

DETERMINAÇÃO DE RECEPTORES HORMONAIS EM LESÕES BENIGNAS DA MAMA

Importância do Ciclo Menstrual

MARIA ROSA Q. UBEDA DE KASTNER¹, ANA MARIA DE SOUZA SCHETTINO²,
PAULO ANTONIO DE PAIVA RABELO³, RICARDO SORAGGI⁴

Instituto Nacional de Câncer — Rio de Janeiro — RJ

RESUMO

Realizou-se uma análise de receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PgR) em lesões benignas de mama, mediante técnica citoquímica de fluorescência. Os resultados em fibroadenoma e mastopatia fibrocística foram similares entre si, apresentando capacidade variável de ligação estrogênica e progesterônica citoplasmática. A correlação ciclo menstrual/níveis de receptores foi determinada com conhecimento do dia exato de início do último ciclo e sua regularidade. Nossos resultados sugerem que a mensuração na fase folicular inicial, mais que nas outras, previne a ocorrência de níveis falso-negativos de ER e PgR. Outrossim, o uso prévio de contraceptivos orais apresentou-se associado a valores decrescentes de ER e PgR.

UNITERMOS: patologias benignas de mama, receptores de estrogênio e progesterona, método citoquímico de fluorescência, ciclo ovariano, uso de anovulatório

INTRODUÇÃO

A determinação dos receptores de estrogênio e progesterona (ER e PgR) já está bem estabelecida como exame indicador de uma possível resposta clínica ao tratamento hormonal, ablativo ou aditivo nas pacientes com câncer de mama.

Dessa forma a investigação quantitativa destes receptores passa a ser um componente obrigatório de qualquer esquema terapêutico desta neoplasia maligna.

O seu objetivo prático é estabelecer, antes de iniciar a terapia, a hormônio-dependência do tumor, identificando-o, não só como ER e PgR positivos, como também situá-lo quantitativamente, para assim poder defini-lo de acordo com o seu maior ou menor controle endócrino¹.

Tanto as técnicas bioquímicas como as citoquímicas usadas são de fácil realização. Utilizam como ponto de partida fragmentos de tumor, em finos cortes criostáticos ou macerados para obtenção de soluções proteicas (citosol).

Adotamos em nosso laboratório o método citoquímico pela fluorescência que, junto com

a vantagem de apresentar intactas as características morfológicas do espécime, permite observar a presença de ER e do PgR *in situ* tanto no citoplasma como no núcleo dos elementos celulares².

Observações realizadas em vários laboratórios assinalam que os valores de ER e PgR são freqüentemente mais positivos em pacientes com câncer de mama pós-menopáusicas do que nas pré-menopáusicas. Quando Heuson³ procurou explicar este fato, sugeriu que nas mulheres pré-menopáusicas, o hormônio endógeno, ao se ligar aos receptores específicos, seria o responsável pelo impedimento da detenção de parte destas proteínas pelas técnicas disponíveis. Assim, visto que existe um suporte clínico indicativo de uma variação hormonal no tecido mamário durante o ciclo menstrual, acreditamos ser de grande importância avaliar sua influência em pacientes na menacme.

Com este objetivo, analisamos os receptores hormonais em pacientes apenas com lesões benignas (fibroadenoma e mastopatia fibrocística), cujos dados anamnésicos informavam o dia do ciclo menstrual no momento da biópsia, sua regularidade e a utilização ou não de qualquer hormônio.

^{1,2} Serviço de Anatomia Patológica — Seção de Pesquisa Aplicada. ³ Centro de Documentação Científica e Informática. ⁴ Serviço de Mastologia. Agradecimentos: os autores agradecem à Dr.^ª Marise Souto Rabelo e à engenheira de métodos Maria Francinette Pereira da Silva a colaboração prestada na análise dos dados. Endereço para correspondência: Praça da Cruz Vermelha, 23 — 5º andar. 20230 — Rio de Janeiro — RJ

MATERIAL E MÉTODOS

Duzentas e vinte e seis biópsias de pacientes com idade compreendida entre 13 e 50 anos, com diagnóstico histopatológico de lesão benigna de mama, realizado pela equipe de patologistas do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Nacional de Câncer, foram processadas imediatamente para a determinação dos receptores hormonais, de acordo com a técnica citológica de fluorescência já descrita em trabalho anterior².

Para conseguir documentar um mesmo detalhe histológico e histoquimicamente, passamos a fixar o corte logo após a leitura dos receptores pela fluorescência. Utilizamos fixação pelo álcool metílico-acetona em partes iguais, durante 30 minutos, seguida de coloração convencional (HE) e reestudo.

A quantificação dos receptores foi realizada sempre sem prévio conhecimento dos fatos clínicos, só posteriormente considerados.

Julgamos relevante o preenchimento obrigatório, para cada paciente, de um formulário contendo informações referentes à idade, menarca, ciclo hormonal e uso de anovulatórios.

Quanto ao ciclo ovariano, optamos pela divisão em: fase folicular inicial (dias 1 a 7), folicular final (dias 8 a 15), luteínica inicial (dias 16 a 22) e luteínica final (dias 23 a 28).

Finalmente, procedeu-se análise estatística, empregando-se o teste do qui-quadrado (χ^2), apresentada em forma de tabelas.

RESULTADOS

Para melhor compreensão dos dados analisados e computados, elaboramos um resumo prático dos principais itens:

Número de pacientes

De um total de 226 pacientes, foram excluídas 16, pela impossibilidade de determinação da fase do ciclo, devido à menopausa ou histe-

rectomia, restando, assim, uma população de 210.

Tipos histopatológicos

No grupo estudado, 156 mulheres (74,3%) eram portadoras de fibroadenoma e 54 (25,7%) de mastopatia fibrocística, dando uma relação de 3:1.

Histologicamente, tanto os fibroadenomas como mastopatias apresentaram diferentes gamas de celularidade, proliferação epitelial e estromal.

Idade cronológica e da menarca

Analisando a idade média das pacientes por patologia, observamos uma ligeira superioridade naquelas com mastopatia fibrocística; no entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa devido ao grande desvio padrão (Tabela 1) :

TABELA 1 — Idade cronológica e da menarca

Diagnóstico	IDADE	
	Cronológica	Menarca
Fibroadenoma	25,2 ± 7,6	12,7 ± 1,1
Mastopatia Fibrocística	31,3 ± 9,5	12,7 ± 2,0
Total	26,8 ± 8,5	12,8 ± 1,8

Em relação à idade da menarca, não houve diferença em termos absolutos, nem diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

A ocorrência de grande desvio padrão na idade média mostrou a conveniência de análise por faixa etária dos dois grupos, visando identificar variações setoriais (Tabela 2). Houve uma concentração de mastopatia fibrocística da 3ª à 5ª décadas e de fibroadenoma da 2ª à 4ª décadas. Vale ressaltar que não foram apreciados casos com idade superior a 50 anos, nem inferior a 13 e que 45,2% do total estavam na terceira década de vida.

TABELA 2 — Faixa etária

Diagnóstico	FAIXA ETÁRIA				Total
	10 – 19	20 – 29	30 – 39	40 – 50	
Mastopatia	4 (7,4%)	21 (38,9%)	18 (33,3%)	11 (20,4%)	54 (100%)
Fibroadenoma	39 (25%)	74 (47,4%)	34 (21,8%)	9 (5,8%)	156 (100%)
Total	43 (20,5%)	95 (45,2%)	52 (24,8%)	20 (9,5%)	210 (100%)

TABELA 3 – Lateralidade da lesão

Diagnóstico	LATERALIDADE			
	Mama Direita	Mama Esquerda	Bilateral	Total
Mastopatia fibrocística	72 (46,2%)	74 (47,4%)	10 (6,4%)	156 (100%)
Fibroadenoma	20 (37%)	31 (57,4%)	3 (5,6%)	54 (100%)
Total	92 (43,8%)	105 (50%)	13 (6,2%)	210 (100%)

TABELA 4 – Uso de anovulatório

Diagnóstico	Nunca	Sim	Sim/Suspensão	Total
Mastopatia Fibrocística	27 (50%)	7 (13%)	20 (38%)	54 (100%)
Fibroadenoma	93 (59,6%)	17 (10,9%)	46 (29,5%)	156 (100%)
Total	120 (57,2%)	24 (11,4%)	66 (31,4%)	210 (100%)

TABELA 5 – Determinação de receptores hormonais x patologia

Diagnóstico	RECEPTOR							
	ESTROGÊNIO				PROGESTERONA			
	+	±	-	Total	+	±	-	Total
Mastopatia Fibrocística	14 (25,9%)	1 (1,9%)	39 (72,2%)	54 (100%)	16 (29,6%)	3 (5,6%)	35 (64,8%)	54 (100%)
Fibroadenoma	33 (21,1%)	21 (13,5%)	102 (65,4%)	156 (100%)	44 (28,2%)	18 (10,9%)	95 (60,9%)	156 (100%)
Total	47 (22,4%)	22 (10,5%)	141 (67,1%)	210 (100%)	60 (28,6%)	20 (9,5%)	130 (61,9%)	210 (100%)

Lateralidade da lesão

Em relação à lateralidade (Tabela 3), constatou-se pequena incidência de bilateralidade (6,2%) e pequena predominância de acometimento da mama esquerda (50%), em comparação à direita (43,8%).

Regularidade do ciclo menstrual

Não houve significado estatístico entre as patologias, no que se refere à regularidade do ciclo, ocorrendo 75% de ciclos regulares e 25% de irregulares.

Uso de anovulatórios

Na população considerada, 57,2% nunca haviam utilizado anovulatórios; 31,4% tinham

história progressiva e 11,4% história atual de uso (Tabela 4).

As variações observadas entre as portadoras de mastopatia e naquelas de fibroadenoma não possuem significância estatística.

Determinação dos receptores

A pesquisa dos receptores de estrogênio e progesterona evidenciou em relação ao estrogênio 67,1% de resultados negativos, 22,4% de positivos e 10,5% de intermediários (Tabela 5). Para progesterona, ocorreram 61,9% de negatividade, 28,6% de positividade e 9,5% de intermediários.

Como os grupos de mastopatia fibrocística e de fibroadenoma não apresentam diferenças significativas a nível de 95 e 99% em relação à idade média, menarca, lateralidade da patologia,

TABELA 6 — Determinação de receptores hormonais

	RESULTADO						
	ER+ PgR+	ER+ PgR+	ER- PgR-	ER± PgR+	ER- PgR+	ER- PgR±	ER± PgR-
Número de pacientes	46 (21,9%)	14 (6,6%)	130 (61,9%)	7 (3,3%)	6 (2,6%)	6 (2,9%)	1 (0,5%)

regularidade do ciclo e mensuração de receptores, passamos a considerá-los homogêneos e, para fins de cálculo, considerá-los como um só grupo. Nessas circunstâncias, evidenciamos (Tabela 6) que 21,9% são ER e PgR positivas; 61,9% ER e PgR negativas; 2,9% ER negativas e PgR positivas; e não observamos nenhum caso ER positivo e PgR negativo.

Localização dos receptores

O estudo histopatológico dos receptores pela fluorescência mostrou diferenças nítidas entre as células epiteliais-alvo e as estromais e mioepiteliais não-alvo. Porquanto as primeiras exibiram escala espectral, variando do negativo ao intensamente positivo; as demais foram negativas ou apenas ligeiramente fluorescentes.

A presença concomitante de ductos totalmente negativos e positivos, de segmentos e/ou de células isoladamente positivos nos ductos resultou em ampla gama de espectro fluorescente, comprovante da heterogeneidade celular, não só entre os ductos, como dentro de um mesmo ducto.

Em relação à localização celular, ocorreu predomínio de fluorescência em forma de casquete no pólo apical das células luminares, seguida de presença no pólo basal das células externas, em contato com a membrana basal.

Observamos, também, fluorescência citoplasmática difusa comumente em áreas de maior proliferação epitelial.

O envoltório de células mioepiteliais, bem nítido quando hipertrofiado, apresentou contorno celular corado, mas nunca fluorescente.

Dosagem de receptores x ciclo hormonal

A análise de receptores hormonais de estrogênio e progesterona por fase de ciclo hormonal mostrou, na fase folicular inicial, uma correspondência de 100%; na fase folicular final, de 89,8%; na fase luteinizante inicial, de 84,4% e na fase luteinizante final de 83,3% dos casos.

Devido ao número insuficiente de pacientes e ao grande número de possibilidades quando da associação de três variáveis, não foi possível agrupar separadamente os casos de uso atual e progresso de anovulatório.

Um exame mais detalhado foi feito na distribuição das pacientes por tipo de receptor, segundo as fases do ciclo ovariano (Tabela 7). Aplicamos aqui o teste do qui-quadrado cercado, para saber se a distribuição por fase era proporcional à global, tendo sido esta hipótese rejeitada com 99% de certeza.

TABELA 7 — Determinação de receptores hormonais x ciclo ovariano

Ciclo Ovariano	Receptor					
	Estrogênio			Progesterona		
	+	±	-	+	±	-
Fase folicular inicial	31	1	26	31	1	26
Fase folicular final	6	4	49	10	3	46
Fase luteinizante inicial	2	9	34	8	7	30
Fase luteinizante final	7	8	33	12	7	29

Aplicamos em seguida o mesmo teste, para verificar se a distribuição por fase seria uniforme. A hipótese foi igualmente rejeitada a nível de 99% de certeza para determinação de receptores com valores positivos; a nível de 95% para valores intermediários; a nível de 90% para estrogênio negativo e a nível de 75% para progesterona negativo.

Finalmente, para testar se o fato da distribuição não ser uniforme nas fases do ciclo poderia estar associado ao comportamento apresentado por uma delas, procedemos a um estudo comparativo de cada uma em relação às demais, e observamos que realmente não existe uniformidade entre elas, sendo que na fase folicular esta evidência é mais forte, com nível de certeza acima de 90%.

Dosagem de receptores x uso de anovulatórios

Em relação a anovulatório, as pacientes foram subdivididas em dois grupos: um, daquelas com história atual ou pregressa de utilização e outro daquelas que nunca fizeram uso deles (Tabela 8). Observamos diferença estatisticamente significativa a nível de 95% de certeza entre os dois grupos, para resultados positivos, negativos e intermediários de estrogênio e progesterona.

TABELA 8 – Determinação de receptores x uso de anovulatório

Anovulatório	Receptor					
	Estrogênio			Progesterona		
	+	±	-	+	±	-
Usa/usou	10	4	76	17	3	69
Nunca usou	36	18	66	44	15	62

DISCUSSÃO

A mama normal humana, assim como suas lesões, é influenciada pelo meio hormonal, sendo fato demonstrativo a resposta obtida em várias pacientes com câncer avançado de mama, submetidas à hormonioterapia aditiva ou ablativa cirúrgica. Para estes casos, o valor da determinação de receptores de estrogênio e progesterona no citosol ou no próprio corte do tecido passou a ser um procedimento **standard** na seleção para o tratamento.

De um modo geral, se admite que as patologias benignas apresentam receptores esteróides em quantidades muito mais baixas que as obtidas em tumores malignos. Entretanto, existem consideráveis controvérsias quanto à frequência desta positividade.

Assim, para Johanson e col.⁴, o tecido normal e os tumores benignos são, salvo raras exceções, sempre negativos; já outros relatos citam positividade variável de 7 a 85%⁵⁻¹³.

Outro ponto relevante é sua localização tissular. Segundo Rosen¹², o receptor estaria situado preferencialmente nas células epiteliais e menos nas estromais. E vários autores^{7, 8, 14} têm assinalado a importância da proliferação epitelial na quantificação dos receptores.

Em nossa experiência, através de metodologia citoquímica de fluorescência, a presença de ambos os receptores foi praticamente exclusiva de células epiteliais ductais e acinares, com fluorescência predominando nos seus pólos apical e

basal, e ausente nas células mioepiteliais e estromais. Verificamos também que quanto mais acentuada a hiperplasia epitelial, maior tende a ser o grau de positividade. Porém, sempre persistindo uma heterogeneidade celular, não só entre os vários ductos e/ou ácinos, como até dentro da mesma estrutura. O fator responsável desta heterogeneidade da população epitelial com respeito ao receptor deve residir, em parte, nas propriedades intrínsecas das células¹, uma vez que todas estão expostas a meio hormonal idêntico.

Apesar de a idade média das pacientes, quando decomposta por faixa etária, mostrar que o fibroadenoma acomete mulheres mais jovens que a mastopatia, os outros itens estudados não apresentaram diferenças estatísticas entre as duas patologias, o que nos permitiu considerá-las como um só grupo homogêneo para fins de cálculos posteriores.

Assim, na quantificação dos receptores hormonais, verificamos que em 90,4% do total de casos havia coincidência de ER e PgR, sendo os resultados duplo-negativos os mais freqüentes (61,9%), seguido dos duplo-positivos (21,9%) e dos duplos-intermediários (6,6%); uma falta de concordância entre ER e PgR foi menos freqüente como assinalado na literatura.

Quando esta mensuração é abordada em relação às fases do ciclo, encontramos na folicular inicial uma concordância de 100%, na folicular final de 89,8%, na luteinizante inicial de 84,4% e na luteinizante final de 83,3%.

Devido a esta diferença de resposta nas quatro fases, realizamos novo estudo que mostrou existir um predomínio de positividade para ER e PgR somente na fase folicular inicial e de negatividade para as outras, sendo que esta mudança de padrão é maior na folicular final. Todas estas alterações possuem significado estatístico e demonstram uma diferença mais acentuada da fase folicular inicial em relação às outras, principalmente a folicular final.

Visto que existe um critério endocrinológico unânime que admite uma atividade rítmica de produção de estrogênio e progesterona endógenos durante o ciclo menstrual, é fácil concluir que isto poderá ter efeito apreciável na determinação dos receptores. Assim, resultados negativos obtidos em pacientes na menacme poderão ser devidos à ausência ou à saturação dos receptores específicos pela quantidade elevada de hormônio circulante. De fato, Meyer¹⁴ aconselha muito cuidado na interpretação de casos receptor-negativos em câncer de mama de mulheres na menacme, quando a concentração de estradiol no sangue apresenta valores superiores a

300pg/ml, e assinala a existência de uma relação inversa entre ambos.

A nosso ver, devem existir, na fase folicular inicial das pacientes que nunca usaram anovulatórios, uma ausência de estrogênio e progesterona endógenos e, conseqüentemente, uma elevação dos receptores específicos livres. Mais tarde, e em decorrência de um início gradual da presença de estrogênio, os receptores passam a ser ocupados e translocados para o núcleo, havendo concomitantemente formação de novos receptores, mas que também são imediatamente ocupados. No início da fase luteínica, pelo aparecimento da progesterona endógena, iniciar-se-á um efeito antiestrogênico, prolongando a retenção do complexo receptor-estradiol e inibindo a produção de novos receptores estrogênicos e progesterônicos. Finalmente, na fase luteínica tardia existirá um decréscimo tanto de estrogênio como de progesterona, e este sinergismo possibilitará o início de uma nova elevação de receptores livres.

Esta distribuição não se apresenta tão nítida quando há história atual ou pregressa de uso de anovulatórios. Nossos resultados mostram uma maior negatividade neste grupo, com uma diferença estatisticamente significativa a nível de certeza de 95%.

Uma possível explicação para este fato seria que os hormônios exógenos, ao se ligarem aos receptores específicos, impediriam a detecção de pelo menos uma parte dos mesmos e/ou não permitiriam o desencadeamento de formação de novos receptores.

Assim sendo, tanto a fase do ciclo (exceto a folicular inicial), como o uso de anovulatório, poderão ser os responsáveis por parte de algumas mensurações negativas de receptores hormonais e, portanto, resultados obtidos nestas condições poderão não estar representando a quantificação real dos mesmos.

CONCLUSÕES

1 — São considerados homogêneos, para fins de cálculo, os dois grupos estudados (mastopatia e fibroadenoma) uma vez que as diferenças observadas não têm significância específica em relação à idade média, menarca, lateralidade de patologia mamária, regularidade do ciclo, frequência no uso de anovulatório e pesquisa de receptores hormonais.

2 — Existe uma significância estatística de 99% de certeza de que o fibroadenoma acomete mulheres mais jovens que a mastopatia.

3 — São realmente as células epiteliais dos

ductos e ácinos as que caracterizam a positividade e negatividade para ER e PgR.

4 — O número de células receptor-positivas varia em quantidade e qualidade entre as estruturas epiteliais e, por vezes, até dentro das mesmas, devido à distribuição heterogênea do receptor.

5 — Existe uma tendência específica na localização dos receptores, no citoplasma das células epiteliais, para o pólo apical e em forma de casquete.

6 — Na avaliação dos receptores hormonais, 90,4% dos casos mostram coincidência no resultado do receptor para estrogênio e progesterona, sendo os duplo-negativos mais freqüentes.

7 — A mensuração dos receptores mostrou diferentes respostas de significado estatístico nas quatro fases do ciclo ovariano. A diferença mais acentuada é da fase folicular inicial em relação às outras, principalmente da folicular final.

8 — As quantidades de hormônios circulantes, quando elevadas, podem interferir na determinação dos receptores, saturando as ligações específicas ou interferindo na formação de novos receptores.

9 — A fase do ciclo (exceto a folicular inicial) e o uso de anovulatório podem ser responsáveis pela negatividade de receptores hormonais, principalmente de estrogênio.

10 — Devido às variações cíclicas da presença de estrogênio e progesterona que ocorrem na menarca e a interrelação entre estes hormônios e o crescimento dos tecidos-alvo, os dados referentes ao **status** mensal e ao uso de anovulatórios devem ser sempre computados quando da determinação das células hormônio-dependentes.

11 — Uma vez que a fase folicular inicial apresentou o comportamento mais homogêneo e devido ao seu menor nível de estrogênio endógeno não tender a apresentar resultados negativos, consideramos ser esta a fase ideal para a determinação dos receptores.

SUMMARY

A fluorescent cytochemical assay for the estrogen and progesterone receptors (ER, PgR) has been used to analyze the receptor content in benign human mammary lesions. The findings in fibroadenoma and fibrocystic mastopathy were similar, and showed varying degree of estrogen — and progesterone-binding capacity of the cellular cytoplasm. The relationship between menstrual cycle and receptor levels was studied, knowing exactly the day of the beginning of the last menses and the regularity of the cycle. Our results suggest that the mea-

surements in the early follicular phase, rather than in other phases, prevent the occurrence of false low ER and PgR levels. Moreover, previous oral contraceptive use was positively associated with a decreased frequency of ER and PgR levels.

UNITERMS: *benign breast pathology, estrogen and progesterone receptor, fluorescent cytochemical method, ovarian cycle, oral contraceptive*

Referências bibliográficas

1. Kastner M R Q, Schettino A M S et al: Heterogeneidade celular nos tumores malignos de mama. Implicação clínica do estudo de receptores hormonais. *Rev. Bras. Cancerol.* 1984; 30 (4): 12-16.
2. Kastner MRQ, Schettino AMS et al: Determinação de receptores hormonais em câncer de mama: Método histoquímico. *Rev. Bras. Cancerol.* 1983; 29 (3): 31-39.
3. Heuson JC, Leclercq G et al: Estrogen receptors: Prognostic significance in breast cancer. In: Estrogen receptors in human breast cancer, pp 57-72. Eds. McGuire WL, Carbone PP, Vollmer EP. Raven Press NY, 1975.
4. Johansson H, Terenius L et al: The binding of estradiol-17 B Human breast cancers and other tissues 'in vitro'. *Cancer Res.* 1970; 30: 692-698.
5. Allegra J, Lippman ME et al: Estrogen receptor values in patients with benign breast disease *Cancer.* 1979; 44: 228-231.
6. Buell RH, Tremblay G: Autoradiographic demonstration of H³-Estradiol incorporation in benign human mammary lesions. *Am J. Clin. Pathol.* 1984; 81: 30-34.
7. Jacquemier JD, Rolland PH et al: Relationships between steroid receptor and epithelial cell proliferation in benign fibrocystic disease of the breast. *Cancer* 1982; 49: 2534-2536.
8. LeClerq G, Heuson JC et al: Oestrogen receptors in breast cancer. A changing concept. *Br. Med. J.* 1975; 1: 185-189.
9. Martin PM, Kuttenn F et al: Studies on clinical hormonal and pathological correlations in breast fibroadenomas. *J. Ster. Biochem.* 1978; 9: 1251-1255.
10. Martinac P, Romic-Stojkovic R et al: Estrogen and progesterone receptors in fibrocystic breast disease *Breast. Diseases of the breast.* 1983; 9: 24-25.
11. Menendez-Botet CJ, Nisselbaum JS et al: Correlation between Estrogen Receptor Protein and CEA in normal and carcinomatous human breast tissue. *Clinic. Chem.* 1976; 22: 1366-1371.
12. Rosen PP, Menendez-Botet CJ et al: Pathological review of breast lesions analysed for ERP. *Cancer Res.* 1975; 35: 3187-3194.
13. Terenius I, Johansson H et al: Malignant and benign human mammary disease: Estrogen binding in relation to clinical data. *Cancer* 1974; 33: 1364-1368.
14. Meyer JS, Stevens SC et al: Estrogen receptor assay of mammary carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 1979; 72: 564-570.