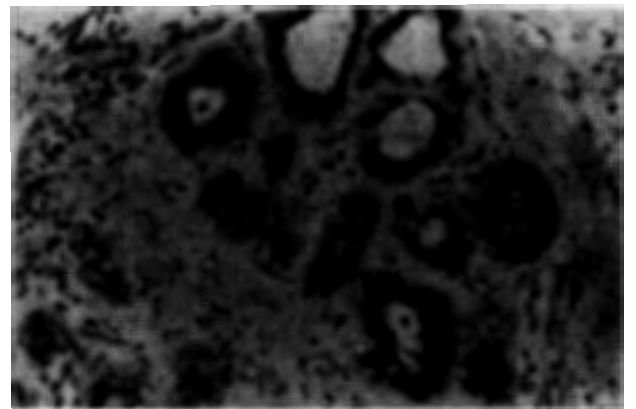


Fig. 3. Lubulillo normal en una sección de carcinoma ductal. Inmunohistoquimia para RE. Tinción positiva, uniforme e intensa en la mayor parte de las células (PAP, contrastada con hematoxilina, 250X).

TABLA I
RECEPTORES DE ESTROGENO POR
INMUNOHISTOQUIMIA (RE*ICA)

		Histoscore	
		X	DS
Positivos	41 (58,6%)	263,8	91,9
Negativos.....	29 (41,4%)	18,8	31,1

predominio de casos positivos en el grado I (el de mejor grado de diferenciación), en el que prácticamente las 3/4 partes lo son, mientras que ninguno de los 6 casos catalogados como grado III (los más indiferenciados) lo es. Estos resultados tienen significación estadística ($p = 0,0003$).

e) Necrosis tumoral

En la tabla IV tenemos expresada la distribución de los casos por el grado de necrosis, en las diferentes secciones del tumor (ausente, leve, moderada y extensa), catalogada del 0 al 3, y los RE positivos y negativos.

TABLA II

RE*ICA, TAMAÑO TUMORAL Y TIPO HISTOLOGICO.
TAMAÑO TUMORAL

	T0	T1	T2	T3	T4	
Positivo	1	13 (56%)	23 (64%)	3 (43%)	1 (33%)	41
RE*ICA						
Negativo.....	0	10 (44%)	13 (36%)	4 (57%)	2 (67%)	29
	1	23	36	7	3	70

F = 0,915. p = 0,4385 (NS).

TIPO HISTOLOGICO

	C. ductal	C. lobulillar	C. medular	
Positivos...	34 (58,6%)	7 (87,5%)	0	41
RE*ICA				
Negativos .	24 (41,4%)	1 (12,5%)	4 (100%)	29
	58	8	4	70

vos. Como podemos observar, existe una tendencia a que los tumores sin necrosis o que la tienen en un grado menor (grado 1) sean positivos, mientras que en los grados 2 y 3 existen 3 de 4 y 4 de 5 casos, respectivamente, que son negativos; sin embargo, esto no resulta significativo. No obstante, si agrupamos los casos del grado 0 y 1 y los del grado 2 y 3 y aplicamos una X^2 , nos da un resultado de 3,98, con un $p < 0,05$.

f) Infiltrado linfocitario

También en la tabla IV tenemos los casos por el grado de infiltrado linfocitario peri e intratumoral y los RE*ICA positivos y negativos. Se puede ver que aquellos casos que presentan gran cantidad de infiltrado linfocitario tienen tendencia a la negatividad para RE, mientras que los que no tienen o tienen poco suelen resultar positivos con más frecuencia, hecho que resulta significativo.

DISCUSION

Desde el punto de vista morfológico y de comportamiento biológico, el cáncer de mama es frecuentemente heterogéneo; ¹⁴ cabría pensar que puede serlo desde el punto de vista de los RE. Esto es así, y en algunas series llega a afectar a un buen número de casos (hasta un 27%). ¹⁵ Incluso en pacientes con tumores RE positivos puede ocurrir que existan áreas totalmente negativas, fenómeno que puede tener importancia clínica y biológica. ¹⁶ Nosotros esta heterogeneidad la apreciamos con mayor frecuencia en aquellos tumores con menor intensidad de tinción, ya que los que tienen el grado máximo todas o al menos la práctica totalidad de las células suelen ser positivas.

Normalmente el estudio de los RE se ha venido realizando por métodos bioquímicos (fundamentalmente DCC), que tiene una limitación a la hora de apreciar esta heterogeneidad tumoral, dado que se estudia tejido homogenizado, lo que impide conocer la clase de células y la proporción que existe con actividad receptora. El desarrollo de Acm para el estudio de RE ⁸ permite, entre otros aspectos, estudiar este hecho concreto e incluso, al menos para algunos autores, podría constituir una alternativa que obvie la necesidad de otros métodos, como el DCC, costosos en personal y medios. ^{17, 18, 19} Por otro lado, estos estudios inmu-

TABLA III

RE*ICA Y GRADO DE DIFERENCIACION. GRADO DE DIFERENCIACION				
	I	II	III	
Positivos.....	31 (74%)	10 (45%)	0	41
RE*ICA				
Negativos	11 (26%)	12 (55%)	6 (100%)	29
	42	22	6	70

F = 9,407. p = 0,0003.

nohistoquímicos tienen la ventaja de poder ser realizados en laboratorios de anatomía patológica mínimamente dotados. Sin embargo, a falta de conocer la correlación con la respuesta clínica al tratamiento coadyuvante, parece lógico combinar ambos métodos, aunque no cabe la menor duda que en ciertos casos (tumores muy pequeños, carcinoma inflamatorio, etc.) el método inmunohistoquímico puede ser el único aplicable.

La posible variabilidad en los resultados de RE y el hecho de que no todas las pacientes con RE+ responden al tratamiento, lleva a buscar otros parámetros, fáciles de determinar, en el contexto del estudio del tumor que faciliten identificar aquellos casos en que cabe esperar un mejor pronóstico por una buena respuesta al tratamiento. Bien es cierto que algunos de estos parámetros, por sí mismos, pueden considerarse de valor pronóstico.

En el caso del tamaño tumoral y su posible relación con los RE, que también tendría su interés pronóstico, vemos que esta relación no existe y parece que los RE se distribuyen de forma bastante uniforme.²⁰ No obstante, algún autor encuentra que, en los carcinomas infiltrantes de mama, el número de tumores con RE positivo por DCC decrece a medida que aumenta el tamaño.²¹

Hay una gran variabilidad en el contenido de RE entre unos tipos histológicos y otros. Así, en nuestra serie ninguno de los 4 casos de carcinoma medular ha sido positivo, hecho que coincide con lo encontrado en la literatura por métodos bioquímicos, al igual que el carcinoma lobulillar es en la mayor parte de casos positivo (del 80-85%), mientras que el carcinoma ductal es en un 50-60% de casos.²¹

A nuestro entender, el grado de diferenciación es

TABLA IV

RE*ICA, NECROSIS TUMORAL E INFILTRADO LINFOCITARIO. NECROSIS TUMORAL					
	0	1	2	3	
Positivos.....	33 (62%)	6 (75%)	1 (25%)	1 (20%)	41
RE*ICA					
Negativos	20 (38%)	2 (25%)	3 (75%)	4 (80%)	29
	53	8	4	5	70

F = 1,630. p = 0,1908 (NS).

INFILTRADO LINFOCITARIO					
	0	1	2	3	
Positivos.....	19 (86%)	17 (55%)	4 (31%)	1 (25%)	41
RE*ICA					
Negativos	3 (13%)	14 (45%)	9 (69%)	3 (75%)	29
	22	31	13	4	70

F = 5,723. p = 0,0015.

uno de los criterios morfológicos más importantes para determinar el comportamiento del tumor en el paciente no sólo en el cáncer de mama, sino en cualquier tipo tumoral. Clásicamente, por determinación bioquímica (DCC) de los RE, se había observado una relación entre el grado de diferenciación y el contenido de RE, de manera que a mejor diferenciación le correspondía mayor cantidad de RE.^{10, 22, 23, 24, 25} Esta misma relación la hemos encontrado nosotros con determinaciones inmunohistoquímicas, al igual que ya había sido visto recientemente por otros autores,^{26, 27} y, de alguna manera, ayudan a convalidar las determinaciones inmunohistoquímicas de los RE al obtenerse, por métodos diferentes, resultados similares.

La necrosis tumoral ha sido uno de los cambios morfológicos menos estudiados en la literatura, y hasta cierto punto podría considerarse como un índice de proliferación celular, ya que cabe pensar que los tumores con más áreas de necrosis son los que crecen más deprisa. De hecho, en nuestro trabajo, la cantidad de RE y el grado de necrosis parecen variables independientes; sin embargo, hay una tendencia a que aquellos casos con nula o escasa necrosis sean positivos para RE, y si dejamos de considerar caso por caso y los agrupamos, los de 0 y 1 por un lado y los de

2 y 3 por otro y aplicamos una chi cuadrado, la P es significativa. Berger y col.²⁸ habían llegado a conclusiones similares con un estudio bioquímico de los RE.

En cuanto al infiltrado linfocitario peri e intratumoral, existen estudios previos con inmunohistoquímica que llegan a las mismas conclusiones que nosotros,^{27, 28} y unos años antes habían llegado a observaciones similares por métodos bioquímicos.²¹ Nosotros no hemos estudiado el inmunofenotipo de estos linfocitos, aunque estudios previos parece que relacionan la cantidad de Leu 7 positivos y contenido de RE.²⁹

A modo de conclusión podemos decir que el estudio inmunohistoquímico de los RE, aún a falta de conocer las curvas de supervivencia de series amplias, puede ser un buen método para conocer el estado de los receptores en el cáncer de mama. El haber obtenido resultados similares, al correlacionarlos con parámetros morfológicos, a los reportados por métodos bioquímicos clásicos (DCC) ayuda de alguna forma a validar más el método, y, por otro lado, la importancia de estos parámetros clínicos por sí solos es indiscutible a la hora de predecir el comportamiento de un tumor.

RESUMEN

Se han estudiado los receptores de estrógeno (RE) en 70 casos de cáncer de mama con Acm anti-rata H-222 (Abbott Laboratories) (ER-ICA), obteniéndose un 58,6% de casos positivos. Los resultados se han correlacionado con varios parámetros morfológicos (tamaño tumoral, tipo histológico, grado histológico, necrosis tumoral e infiltrado linfocitario), obteniéndose una significación estadística entre RE y la diferenciación tumoral, así como entre RE y el infiltrado linfocitario. Existe también una tendencia a que los tumores con mayor cantidad de necrosis sean RE negativos. En definitiva, la correlación de estos parámetros con un método de determinación de RE perfectamente validado permite conocer mejor la enfermedad neoplásica de la mama y su comportamiento clínico.

REFERENCIAS

- Cooper AP. The principles and practice of surgery, vol 1. London E Cox 1836: 333-335.
- Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. Lancet 1896; 2: 104-107.
- Chan L, O'Malley BW. Mechanism of action of the sex steroid hormones. N Eng J Med 1976; 294: 1322-1328, 1372-1376 y 1430-1437.
- Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T y col. A two-step mechanism for interaction of estradiol with rat uterus. Proc Natl Acad Sci USA 1968; 59: 632-635.
- Jensen EV, Jacobson HI. Fate of steroid receptors in target tissue. En: Pinkus G y Vollmer EB, eds. Biologic activity of steroids in relation to cancer. New York. Academic Press 1960; pp 161-164.
- Korenman SG, Dukas BA. Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 1970; 30: 639-645.
- Wittliff JL. Steroid-hormone receptors in breast cancer. Cancer 1984; 53: 630-643.
- Greene GL, Nolan C, Engler JP, Jensen EV. Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 5115-5119.
- Salvado MT. Cáncer de mama. Estudio de receptores hormonales y su relación con parámetros clínicos, morfológicos y morfométricos. Universidad de Barcelona, 1990. Tesis doctoral.
- Chabon AB, Golberg JD, Venet L. Carcinoma of the breast. Interrelationships among histopathologic features, estrogen receptor activity and age of the patient. Hum Pathol 1982; 14: 368-372.
- UICC. Mama. En Hermanek P y Sobin LH TNM. Clasificación de los tumores malignos, 2.ª ed, Ginebra 1987: pp 93-99.
- Organización Mundial de la Salud. Tipos histológicos de tumores de la mama. Clasificación histológica internacional de tumores. Número 2, 2.ª ed. 1982.
- Elston CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. En: Page DL, Anderson TJ. Diagnostic histopathology of the breast. London, Churchill Livingstone 1987; pp 300-311.
- McCarty Jr KS, Lubahn DB, McCarty Sr KS. Oestrogen and progesterone receptors: Physiologic and pathologic considerations. Clin Endocrinol Metab 1983; 12: 133-154.
- Van Netten JP, Algard FT, Coy P y col. Estrogen receptor assay on breast cancer microsamples. Implications of percent carcinoma estimation. Cancer 1982; 49: 2383-2388.
- Van Netten JP, Algard FT, Coy P y col. Heterogeneous estrogen receptor levels detected via multiple microsamples from individual breast cancers. Cancer 1985; 56: 2019-2024.
- Bilous AM, Tyler JP, Toppila M, Milliken J. Whither cytosolic estrogen receptor assays? A comparison of commercially available kits for estrogen receptor assay. Pathology 1987; 19: 223-228.
- Rasmussen BB, Thorpe SM, Norgaard T y col. Immunohistochemical steroid receptor detection in frozen breast cancer tissue. A multicenter investigation. Acta Oncol 1988; 27: 757-760.
- Von Kleist S, Berling J, Koltzenburg J, Gropp H. Estrogen receptor determinations in primary breast cancer. A comparison of a biochemical dextran-coated charcoal and an immunohistological technique. J Cancer Res Clin Oncol 1988; 114: 623-627.
- Andry G, Suciú S, Pratola D y col. Relation between estrogen receptor concentration and clinical and histological factors: Their relative prognostic importance after radical mastectomy for primary breast cancer. Eu J Cancer Clin Oncol 1989; 25: 319-329.
- Fu YS, Maksem JA, Hubay CA, Temmim L, Reagan

- JW. The relationship of breast cancer morphology and estrogen receptor protein status. En: CM Fenoglio, M Wolff ed, Progress in surgical pathology, vol III, 1981; Masson: New York, pp 65-76.
22. Furmansky P, Saunders DE, Brooks SC, Rich MA. The prognostic value of estrogen receptor determinations in patients with primary breast cancer: An update. *Cancer* 1980; 46: 2794-2796.
 23. Millis RR. Correlation of hormone receptors with pathological features in human breast cancer. *Cancer* 1980; 46: 2869-2871.
 24. Rasmussen BB, Rose C, Thorpe SM y col. Histopathological characteristics and estrogen receptor content in primary breast carcinoma. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1981; 390: 347-351.
 25. Jonat W, Maass H, Stegner HE. Immunohistochemical measurement of estrogen receptors in breast cancer tissue samples. *Cancer Res* 1986 (Suppl); 46: 4296-4298.
 26. Reiner A, Kolb R, Reiner G y col. Prognostic significance of steroid hormone receptors and histopathological characterization of human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987; 113: 285-290.
 27. Reiner A, Reiner G, Spona J, Schemper M, Holzner JH. Histopathologic characterization of human cancer in correlation with estrogen receptor status. *Cancer* 1988; 61: 1149-1154.
 28. Berger U, Wilson P, McClelland RA, Davidson J, Coombes RC. Correlation of immunocytochemical demonstrated estrogen receptor distribution and histopathologic features in primary breast cancer. *Hum Pathol* 1987; 18: 1263-1267.
 29. Underwood JCE, Giri DD, Rooney N, Lonsdale R. Immunophenotype of the lymphoid cell infiltrates in breast carcinomas of low oestrogen receptor content. *Br J Cancer* 1987; 56: 744-746.