

Determinação de Receptores Hormonais em Câncer de Mama: Método Histoquímico

M.R.Q. KASTNER

Doutor em Ciências da Saúde. Pesquisador do Ministério da Saúde (INCA). Bolsista Pesquisador do CNPq.

A.M.S. SCHETTINO

Médica do Setor de Pesquisa Aplicada (INCA). Ex-residente do INCA. Ex-bolsista do CNPq.

SONIA O. GUERRA

Médica endocrinologista (INCA). Certificada pelo "Board of Internal Medicine". Ex-Fellow em Endocrinologia – Universidade do Tennessee.

ONOFRE F. DE CASTRO

Chefe do Serviço de Anatomia Patológica (INCA). Professor Titular do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense.

RESUMO

Em 31 biópsias de pacientes portadores de câncer de mama foram realizados diagnóstico histopatológico e avaliação do status hormonal.

A técnica histoquímica usada para o estudo de receptores de estrogênio e progesterona (ER e PgR) em cortes criostáticos é simples e de fluorescência alternativa. Cortes adjacentes foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e laranja de acridina (AO) para diagnóstico e identificação da população celular maligna. Achados preliminares mostram: 1) dos tumores estudados, 38,7% foram positivos, 12,9% duvidosos e 48,4% negativos. 2) Maior frequência de ER e PgR foi encontrada nas pacientes pós-menopáusicas. 3) O carcinoma lobular infiltrante apresentou elevada positividade para ER e PgR. 4) Valores baixos de ER e PgR foram encontrados em tumores com infiltrado linfocitário intenso. 5) A população heterogênea que forma os tumores malignos de mama está constituída por células ER e PgR positivas e negativas em diversas proporções. Os autores também relatam observações sobre a presença de receptores nucleares e dados morfológicos.

INTRODUÇÃO

O conhecimento clínico da dependência de determinadas neoplasias de mama ao sistema endócrino data de mais de um século, e permitiu o desenvolvimento da terapia hormonal ablativa e aditiva no câncer de mama. Vários critérios foram utilizados, objetivando selecionar as pacientes sensíveis a estes tratamentos. Em meados da década de 60, surgiram os primeiros relatos sobre a presença de receptores hormonais em tecido tumoral mamário³, posteriormente correlacionados com a resposta clínica ao tratamento hormonal^{4, 13}. Dada a importância dessas observações e existindo uma concordância básica de que os tumores receptor-negativos têm pouca ou nenhuma possibilidade de regressão pela terapia endócrina, procurou-se estabelecer normas que pudessem ser eventualmente utilizadas como

* Trabalho realizado no Setor de Pesquisa Aplicada, Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Nacional de Câncer – M.S.

Recebido para publicação em novembro de 1982

indicadores quantitativos ou qualitativos da sensibilidade ao tratamento hormonal.

No momento, os diversos métodos que visam o estudo da presença de receptores do estrogênio e progesterona, em amostras adequadas de tecido tumoral, podem ser caracterizados como: bioquímicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos^{5,8,14,16,17,19,20,21}.

Todavia, neste trabalho, vamos analisar somente o método histoquímico; daremos algumas informações que julgamos interessantes sobre o padrão histológico do tumor, numa amostra de pacientes com neoplasia mamária maligna.

MATERIAL E MÉTODOS

De biópsias de tumores mamaríais, enviadas à Anatomia Patológica para diagnóstico histopatológico, foram obtidos cortes criostáticos com 5-6 μ de espessura.

Em 31 casos de carcinomas, realizamos colorações por hematoxilina-eosina (HE), laranja de acridina (AO) e para receptores hormonais pela técnica histoquímica de Lee⁸.

Estudo dos receptores de estrogênio e progesterona (ER e PgR)

As lâminas secas a 4°C por uma hora, foram reidratadas com albumina bovina a 2% em PBS pH 7,4, e incubadas em câmara úmida por duas horas com o reagente conjugado (17 β estradiol marcado com fluoresceína e 11 α hidroxiprogesterona marcada com rodamina). Após duas imersões de 30 minutos em PBS pH 7,4, foram drenadas e montadas em glicerina tamponada.

Para a leitura utilizou-se microscópio de fluorescência por epiiluminação, equipado com lâmpada de mercúrio e filtros de excitação e barreira para fluoresceína e rodamina.

Um exame comparativo entre as três colorações acima citadas foi realizado de forma independente por dois ou três dos autores. A utilização de HE e de AO serviu para avaliar a população de células malignas e a presença de ductos normais e hiperplásicos.

As células epiteliais dos ductos benignos, por serem receptor-positivas e apresentarem uma fluorescência intensa, foram escolhidas como elementos comparativos para a formação de uma graduação de intensidade. De acordo com este parâmetro, as células neoplásicas com fluorescência maior (3 - 4+) ou menor (1 - 2+) que a dos ductos foram consideradas receptor-positivas ou negativas, respectivamente. Assim, os receptores foram estudados quanto à intensidade de fluorescência em quatro graus (análise qualitativa) e quanto ao percentual de células malignas fluorescentes encontradas nos diversos campos (análise quantitativa).

Quando à fluorescência citoplasmática é de 3+ ou 4+ em 60-100% da população de células malignas, interpretamos os tumores como receptor-positivos. Para intensidade idêntica, porém em apenas 40-60%, como tumores receptor-duvidosos. Os demais casos foram considerados como receptor-negativos.

Em 20 dos 31 casos foi pesquisada a presença e distribuição de receptor intranuclear. Só foram considerados como positivos os núcleos que apresentavam fluorescência homogênea; quando salpicada ou limitada à carioteca foram considerados negativos.

Estudo histopatológico

Neste estudo preliminar avaliaremos algumas características histopatológicas, que participam da composição tumoral ou se correlacionem com seu comportamento biológico. As-

sim, além do diagnóstico do tipo histológico, analisamos o aspecto proliferativo, a celularidade e o infiltrado inflamatório.

Os diversos aspectos proliferativos (sólido, tubular, papilar etc.) foram subdivididos em componente intraductal, quando não exibia infiltração ou esta era mínima, e em componente infiltrativo, quando a infiltração era franca.

A celularidade foi considerada como a densidade de células malignas, ou seja, a área ocupada pelo tumor em relação ao total do corte histológico examinado, excetuando pele e tecido adiposo.

O infiltrado linfocitário e plasmocitário foi estudado de forma semi-quantitativa como fraco/moderado (1-2+) e proeminente (3-4+).

Estudamos ainda o tipo e intensidade do estroma, o grau nuclear e histológico, a invasão vascular, linfática e perineural, que serão descritos em outro trabalho.

RESULTADOS

Das 31 pacientes portadoras de carcinoma mamário, foi demonstrada a positividade para receptores hormonais em cerca de 38,7% (Tabela 1).

Em relação à faixa etária das pacientes, obtivemos um percentual maior de positividade entre 50-69 anos (Tabela 2) e nas pacientes pós-menopáusicas (Tabela 3).

Em relação aos padrões de proliferação tumoral, quando intraductal de aspecto sólido, a fluorescência, se presente, foi de pequena intensidade (1-2+); mas caso exibissem lumens ou esboços destes (Figuras 1 e 2), as células que os revestiam geralmente foram de grande intensidade fluorescente (3-4+). Ademais, observamos que quanto menos denso o aspecto intraductal, e quanto maior o número de cavidade, maior a uniformidade de

TABELA 1

Carcinoma de mama. Diagnóstico. Idade. Estudo de ER e PgR citoplasmático e nuclear

Nº Casos	Iniciais	Idade	Diagnóstico	Citoplasma				Resultados	Núcleo	
				ER%		PgR%			ER %	PgR %
				+ / +++	+++ / +++++	+ / ++	+++ / +++++			
1	EM	64	CDI	.	50	.	.	± /		
2	AP	36	CDI	10	.	.	.	- /		
3	HCA	59	CDI	12	20	12	20	- / -		
4	GAOM	42	CLI	5	.	10	.	- / -		
5	EFL	66	CLI	.	100	.	100	+ / +		
6	IAA	83	CDI	20	35	20	35	- / -		
7	JAG	64	CDI	10	80	10	80	+ / +		
8	DSO	60	CDI	10	90	10	90	+ / +		
9	LGG	72	CDI	10	.	10	.	- / -		
10	LM	41	CDI	10	.	10	.	- / -		
11	RLS	36	CDI	55	40	65	35	± / -		
12	DLP	63	CLI	25	75	20	80	+ / +	3	5
13	LRM	52	CDI	70	30	55	35	- / -	5	5
14	HN	52	CDI	20	70	.	70	+ / +	.	.
15	RS	45	CDI	30	70	30	65	+ / +	.	.
16	AGB	38	CLI	15	80	13	85	+ / +	5	8
17	MMF	43	CDI	20	80	17	83	+ / +	0,5	1
18	EC	48	CLI	.	3	.	5	- / -	.	.
19	CFF	71	CDI	85	15	75	25	- / -	0,1	0,3
20	JAS	58	CDI	20	80	10	90	+ / +	10	15
21	LML	60	CDI	30	70	30	70	+ / +	.	.
22	MLFS	67	CDI	20	20	80	20	- / -	.	.
23	CFL	60	CDI	5	.	5	.	- / -	.	.
24	AS	70	CDI	60	40	55	45	± / ±	10	15
25	LMC	71	CDI	10	3	10	6	- / -	.	.
26	OSR	57	CDI	40	50	50	55	± / ±	15	20
27	LRC	46	CDI	20	.	30	.	- / -	.	.
28	MJDL	60	CDI	50	10	60	15	- / -	.	0,5
29	HAC	56	CDI	15	2	15	5	+ / +	1	2,5
30	OMS	69	CDI	10	90	5	95	+ / +	1	2
31	LRSB	56	CDI	25	65	15	80	+ / +	0,2	0,5

CDI - carcinoma ductal infiltrante.
CLI - carcinoma lobular infiltrante.

TABELA 2

Carcinoma de mama. Distribuição de receptores hormonais por idade.

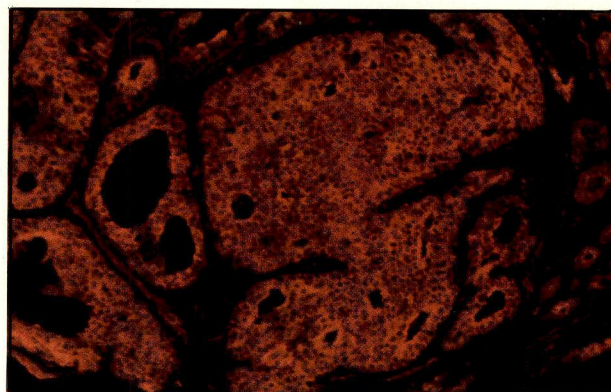
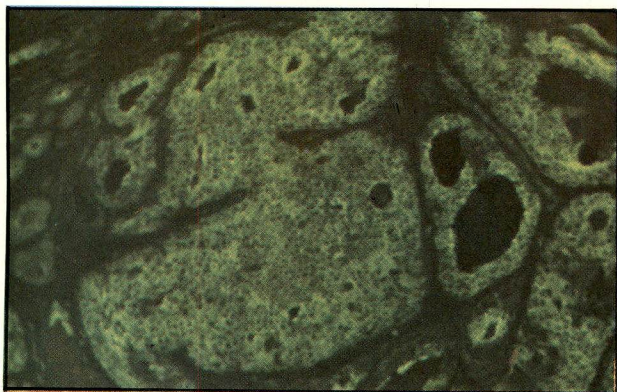
Idade	Positivos	Duvidosos	Negativos
40	1/3	1/3	1/3
40-49	2/6	0/6	4/6
50-59	3/7	1/7	3/7
60-69	6/10	1/10	3/10
70	0/5	1/5	4/5
	12/31	4/31	15/31

TABELA 3

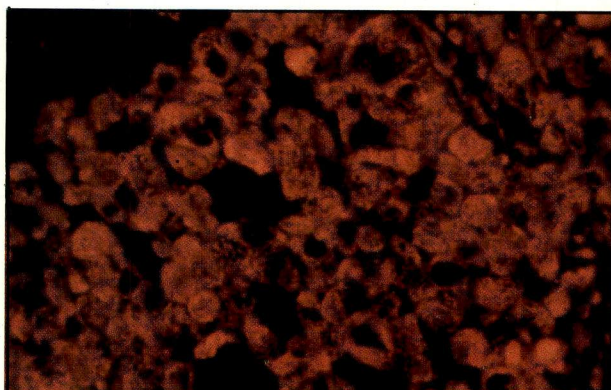
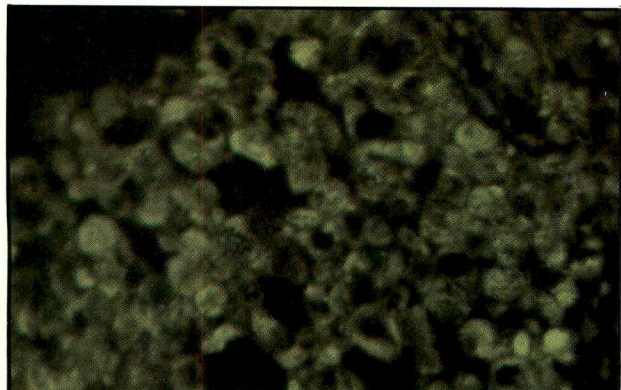
Carcinoma de mama. Distribuição de receptores hormonais em relação a pré e pós-menopausa.

	Positivos	Duvidosos	Negativos
Pré-menopausa	3/9	1/4	5/9
Pós-menopausa	9/22	3/22	10/22
	12/31	4/31	15/31

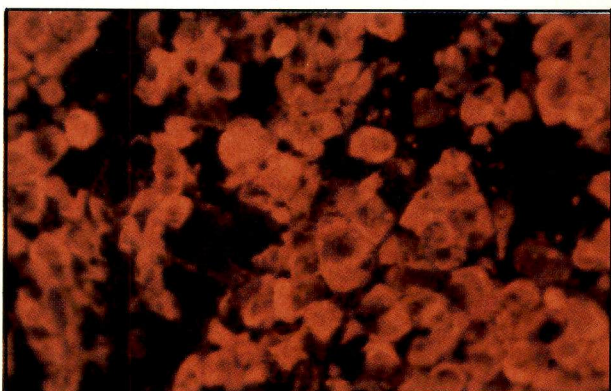
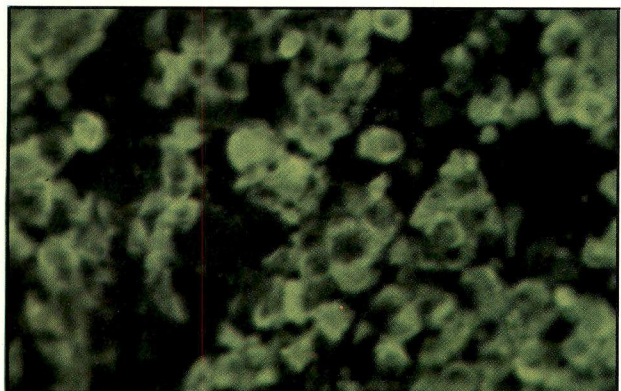
Todas as figuras de (1 a 8) mostram, a fluorescência do ER (em verde) e do PgR (em vermelho).



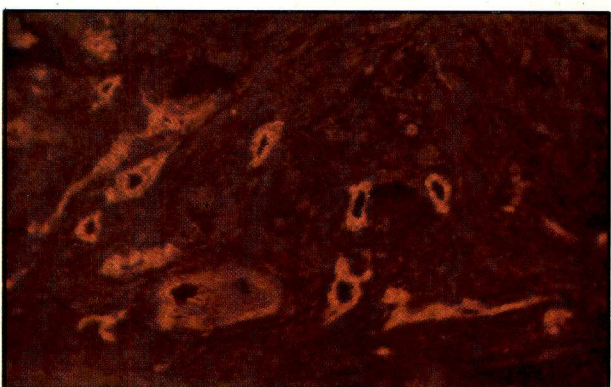
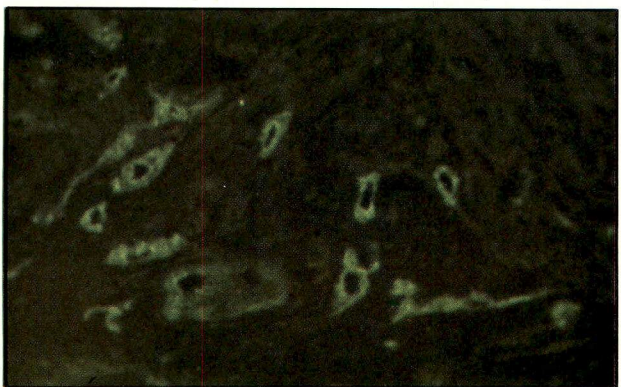
Figuras 1 e 2 – ER e PgR em área de proliferação intraductal de aspecto sólido exibindo esboço de lumens. Fluorescência de 1-4+. Obx10 Ocx10.



Figuras 3 e 4 – ER e PgR em área infiltrativa de grandes grupamentos. Fluorescência de 1-4+. Obx40 Ocx10.



Figuras 5 e 6 – ER e PgR em área infiltrativa de pequenos grupamentos. Fluorescência uniforme. Obx40 e Ocx10.



Figuras 7 e 8 – ER e PgR em túbulos simples. Fluorescência uniforme. Obx10 Ocx10.

intensidade fluorescente no mesmo componente, podendo no entanto, variar de 0-4+ de um para outro.

O componente infiltrativo, quando sólido, apresentou variação dependente do tamanho do grupamento celular. Assim, os maiores tenderam a exibir fluorescência desigual, qualitativa (1-4+) e quantitativamente (%) (Figuras 3 e 4). Os pequenos grupamentos (Figuras 5 e 6), o aspecto em fileira ou cordão e de túbulos simples (Figuras 7 e 8) tenderam à fluorescência uniforme, ou eram de fraca intensidade (1-2+) ou de grande intensidade (3-4+).

O estudo da celularidade (Tabela 4) demonstrou que os fragmentos pouco celulares (> 30%) foram negativos em um maior número de casos, aproximadamente 62%. Os mais celulares e de celularidade média tenderam a uma distribuição mais eqüitativa entre negativos e positivos, mas nestes ocorreram casos duvidosos.

Uma vez que as 31 pacientes estudadas foram tratadas por diversas modalidades terapêuticas de acordo com o estadiamento da doença, não podemos concluir ainda qualquer correlação prática, dado o curto período de observação decorrido.

O infiltrado inflamatório (Tabela 5) linfocitário, quando de pouca intensidade, não pareceu afetar os resultados, o mesmo não ocorrendo quando proeminente, pois estes foram todos receptor-negativos. O infiltrado plasmocitário de fraca intensidade teve influência semelhante ao anterior; não tivemos nenhum caso em que pudesse ser considerado intenso.

DISCUSSÃO

O método histoquímico usado neste trabalho para a determinação dos receptores de estrogênio e progesterona em cortes criostáticos foi descrito

por Lee⁸. Trata-se de técnica que pode ser feita em amostras muito pequenas e sem aparelhagem sofisticada. A conjugação de dois fluorocromos permite observar as mesmas células para os dois tipos de receptores, com uma simples mudança de filtros no microscópio de fluorescência.

O parâmetro aplicado para o conceito de tumor positivo ou negativo passa a depender da percentagem de células receptor-positivas. Assim, segundo Lee, quando um tumor apresentar um percentual de 50-100% de células neoplásicas com fluorescência 3+ ou 4+, será considerado tumor receptor-positivo e, quando o percentual for menor de 50% tumor receptor-negativo. Logicamente admite-se a existência dos casos limítrofes (40-60%) que devem ser minuciosamente avaliados.

Nós adotamos o mesmo critério, porém preferimos considerar como duvidosos os casos limítrofes, até que maior casuística com a devida correlação clínica possa esclarecer o seu comportamento. Assim, de um total de 31 pacientes com patologia maligna de mama, observamos que somente 38,7% apresentavam positividade para receptores, porém se incluirmos aqui também os considerados como duvidosos, a nossa percentagem passa a ser de 51,5%, o que coincide com a referida pela maioria dos autores.

A variação de intensidade de fluorescência demonstra a heterogeneidade da população celular maligna, o que já foi demonstrado por Rosen²². Portanto, num mesmo tumor podem existir células cancerosas hormoniodependentes e não dependentes¹⁵. Deriva daí a importância da celularidade do tumor. E como verificamos, tumores com celularidade > 30% apresentaram um maior índice de negatividade, o que pode apenas significar

que a amostra foi pouco representativa.

Algumas publicações da literatura médica refletem a preocupação sobre a correlação entre os métodos bioquímicos utilizados há muitos anos assim como entre estes e os histoquímicos, que são de aplicação mais recente. O trabalho de King e col.⁶ assinala que uma mesma amostra quando analisada bioquimicamente usando pequenas variações metodológicas, pode dar resultados diferentes. Pank e col.¹⁸ realizaram estudo comparativo entre o método de Lee (usando uma modificação quanto ao critério de interpretação dos receptores), e o método bioquímico por gradiente de sacarose (também ligeiramente modificado), e concluem que, somente em 53,1% dos casos, existe uma concordância de resultados entre ambos. Entretanto, Pertschuk²¹, no seu estudo comparativo entre o imuno-histoquímico e o bioquímico DCD em 101 pacientes, assinala uma concordância de 92%. A nosso ver, somente maior casuística devidamente avaliada clinicamente esclarecerá estas divergências, pois se existe dificuldade na obtenção de resultados idênticos pelos diversos métodos bioquímicos, esta torna-se crucial quando se trata de duas metodologias — bioquímica e histoquímica — totalmente diferentes.

Quando analisamos a incidência de receptores hormonais em relação à idade e ao *status* hormonal, encontramos uma incidência maior de tumores receptor-negativos em pacientes pré-menopáusicas, o que coincide com os dados apresentados pela maioria dos autores. Para alguns, isto se deve à presença de uma maior concentração de estrogênio endógeno, que unindo-se ao receptor interferiria nos resultados, uma vez que o método se baseia na determinação dos receptores não ocupados.

Por outro lado, a maior po-

TABELA 4

Carcinoma da mama (ER 31 casos; PgR 29 casos) Celularidade tumoral na distribuição dos receptores hormonais.

ER	Celularidade			PgR	Celularidade		
	30%	30-69%	70-100%		30%	30-69%	70-100%
+	6/16	4/11	2/4	+	6/16	4/9	2/4
+/-	.	3/11	1/4	+/-	.	2/9	.
-	10/16	4/11	1/4	-	10/16	3/9	2/4

TABELA 5

Carcinoma de mama. Intensidade do infiltrado linfocitário na distribuição dos receptores hormonais.

ER	disc./mod.	acentuado	PgR	disc./mod.	acentuado
	(1-2+)	(3-4+)		(1-2+)	(3-4+)
+	12/31	.	+	12/29	.
+/-	4/31	.	+/-	2/29	.
-	12/31	3/31	-	12/29	3/29

sitividade de receptores encontrada nas pacientes maiores de 50 anos com tumor primitivo de mama seria resultante do *status* menopáusicos com sua conseqüente diminuição de hormônios endógenos, e não a idade das pacientes²².

Todavia as pacientes jovens tendem a apresentar tumores mais indiferenciados histológica e clinicamente²², com uma velocidade de duplicação grande, demonstrando que, embora derivados de epitélios que mantêm por vezes algumas funções normais, constituem formas mais malignas e de evolução mais rápida. Posto o problema nestes termos, se compreende a conclusão a que chegaram alguns autores^{1, 12, 22, 24} de que o *status* hormonal estaria relacionado com o grau histológico do tumor, sendo portanto a maioria dos tumores bem diferenciados os receptor-positivos e a maioria dos indiferenciados os receptor-negativos. Para Sugano²³ não existe correlação significativa entre a presença de receptores e os fa-

tores histológicos de significado prognóstico (tamanho do tumor, grau nuclear etc.). Já para Rosen²², a distribuição variável do receptor estaria nos tumores de mama, de algum modo correlacionado com fatores morfológicos de valor prognóstico. Nossos dados a este respeito ainda não são suficientes para nos posicionar com qualquer dos autores.

De um modo geral, existe, para a maioria dos pesquisadores, uma relação entre a presença de receptor e a histopatologia do tumor mamário. Assim, a maior freqüência de tumores receptor-positivos é encontrada nos casos de carcinoma lobular invasivo; a menor, nos de tipo ductal e pouco freqüente nos tumores com reação local linfocitária grande. Fazem exceção, entretanto, a esta regra o carcinoma medular, que é receptor-positivo, apesar de seu infiltrado linfocitário ser intenso²³. Nossa casuística é de cinco lobulares, sendo três positivos; 26 ductais sendo nove positivos, qua-

tro duvidosos e 13 negativos; em apenas três casos tivemos reação linfocitária intensa, sendo todos eles receptor-negativos, o que está em concordância com a literatura.

Em relação aos padrões proliferativos malignos, Lee⁷, ao analisar o componente intraductal, assinala a perda da capacidade deste para sintetizar receptor estrogênico, mantido apenas no epitélio hiperplásico benigno remanescente nestas áreas, à semelhança de lesões benignas hiperplásicas e papilares. Assim, esta perda seria o fenômeno que demarcaria a transformação em células malignas. O aspecto infiltrativo representaria o retorno da capacidade de síntese, mas de forma autônoma patológica, demonstrado pelo fato deste tipo de componente tender a ser sempre positivo.

Nossos casos demonstraram componente intraductal não fluorescente ou com células esparsas de intensidade 1-2+ (receptor-negativas), quando de aspecto sólido; tendem a intensidade 3-4+ (receptor-positivas), nas células que revestem lumens ou esboço destes; foi variável nos componentes intraductais de aspecto menos denso, tendendo a maior intensidade e maior percentagem de células positivas, quanto maior o número de lumens existentes. Mas, como não representam epitélio benigno remanescente, talvez a positividade esteja ligada a maior diferenciação funcional destas células de revestimento. Assim é que também o componente infiltrativo apresentou maior uniformidade de intensidade, quase sempre 3-4+ (receptor-positivas), quando de aspecto tubular simples ou exibia numerosas cavidades. O aspecto infiltrativo sólido demonstra ampla variação, parecendo por vezes haver uma certa correspondência entre este e o componente intraductal de aspecto sólido, sendo que estes tendem a maior negatividade.

A presença de receptores intranucleares é também um assunto muito discutido. Em nosso material evidenciamos em três casos a presença destes em concentrações relativamente altas, embora menores que no citoplasma; mas, na maioria dos casos, só foi detectado em 0-1% das células neoplásicas. Para alguns autores, a sua presença no núcleo representaria um artefato de transferência histoquímica do receptor citoplasmático para o núcleo. Para outros^{2,9} indicaria uma funcionalidade do próprio receptor, ou seja, que este teve a possibilidade de unir-se especificamente com o estrogênio, ser transferido para o núcleo na forma biologicamente ativa, a qual atuando no *locus* do gene da cromatina efetuará a sua função. Finalmente, para outros, representaria uma retenção do receptor por parte do núcleo, portanto com retorno mais lento ao citoplasma.

Quando estas controvérsias estiverem esclarecidas, e, caso se comprove que o receptor nuclear representa uma alteração específica *in situ*⁹, possivelmente a presença ou ausência de receptor nuclear poderá auxiliar na análise dos casos.

Finalmente é importante assinalar que são numerosos os autores que coincidem em reconhecer o efeito benéfico da hormonioterapia em pacientes receptor-positivos. Todavia, o grupo por nós estudado, por estar formado de pacientes com tumores em diversos estádios e recebendo tratamento preferencial muito variado, ainda não permite concluir qualquer correlação prática após poucos meses de seguimento.

Agradecimento

Agradecemos ao Sr. Aloisio Vargas de Alencar, responsável pela parte técnica deste trabalho e a Thereza Leone secretária de nosso Serviço, a colaboração prestada.

SUMMARY

An evaluation of hormone receptors in breast cancer-histochemical method.

Samples from 31 malignant human breast biopsies were examined to assess the hormonal status in conjunction with the pathologic diagnosis.

This histochemical method has allowed the study of estrogen and progesterone receptors (ER, PgR) on frozen sections by a very simple alternative fluorescent method. Consecutive adjacent sections were stained with hematoxylin eosin (HE) and acridine orange (AO) for identification of the malignant cell population and pathologic diagnosis.

Our preliminary findings indicate: 1) Of the malignant tumors, 38,7% were interpreted as positive, 12,9% negative and 48,4% doubtful. 2) The frequency of ER and PgR was higher in postmenopausal women. 3) The infiltrating lobular carcinoma revealed high frequency of positive hormonal receptors. 4) Tumors with a prominent lymphocyte infiltration showed low frequency of ER and PgR. 5) The breast cancers were composed of heterogeneous cell populations with ER positive and ER negative in different proportions.

The authors also related observations on morphological changes and the presence of intranuclear hormone receptors.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOOM, H.J.G.; RICHARDSON, W.W. — Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 11: 359-377, 1957.
- CHAN, L.; O'MALLEY, B.M. — Mechanism of action of the sex steroid hormones. *N. Engl. J. Med.*, 294: 1322, 1976.
- JENSEN, E.V.; BLOCK, G.E.; SMITH, S.; KYSER, K.; DE SOMBRE, E.R. — Estrogen receptors and breast cancer responses to adrenal ectomy. *Natl. Cancer Inst., Monograph* 34: 55-70, 1971.
- JENSEN, E.V.; DE SOMBRE, E.R.; JUNBLUT, P.W. — Estrogen receptors in hormone-responsive tissues and tumors. In: *Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance*. Ed. T.L. Wissler. Chicago, University of Chicago Press, 1967, p. 15-30.
- KASTNER, M.R.Q.; SCHETTINO, A.M.S.; PEREIRA, M.R. — *Marca-dores biológicos potenciais na avaliação do câncer de mama. Rev. Bras. de Cancerologia*.
- KING, R.J.B. — Quality control of estradiol receptor analyses. The United Kingdom experience. *Cancer*, 46: 2822-2824, 1980.
- LEE, S.H. — Cancer cell estrogen receptor of human mammary carcinoma. *Cancer*, 44: 1-12, 1979.
- LEE, S.H. — Cellular estrogen and progesterone receptors in mammary carcinoma. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 73: 323-329, 1980.
- LEE, S.H. — Cytochemical study of estrogen receptor in human mammary cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, 70: 197-203, 1978.
- LEE, S.H. — Sex steroid hormone receptors in mammary carcinoma. In: *Diagnostic Immunohistochemistry*. Ed. R.A. DeLellis. New York, Masson Monographs in Diagnostic Pathology, 2, 1981 Chapter 9: 149-164.
- LEUNG, B. — Hormonal dependency of experimental breast cancer. In: *Hormones, Receptors and Breast Cancer*. Ed. W.L. McGuire. New York, Raven Press 1978, p. 219-261.
- MAYNARD, P.V.; DAVIES, C.I.; BLAMEY, R.W.; ELSTON, C.W.; JOHNSON, J.; GRIFFITHS, K. — Relationship between oestrogen-receptor content and histological grade in human primary breast tumours. *Br. J. Cancer*, 38: 745-748, 1978.
- MCGUIRE, W.L.; CARBONE, P.P.; SEARS, M.E.; ESCHER, G.C. — Estrogen receptors in human breast cancer: an overview. In: *Estrogen Receptors in Human Breast Cancer*. Ed. W.L. McGuire. New York, Raven Press, 1978, p. 1-8.
- MERCER, W.; WAHL, T.; CARLSON, C.; TEAGUE, P. — Identification of estrogen and progesterone receptors in breast cancer cells by immunological techniques. *Feder. Proc.*, 38: 913 (nº 3610), 1979.
- NOMURA, Y.; YAMAGATA, J.; KONDO, H.; KANDA, K.; TAKE-NAKA, K. — Clinical usefulness of estrogen receptor assay in early and advanced breast cancer. In: *Hormones, Receptors, and Breast Cancer*. Ed. W.L. McGuire, New York, Raven Press, 1978, p.15-29.
- NENCI, I.; PIFFANELLI, A.; BECANTI, M.D.; LANZA, G. — In vivo and in vitro immunofluorescent approach to the physiology of estradiol kinetics in target cells. *J. Steroid Biochem.*, 7: 883-890, 1976.
- NENCI, I.; BECANTI, M.D.; PIFFANELLI, A.; LANZA, G. — Detection and dynamic localization of estradiol-receptor complexes in intact target cells by immunofluorescence techniques. *J. Steroid Biochem.*, 7: 505-510, 1976.
- PANKO, W.B.; MATTIOLI, C.A.; WHEELER, T.M. — Lack of correlation of a histochemical method for estrogen receptor analyses with the biochemical assay results. *Cancer*, 49: 2148-2152, 1982.
- RAAM, S.; NEMETH, E.; TAMURA, H.; O'BRIAN, S.; COHEN, J.L. — Immunohistochemical localization of estrogen receptors in human mammary carcinoma using antibodies to the receptor protein. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 18: 1-12, 1982.

20. PERTSCHUCK, L.P. — Detection of estrogen binding in human mammary carcinoma by immunofluorescence. A new technique utilizing the binding hormone in a polymerized state. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 14: 771-774, 1976.
21. PERTSCHUCK, L.P.; TOBIN, E.H.; BRIGATI, D.J.; GAETJENS, E. — Immunofluorescent detection of estrogen receptor in breast cancer. Comparison with dextran-coated charcoal and sucrose gradient assays. *Cancer*, 41: 907-911, 1978.
22. ROSEN, PP.; MENENDEZ-BOTET, C.J.; SENIE, R.T.; SCHWARTZ, M.K.; SCHETTENFELD, D.; FARR, G.H. — Estrogen receptor protein (ERP) and the histopathology of human mammary carcinoma. In: *Hormone, Receptors, and Breast Cancer*. Ed. W.L. McGuire. New York, Raven Press, 1978, p. 71-83.
23. SUGANO, H.; SAKAMOTO, G.; NOMURA, Y.; TAKATANI, O.; MATSUMOTO, K. — Hormone receptors and histopathology in Japanese breast cancer. In: *Hormones, Receptors, and Breast Cancer*. Ed. W.L. McGuire. New York, Raven Press, 1978, p. 59-70.
24. WOLFF, B. — Histological grading in carcinoma of breast. *Br. J. Cancer*, 20: 36-45, 1972.