

Problemática actual de la determinación de receptores hormonales - Procedimientos alternativos

F. Rivera Fillat*,
M. Prats Esteve**,
A. Palacín Forgue***,
M.G. Villegas Figueroa**,
L. Sánchez Bogajo*,
M.P. Pérez***

* Servicio de Hormonología,
Hospital Clínic.

** Unidad de patología Mamaria,
Subdivisión de Cirugía Hospital
Clínic.

*** Servicio Anatomía Patológica,
Hospital Clínic y Q.S. Alianza.
Barcelona.

La posibilidad de determinar los receptores hormonales se considera como el mayor avance de los últimos años para el conocimiento de la biología, la orientación del pronóstico y la actitud terapéutica en el cáncer de mama. En muchos centros hospitalarios es un dato prácticamente imprescindible, hoy en día, para caracterizar con precisión una neoplasia de mama. La valoración de los receptores esteroideos ha tenido interés en el cáncer de mama tras la observación de que la presencia de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RPg) en estos tejidos constituye un medio de evaluación de la hormonodependencia.^{1,2} La posibilidad de respuesta a una terapéutica endocrina, que se sitúa en el 30 % de las pacientes con cáncer de mama no seleccionadas varía entre el 50 y 70 % en pacientes RE positivos (RE+) hasta el 0 y 10 % en los casos RE negativos (RE-).³⁻⁵ La presencia de RE en el tumor primario no sólo es predictiva de respuesta al tratamiento, sino también índice de un mejor pronóstico con más bajas tasas de recurrencia y más largos espacios libres de enfermedad.^{6,7} En el terreno de la terapéutica complementaria al tratamiento inicial, se obtiene mejoría en el pronóstico en los casos RE+ a los que se incluye hormonoterapia sola o en combinación con la quimioterapia según las circunstancias.^{8,9} La determinación conjunta de los RPg ha demostrado incrementar la posibilidad de definir mejor los grupos.^{10,11}

A pesar de su indiscutible interés y utilidad, no se asiste, por lo menos en nuestros medios, a una generalización de la determinación de receptores hormonales en neoplasias de mama como sería de esperar. Por una parte, existen aspectos técnicos que inciden de forma decisiva en la obtención de datos fiables.

La labilidad propia de las moléculas proteicas que componen los receptores hormonales condiciona que el laboratorio donde se realizan los ensayos bioquímicos deba estar adecuadamente utillado y dotado de personal técnico, el cual ha de estar altamente cualificado en el empleo de estos métodos, y no debe omitirse rigurosos controles de calidad. La selección de la muestra y su conservación inmediata son factores también decisivos en cuanto a la obtención de datos fiables. Asimismo, la valoración de los datos bioquímicos y su interpretación ha de hacerse estableciendo una correlación con datos clínicos básicos, como son sexo, estado menstrual y tratamientos previos, si queremos evitar errores y explicar posibles respuestas anómalas. La solución adoptada en otros países con la existencia de laboratorios de referencia¹² no se ha visto ampliamente secundada en nuestros medios. Aun garantizada la fiabilidad del método, persisten otros problemas como son la sensibilidad insuficiente de la técnica estándar para pequeñas muestras, la ocupación de los receptores hormonales por hormona endógena o exógena (tratamiento en curso), la ausencia de control morfológico de la repartición de los componentes celulares y tisulares, la existencia de discordancias entre la clínica y el laboratorio, que a veces hacen dudar de si verdaderamente estamos determinando siempre la hormonodependencia, etc. Esta situación propicia la aparición de nuevos métodos, unos en fase de experimentación y otros de ensayo clínico. Se pretende lograr una técnica más sencilla de realizar, más económica, de mayor fiabilidad, más sensible en caso de escasa muestra y que permita investigar la biología tumoral a través de una correlación morfofuncional con la intención de resolver los problemas que aún siguen planteados.

La finalidad de esta revisión es analizar los procedimientos alternativos utilizables hoy día y, en base a nuestra experiencia, establecer sus posibilidades e indicaciones comparándolos con el método bioquímico que actualmente se reconoce como más fiable.

METODOLOGIA

Es importante clasificar los procedimientos de análisis in vitro de los receptores hormonales. Para ello, deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos inherentes a la metodología utilizada:

I. El medio en que está ubicado el receptor, ya sea a) fragmentos celulares obtenidos tras la homogeneiza-

ción del tejido, o b) en un corte histológico o extendidos celulares.

II. El procedimiento para identificar al receptor a) basado en la alta afinidad mostrada por el receptor frente a un ligando (hormona) que nos va a permitir no sólo cuantificar aquel receptor, sino también cualificar su actividad. La demostración de uniones de alta afinidad (K_a) nos permitirá asumir que el primer eslabón, complejo receptor-esteroide, es funcionalmente activo;¹³ b) mediante anticuerpos monoclonales dirigidos frente al receptor¹⁴ que reconocen tanto el libre como el ocupado por el estradiol endógeno y, por tanto, permiten medir los receptores totales. Asimismo, nos identifican otras zonas distintas a la de unión con el esteroide, algunas muy importantes, pues ejercen funciones altamente específicas; un ejemplo lo constituye el «locus» de unión al ADN nuclear.

III. Detección indirecta de receptores identificando componentes asociados.

Según ello proponemos la siguiente clasificación (tabla I):

TABLA I
CLASIFICACION DE METODOS

I Ensayo de los receptores hormonales	
A Bioquímicos	a) Binding DCC SDG
	b) Inmunoquímicos: EIA
B Morfológicos	Binding Inmunocitoquímicos
II Ensayo de proteínas asociadas a la acción de los estrógenos	
A Bioquímicos:	Inmunoquímicos
B Morfológicos:	Inmunocitoquímicos

I. Ensayo de los receptores hormonales

A. Métodos bioquímicos

a) *Métodos de unión por afinidad específica (binding)*

El Consensus Development Conference on Steroid Receptors in Breast Cancer en 1979¹⁵ y posteriormente la EORTC en 1980¹⁶ recomendaron como procedimientos más fidedignos y reproducibles para la valoración de los RE y RPg citosólicos los métodos de sedimentación en gradiente de sacarosa (SDG) y el análisis multipuntual por

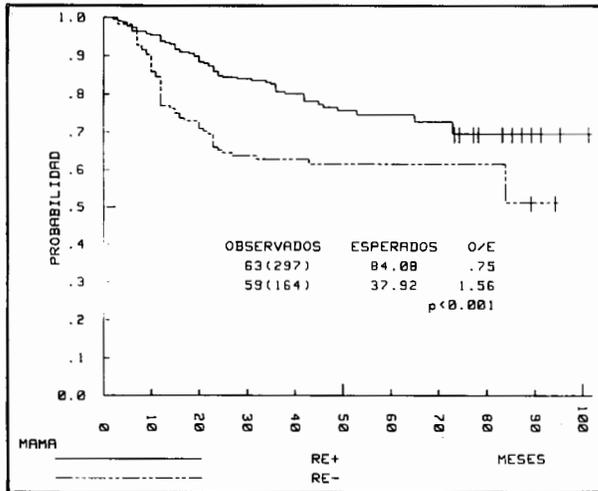


Gráfico I. Intervalo libre de enfermedad en pacientes clasificadas en RE+ y RE-. Se muestra mejor pronóstico (con significación estadística) en las enfermas RE+. El tiempo de estudio ha sido de 95 meses.

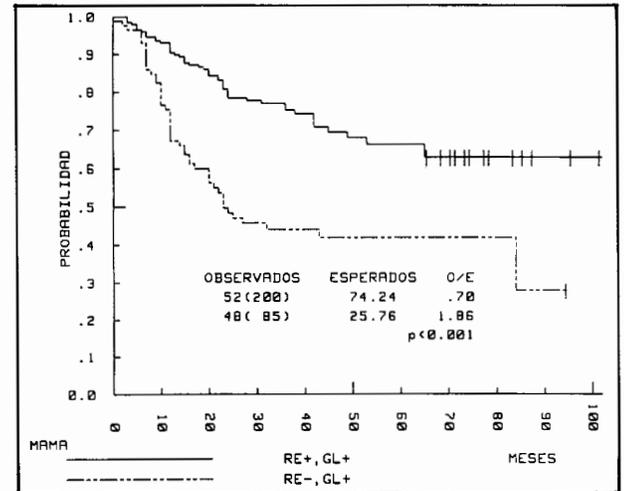


Gráfico II. La diferencia en el intervalo libre de enfermedad se hace más aparente entre RE+ y RE- cuando se estudia a las enfermas con ganglios positivos.

carbón dextrano y cuantificación por la gráfica de Scatchard (DCC). Ambos métodos cuantifican la capacidad de unión del esteroide marcado al receptor específico. El método más profusamente utilizado para ambos receptores es el DCC. La gráfica de Scatchard nos permite obtener la capacidad máxima de unión expresada en femtomoles por miligramos de proteína del citosol (fmol/mg prot), y la constante a la afinidad o su inversa, es decir, la constante de disociación que nos informa sobre la calidad del receptor. Se ha aceptado por la mayoría de los autores que menos de 3 fmol/mg prot representa una concentración de receptores corrientemente relacionada con la falta de respuesta de las pacientes con cáncer de mama a la terapéutica endocrina. El margen de valores 3-10 fmol/mg prot generalmente se acepta como «border line», pudiendo tener significado diferente en las pacientes premenopáusicas que en las postmenopáusicas. Para éstas el valor límite es de 10 en lugar de 3 fmol/mg prot. Con este método (DCC) nuestros resultados, tanto en cuanto a la distribución estadística (tabla II) como a la clínica y factor pronóstico (gráficos I y II) son comparables a los publicados por la EORTC.

b) Métodos inmunoquímicos

El método más utilizado (ER-EIA) se basa en una técnica «sandwich», con dos anticuerpos monoclonales es-

TABLA II
RE₂ CANCER DE MAMA
PREMENOPAUSIA/POSTMENOPAUSIA

	0-3	3-10	10-100	>100 fmol/mg
Pre	40 %	21 %	33 %	6 %
Post	29 %	10 %	29 %	32 %

$X^2 = 31,7 \quad p 0,001$

Distribución de los valores de RE entre pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas. El número total de enfermas ha sido de 461 (165 premenopáusicas y 296 postmenopáusicas). La determinación se ha realizado por el método DCC.

pecíficos de RE,¹⁷ que identifican dos sitios antigénicos distintos del receptor; uno está fijado a un material inerte y el otro viene marcado con peroxidasa como elemento revelador.

Al comparar esta técnica (ER-EIA) con el método de referencia (DCC) por los distintos autores^{18,19} y por nosotros mismos, se obtiene una buena correlación.

En los gráficos III y IV se muestran los valores obtenidos por ambos métodos en neoplasias mamarias humanas, tanto benignas como malignas. Como puede observarse en el margen de valores de 0 a 400 fmol/mg de proteína los datos obtenidos por ambas técnicas son similares, siendo algo mayor la dispersión en los valores > 400, en los que debe realizarse una posterior dilución de la concentración del receptor para incidir en esta zona y así poder cuantificar con mayor precisión estos casos; de todas

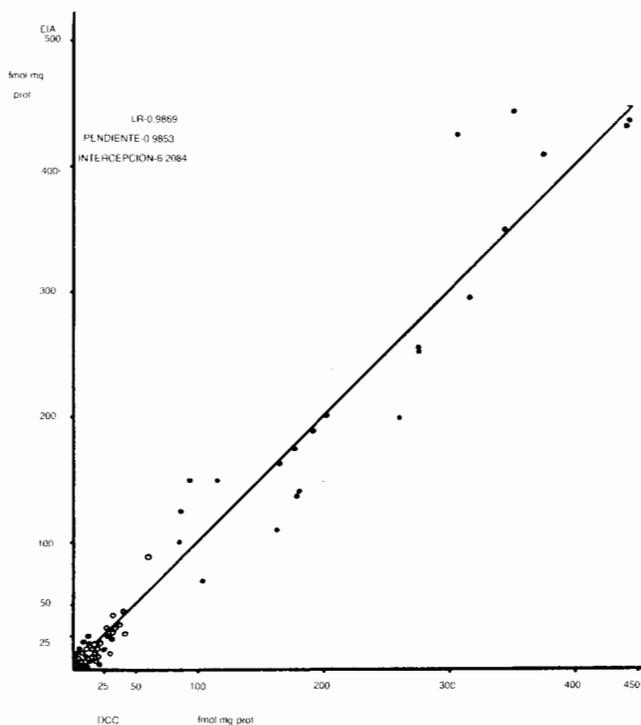


Gráfico III. Correlación entre DCC y EIA en muestras de enfermas con neoplasia mamaria (n=63); el círculo vacío corresponde a premenopáusicas (n=31) y el lleno a postmenopáusicas (n=32). El margen de los valores estudiados ha sido hasta 500 fmol/mg proteínas.

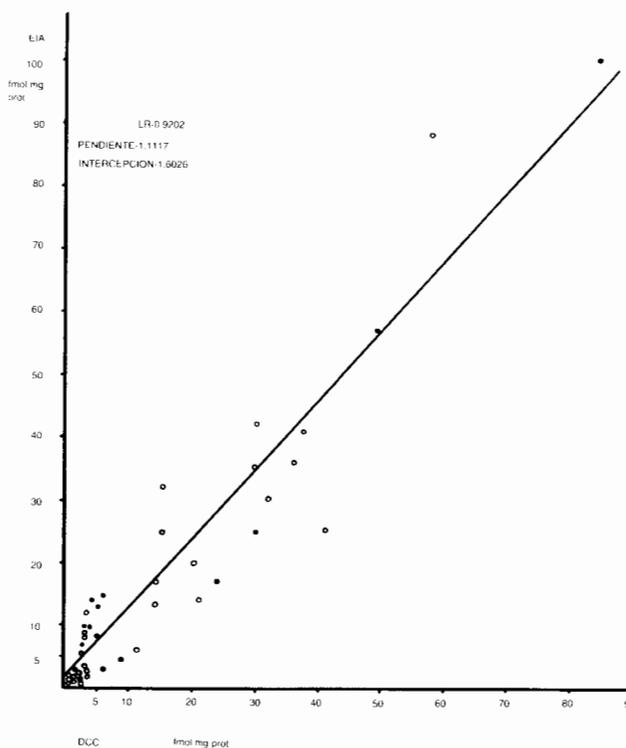


Gráfico IV. Los mismos datos del gráfico anterior estudiando especialmente los límites < 100 fmol/mg proteínas (n=44) entre premenopáusicas (n=29) y postmenopáusicas (n=15).

formas nunca la diferencia entre los valores absolutos influye sobre el significado (negativo, «border line», positivo) y el grado de éstos. Es, pues, un método útil por su precisión y reproducibilidad interlaboratorios. El peso de la muestra requerido es de alrededor 1/5 del necesario para el DCC, solventando así el problema de las muestras pequeñas. Como hemos señalado, valora los receptores totales (libres y ocupados) e incluso los unidos al antiestrógeno utilizado como tratamiento, permitiéndonos realizar estudios secuenciales postoperatoria.

A pesar del gran avance que ha supuesto el EIA, éste no soluciona todos los problemas técnicos, tales como el manejo de tejido, homogeneización, separación de las fracciones celulares, que deben seguirse haciendo de forma metódica, y tampoco permite valorar la morfología y distribución del receptor en las células tumorales.

Un problema que se ha señalado, aunque es difícil de valorar hasta nuevos estudios, es que puede detectar fragmentos de la proteína del receptor o precursores de la misma, que no poseen capacidad de unión al esteroide y

que, por tanto, serían receptores inactivos. Es imprescindible, según los actuales conocimientos, que el elemento que detecten cuente con este lugar de acción para que pueda interactuar posteriormente a nivel nuclear y así modular la síntesis proteica y la replicación celular.

B. Métodos morfológicos (figs. 1, 2 y 3).

Las técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas se han desarrollado para la identificación y ubicación de receptores esteroideos, RE y RPg, en estructuras celulares concretas. Para ello se han utilizado inicialmente cortes en congelación, aunque hoy día también pueden aplicarse, previo tratamiento enzimático, a cortes de tejido fijados adecuadamente e incluidos en parafina.

Lee y Pertschuk,^{20,21} por separado, han desarrollado técnicas en las que se utiliza un ligando, estrógeno o progestágeno marcado con un fluorocromo, fluoresceína o rodamina, interponiendo una molécula hidrófila de seroal-

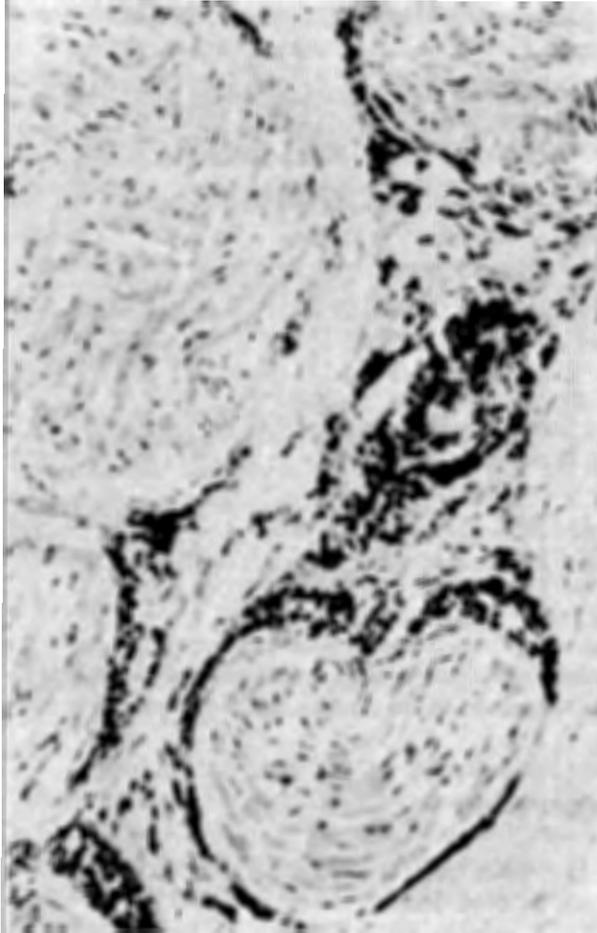


Fig. 1. Invasión perineural por carcinoma de mama. Los núcleos de las células neoplásicas aparecen más oscuros debido al depósito de sustancia coloreada que nos traduce un alto contenido de RE a nivel nuclear. ER-ICA. Revelado con DAB y tinción complementaria con hematoxilina $\times 80$.



Fig. 2. Carcinoma ductal con diferenciación tubular con alto contenido y distribución uniforme de RE en los núcleos de las células neoplásicas (ER-ICA, DAB/H $\times 80$).

búmina bovina. La observación y valoración requieren la utilización de un microscopio de epifluorescencia, localizándose los receptores fundamentalmente a nivel citoplásmico. Los RE identificados por estos procedimientos muy posiblemente son receptores de tipo II, de baja afinidad y localización citoplásmica, lo cual podría explicar las discrepancias señaladas entre los resultados obtenidos por estas técnicas y los aportados por los procedimientos bioquímicos que identifican receptores de tipo I, caracterizados por su alta afinidad.

A diferencia de estos métodos citoquímicos, macromoleculares, en los que se utiliza el complejo hormona esteroidea-BSA-marcador, se han descrito otros en que se

aplican complejos micromoleculares, de menor tamaño que los anteriores, caracterizándose además por una mayor especificidad y afinidad por los receptores. Entre ellos, aparte los constituidos por un fluorocromo unido directamente a la molécula esteroidea, destacan los fitoestrógenos y los antiestrógenos, con fluorescencia propia, como el tamoxifeno.

Muy recientemente se han desarrollado anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la molécula de RE, por lo que mediante una simple técnica inmunocitoquímica, tipo PAP o avidina-biotina-PR, podemos identificar aquellas células positivas para RE, manifestándose exclusivamente a nivel nuclear.

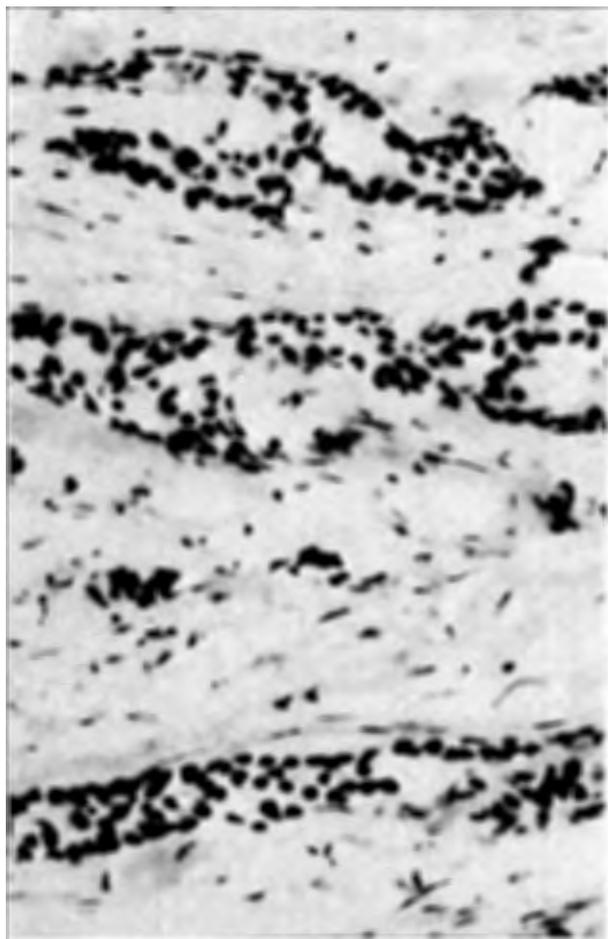


Fig. 3. Carcinoma ductal infiltrante en el que se observa un contenido heterogéneo de RE en el núcleo de células neoplásicas (ER-ICA, DAB/H \times 80).

II. Ensayo de otras proteínas relacionadas con la acción de los estrógenos

Para estudiar la hormonodependencia se han determinado marcadores relacionados con la acción de los estrógenos sobre la célula diana, sin medir su receptor, sino los productos de pasos intermedios o finales de su acción celular.

Mc Guire et al en 1977²² propusieron el RPg como el mejor parámetro para medir la respuesta a los estrógenos, y éste se ha utilizado ampliamente, conjuntamente con el RE, para la monitorización del cáncer de mama (dada su importancia no entraremos aquí en su estudio, dejándolo para una posterior revisión más amplia).

Diversos autores han valorado la actividad de enzimas reguladas por los estrógenos (isoenzima 5-LDH, peroxidasas, ADN polimerasa, timidina cinasa, activados de plasminógeno, ornitina carboxilasa, isoenzimas de la creatina cinasa) como marcadores de su actividad, pero su determinación no tiene aplicación actual en los tumores de mama.

Otras proteínas inducidas han sido descritas por Edwards y Mc Guire,²³ y Westley y Rochefort,²⁴ y pueden tener aplicación clínica; mencionaremos especialmente la proteína 52K, puesta en evidencia por Rochefort, cuya síntesis es estimulada por los estrógenos en células que contienen RE positivo e inhibida por los antiestrógenos; su presencia en células RE negativas, aunque no inducible por los estrógenos, hace difícil utilizarla como marcador de hormonodependencia, pero sí es útil para controlar la respuesta al tratamiento en unión RE+.

Recientemente King²⁵ ha obtenido un anticuerpo contra un componente del citosol D₅ relacionado con los RE del miometrio humano. En estudios previos se encuentra una correlación significativa entre el valor de D₅ y la tasa de RE en tumores de mama. Hasta este momento no se conocen datos sobre la regulación hormonal de antígeno D₅, por lo que su utilidad práctica queda por establecer.

DISCUSION

La revisión que hemos efectuado de los diversos métodos de determinación in vitro de los receptores hormonales, junto con nuestra experiencia, nos permite contestar una serie de preguntas que se pueden plantear en la práctica:

¿Qué métodos alternativos pueden darnos unos resultados comparables con el método estándar (DCC)?

Como ya hemos expuesto, el método inmunoenzimático (EIA) proporciona unos resultados superponibles al DCC. Creemos que ambos pueden ser utilizados para fines clínicos con unos márgenes de fiabilidad comprobados, a pesar de que ambos tienen algunos pros y contras.

Debemos hacer notar que tanto uno como otro, para que sean fiables, deben ser realizados por personal técnico especialmente capacitado y en laboratorios debidamente utilizados. En principio desaconsejamos aquellos procedimientos que parezcan más sencillos por requerir

menos utillaje, especialmente cuando se utilizan desconociendo aspectos teóricos y prácticos fundamentales.

¿Qué técnica puede darnos mejor rendimiento ante un tumor de pequeño tamaño o cuando las células neoplásicas se hallan en escasa proporción, como puede ser la linfangitis carcinomatosa?

La información más completa, pues permite una valoración semicuantitativa de la heterogeneidad celular, en cuanto a contenido en RE, es sin duda la inmunocitoquímica, siempre y cuando la muestra sea representativa del tumor, por lo que debe realizarse previamente una valoración citohistológica. También es necesaria información sobre la proporción de células neoplásicas y su distribución en el tejido para las otras técnicas recomendadas, en las que, al ser la muestra más exigua, deben establecerse unos parámetros de valoración más rigurosos, para no obtener resultados erróneos.

¿Qué resultados pueden obtenerse a partir de una citopunción?

La citopunción por aspiración con aguja fina es un método utilizado con frecuencia para obtener muestras, para el diagnóstico citológico de las neoplasias de mama.²⁰ La utilización de estas muestras para la determinación de receptores de esteroides puede ofrecernos la posibilidad de su valoración cuando la terapia no comporta cirugía, evitándose así la obtención traumática de la muestra, posibilitando repeticiones en el curso del tratamiento farmacológico o radiológico.²¹

La aplicación de las técnicas inmunocitológicas abre aquí un camino para obtener una información cualitativa y semicuantitativa de los RE, ya que la aplicación de los métodos DCC e incluso EIA supone, por una parte, que el número de células sea importante y, por otra, que estén libres de contaminación plasmática. Esta última nos obligaría a referir los valores de RE a la concentración de ADN, que complica todavía más la técnica.

Nosotros estamos realizando un estudio comparativo entre los resultados obtenidos por citopunción y los de la biopsia posterior, para valorar el método y la representatividad de la muestra.

¿En qué situaciones los métodos alternativos pueden representar una ventaja en la práctica?

Aceptada la utilidad de determinar los receptores hormonales en todos los momentos y situaciones de la enfermedad neoplásica, en la práctica existen limitaciones que derivan, por una parte, de la complejidad del método estándar, y, por otra, de la cantidad de muestra necesaria, que presupone la presencia de una determinada cantidad de tumor y una intervención quirúrgica para obtenerlo.

Si bien es deseable que se extienda la posibilidad de determinar la hormonodependencia, ya hemos visto las condiciones necesarias para que el empleo de los métodos alternativos pueda sustituir con garantía la determinación considerada como tipo. Independientemente, y aun con la posibilidad de poder disponer de todos los métodos, existen para nosotros unas indicaciones específicas para los métodos alternativos en las siguientes circunstancias:

— En tumores de muy pequeño tamaño o en formas difusas como el carcinoma in situ con áreas microinfiltrantes, en linfangitis neoplásica, en micrometástasis, y en general en aquellas circunstancias en que existe poca representación tumoral macroscópica o ésta es difícil de precisar. Aquí, especialmente los métodos morfológicos pueden dar resultados más fiables al poder demostrar que verdaderamente estamos haciendo la determinación en las células que nos interesan.

— En tumores localmente avanzados a veces es necesario indicar una intervención quirúrgica cuya única finalidad es obtener mediante una biopsia incisional una cantidad de tejido para determinar receptores. Aquí, los métodos alternativos pueden ahorrar esta intervención no siempre inocua y permiten con mayor facilidad dirigir el estudio a diversas áreas representativas y repetir la determinación cuando se crea oportuno para constatar las variaciones durante el tratamiento, etc.

— En tumores sin indicación quirúrgica de entrada, en que se efectúen tratamientos preoperatorios como radioterapia, quimioterapia neoadyuvante, etc. Si bien, cuando se intervengan, podremos obtener muestra suficiente. La determinación antes de iniciar el tratamiento obviará los cambios en las tasas de receptores que, como es conocido, inducen estas terapéuticas.

— En las metástasis, especialmente las de difícil acceso, tanto si se conoce el valor de los receptores en el tumor primario, como si este dato es desconocido, como ocurre con frecuencia. La posibilidad de cuantificar y cualificar los receptores en una muestra obtenida por punción o incluso en el centrifugado de un líquido permite disponer de este dato en condiciones en que hasta ahora no se justificaba por tener que indicar una intervención.

REFERENCIAS

1. McGuire WL, Carbone PP, Vollmer EP (eds). Estrogen receptors in human Breast Cancer. Raven. New York 1985.
2. Leclercq G, Toma S, Paridaens R, Heuson JC (eds). Clinical interest of steroid hormone receptors in Breast Cancer. Springer-Verlag. Berlin 1984.
3. Allegra Jc, Lippman ME et al. Estrogen receptor status: an important variable in predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 1980; 16: 323-331.
4. Skinner LG, Barnes DM, Ribeiro GG. The clinical value of multiple steroid receptor assays in breast cancer management. *Cancer* 1980; 46: 2939-2945.
5. Paridaens R, Sylvester RJ et al. Clinical significance of the quantitative assessment of estrogen receptors in advanced breast cancer. *Cancer* 1980; 46: 2889-2895.
6. Knight WA, Livingstone RB, Gregory EJ, McGuire WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977; 37: 4669-4671.
7. Cooke T, George D, Shields R, Maynard P, Griffiths K. Oestrogen receptors and prognosis in early breast cancer. *Lancet* 1979; 1: 995-997.
8. Hilf R, Feldstein ML, Scott L, Gibson BS, Savlov ED. The relative importance of estrogen receptor analysis as a prognostic factor for recurrence or response to chemotherapy in women with breast cancer. *Cancer* 1980; 45: 1993-2000.
9. Fisher B, Redmond C et al. Treatment of primary breast cancer with chemotherapy and tamoxifen. *N Engl J Med* 1981; 305: 1-6.
10. Pichon MF, Pallud C, Brunet M, Milgrom E. Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. *Cancer Res* 1980; 40: 3357-3360.
11. Sáez S, Chouvet C, Mayer M, Cheix F. Estradiol and progesterone receptor (ER, PGR) as prognostic factors in human primary breast tumors. *Cancer Res* 1980; 21: 139-145.
12. Martin PM, Bressot N et al. Protocole cooperatif intercentres. En Evaluation des moyens de diagnostic du cancer du sein. *J Gest ed. JMT Conseil éditeur. Paris* 1981; 263-280.
13. Koreman SG, Dukes BA. Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. *S Clin Endocrinol Metab* 1970; 30: 639-643.
14. Greene GL, Nolan C, Engler JP, Jensen EV. Monoclonal antibodies to human estrogen receptors. *Proc Natl Acad S* 1980; 77: 5115-5119.
15. Consensus Development Conference Report. *N Eng* 1979; 301: 1011-1012.
16. EORTC Breast Cancer Cooperative Group. Revision of standards for the assessment of hormonal receptors in breast cancer. Report of the Second EORTC Workshop. *J Cancer* 1980; 16: 1513-1515.
17. Greene JL, Jensen EV. Monoclonal antibodies as progesterone receptors detection and characterization. *J Biochem* 1982; 16: 353-359.
18. Jordan VC, Jacobson HI, Keenan EJ. Determination of Estrogen Receptors in Breast Cancer Using monoclonal antibody Technology. Results of Multicenter Study in United States. *Cancer Res* 1986; 46: 4237-4240.
19. Delarue JC, Mouriesse H et al. Récepteurs estrogéniques dans les cancers de sein. Comparaison de deux méthodes. *Ann Biol Clin* 1986; 44: 629-633.
20. Lee SH. Cellular estrogen and progesterone receptors in mammary carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1980; 73: 323.
21. Pertschuk LP. Detection of estrogen receptor in human breast cancer by immunofluorescence using monoclonal antibodies. Presented at the Breast Cancer Task Force meeting Workshop on monoclonal antibodies and Breast Cancer. Bethesda MD 1981, June 29.
22. McGuire WL, Ragnand JP, Paulien EE. Progesterone receptors in Normal and Neoplastic Tissues. *WL McGuire*. Raven Press. New York 1977; vol. 4.
23. Adams DJ, McGuire WL. Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for the estrogen-regulated M 24.000 protein in human breast tumor: correlation with estrogen and progesterone receptors. *Cancer Res* 1985; 45: 2445-2452.
24. Rochefort H, Capony F, Garcia M, Veith T, Vignon F, W B. Estrogen induced proteins in human breast cancer. Recent Results in Cancer Research. G Leclercq, ed. *Gier-Verlag. Heidelberg* 1984; vol. 91, pp. 289-294.
25. Coffey AI, Spiller GH, Lewis KM, King RJB. Immunometric Studies with Monoclonal Antibody against a Protein Related to human Estrogen Receptor. *Cancer Res* 1985; 45: 3694-3698.