

11201  
3  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E  
INVESTIGACION**

**HOSPITAL GENERAL DE MEXICO**

**DIVISION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION**

**DETERMINACION DE RECEPTORES  
ESTROGENICOS EN CARCINOMAS DE  
VESICULA BILIAR POR METODOS  
INMUNOHISTOQUIMICOS**

**FALLA DE ORIGEN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA EN**

**ANATOMIA PATOLOGICA**

**P R E S E N T A :**

**DR. ALVARO DE JESUS BOLIO SOLIS**





## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

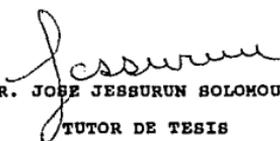
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO SS

TESIS DE INVESTIGACION



~~DR. HECTOR A. RODRIGUEZ MARTINEZ~~

JEFE DE LA UNIDAD DE ANATOMIA PATOLOGICA



DR. JOSE JESSURUN SOLOMOU

TUTOR DE TESIS

DR. ALVARO BOLIO SOLIS

RESIDENTE DE TERCER AÑO

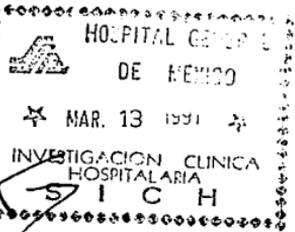
TESISTA

MEXICO, D.F. 1991

*[Handwritten signature]*

ESTA TESIS QUEDO REGISTRADA EN EL SERVICIO DE INVESTIGACION  
CLINICA HOSPITALARIA DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO DE LA  
SECRETARIA DE SALUD CON LA CLAVE:-----

DIC/90/PC/ /310/ 0/1/149/E



REVISADA POR EL DR. OCTAVIO AMANCIO CHASSIN

JEFE DEL SERVICIO DE INVESTIGACION CLINICA HOSPITALARIA

**DETERMINACION DE RECEPTORES ESTROGENICOS EN CARCINOMAS DE**

**VESICULA BILIAR POR METODOS INMINOHISTOQUIMICOS**

## RESUMEN

El carcinoma de la vesícula biliar es una neoplasia cuya frecuencia varía en diversas poblaciones. En México la incidencia de esta enfermedad es de 8.5 por 100 000 mujeres, cifra mucho mayor a la informada en la mayoría de los países desarrollados. Desafortunadamente el tumor se hace clínicamente aparente cuando se encuentra en estadios avanzados y la sobrevida a 5 años es menor del 5%. En la actualidad, aparte de la colecistectomía no existe otra opción terapéutica.

Ya que la mayoría de los pacientes con carcinoma de la vesícula biliar son mujeres, se consideró importante conocer si las células neoplásicas expresan receptores estrogénicos (RE) como lo hacen algunos tumores hormonodependientes. Además del carcinoma de la glándula mamaria, se han encontrado RE en algunos carcinomas colo-rectales y gástricos. Su presencia en los tumores de la vesícula biliar justificaría el ensayo terapéutico con antiestrógenos en pacientes con tumores en estadios avanzados.

Se seleccionaron 31 carcinomas de la vesícula biliar estudiados de 1986 a 1990, los cuales fueron clasificados de acuerdo a la variedad histológica. De estos casos, se utilizaron aquellos bloques constituidos principalmente por tumor y con poca necrosis. Para el estudio inmunohistoquímico se utilizó el método de avidina-biotina con anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de RE. Todas las inmunoreacciones de los casos se hicieron simultáneamente con controles positivos y negativos de tumores mamaros cuyo contenido de RE previamente se determinó por métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos.

De los 31 casos, 12 correspondieron a adenocarcinoma (ADC) moderadamente diferenciado, 9 a ADC poco diferenciado, 5 a ADC papilar, 1 a carcinoma epidermoide, 1 a carcinoma de células grandes y 1 a carcinoma indiferenciado de células pequeñas. En ninguno se demostró positividad para RE.

Se concluye que los carcinomas de la vesícula biliar, independientemente de la variedad histológica, no expresan RE detectables por métodos inmunohistoquímicos por lo que es poco probable que las manipulaciones endócrinas logren modificar la historia natural de la neoplasia.

## INTRODUCCION

Los receptores para hormonas esteroides son proteínas diméricas con peso molecular de 240,000 Kd. Los monómeros tienen forma de cigarro y en cada subunidad hay un sitio estereoquímico específico en donde se une con una hormona circulante para formar un complejo proteína-hormona, requisito indispensable para su acción biológica. Las proteínas receptoras se encuentran en diversas localizaciones celulares y son específicas para cada tipo de hormona.

Existen tres localizaciones de los receptores de estrógenos (RE) en la célula: en la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo. En el caso de las hormonas esteroides, los RE están en forma libre en el citoplasma de las células de los tejidos blanco (figura 1), pero cuando se unen a un estrógeno el complejo receptor-estrógeno migra al núcleo y es ahí donde modulan la expresividad genética (figura 2 y 3). Por otra parte el receptor se libera del estrógeno y puede pasar de nuevo del núcleo al citoplasma y recombinarse nuevamente con el esteroide completando así su ciclo funcional (figura 3 y 4). La cantidad de RE que se encuentra en una célula o tejido es producto de dos factores: 1) la cantidad de receptor libre que proviene de la síntesis de novo y 2) el receptor que recircula del núcleo al citoplasma, al liberarse del estrógeno.

Existen diferentes formas de RE. Los receptores que se encuentran en el citoplasma tienen un coeficiente de sedimentación de 8S y éstos a su vez están compuestos por dos subunidades que sedimentan en las fracciones 4S. Los receptores que se encuentran

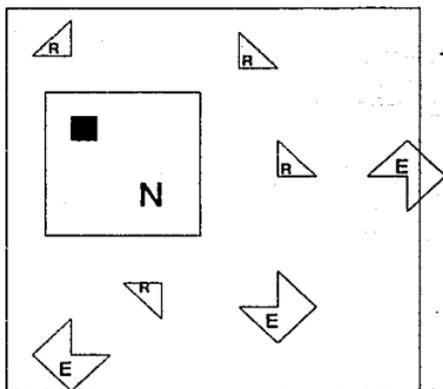


Figura 1. Receptores estrógenos (R) y estrógenos (E) en el citoplasma celular. Núcleo (N).

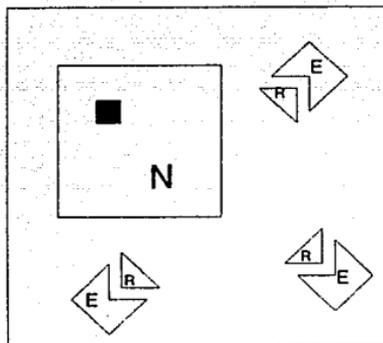
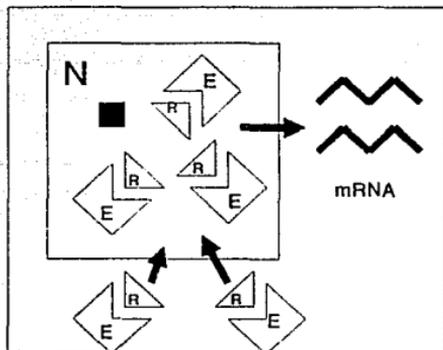


Figura 2: Complejos estr6geno-receptor en el citoplasma de la c6lula. N6cleo (N).



**Figura 3: Migración del complejo estrógeno-receptor al núcleo e inicio de producción de mRNA y síntesis de proteínas específicas.**

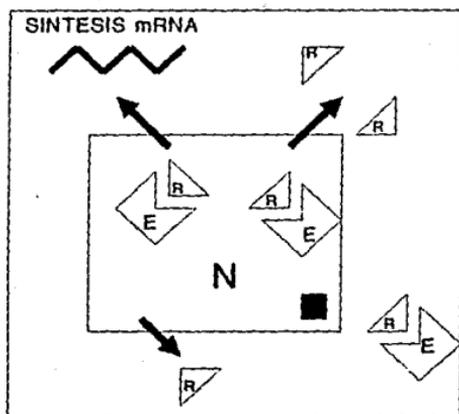


Figura 4: Producción en el núcleo de RNAm y migración de receptores estrogénicos (R) al citoplasma celular para formar nuevos complejos receptor-estrógeno.

en los núcleos y en la próstata tienen coeficiente de sedimentación de 4S; en el útero durante el embarazo sólo en encuentran receptores con coeficiente de 8S.

La presencia de receptores específicos en algunas células y no en otras es lo que condiciona la sensibilidad a determinadas hormonas . Es por esto que los estrógenos sólo actúan en sus tejidos "blanco" y no afectan a los que carecen de RE (1,2).

Desde el siglo pasado se observó que algunas pacientes con cáncer de la mama tenían una evolución más satisfactoria mediante la ablación de los ovarios o por medio de manipulaciones endócrinas.

Desde que se conoce que solamente los estrógenos ejercen su acción en las células con proteínas receptoras específicas, se dedujo que la presencia o ausencia de RE en las neoplasias pudiera explicar las diferencias en la sensibilidad endocrina de algunos tumores. Actualmente se puede afirmar que la determinación de RE en las neoplasias es de gran utilidad porque nos permite conocer su sensibilidad endocrina, su curso biológico y planear el tratamiento racionalmente (1,2,3,4).

La mayoría de los estudios de RE en neoplasias se han llevado a cabo en el carcinoma de mama, pero es sabido que muchas otras neoplasias contienen esta proteína receptora; como ejemplos podemos citar al carcinoma de endometrio, próstata y ovario (5,6,7,8).

No sólo los tumores derivados de tejidos u órganos sensibles a las hormonas son los que presentan RE, recientemente se han encontrado en algunos tumores derivados de tejidos considerados hormonoindependientes, como el melanoma maligno, carcinoma renal,

algunos hepatomas, carcinomas de estómago y de colon, sarcomas de tejidos blandos, carcinoides etc. (1,5,13,14,15,16,17,19).

El carcinoma de la vesícula biliar es una neoplasia cuya frecuencia varia en diversas poblaciones. En México la incidencia de este tumor es de 8.5 por 100 000 mujeres, cifra mucho mayor a la informada en la mayoría de los países desarrollados. Aproximadamente el 16% de los carcinomas de la vesícula biliar se encuentra incidentalmente durante el examen quirúrgico del espécimen después de una colecistectomía. Desafortunadamente el resto de los tumores se hace clinicamente aparente cuando se encuentra en estadios avanzados y la sobrevida a 5 años es menor del 5% (18).

En la actualidad no existe ninguna opción terapéutica aparte de la quirúrgica, la cual sólo es curativa cuando el tumor se encuentra in situ (estadio 0) o cuando a infiltrado la lámina propia (estadio 1), sin embargo, la menor parte de los tumores se detecta en estadios tempranos lo que probablemente se deba a las pocas e inespecíficas manifestaciones clínicas con que se presenta.

En general la relación entre hombres y mujeres de carcinoma de vesícula biliar es de 3:1, aunque puede variar desde 2:1 a 5:1 según la población que se estudie. La edad de presentación de los pacientes con esta neoplasia es entre la sexta y la octava década de la vida (18).

Con los antecedentes anteriores se consideró importante conocer si las células neoplásicas del carcinoma de la vesícula biliar expresan RE como lo hacen otros tumores hormonodependientes

en mujeres de edades semejantes, como ocurre con el carcinoma de la glándula mamaria y de endometrio. Para la detección de RE se han usado diversas técnicas, entre las que podemos citar la pruebas bioquímicas (prueba de puente-ligadura de fracciones citosólicas de tumores), esteroides radioactivos y no radioactivos en cortes por congelación, y en años recientes, se han desarrollado anticuerpos monoclonales para receptores estrogénicos que han permitido la localización directa de la proteína en cortes por congelación de los tumores usando técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa (9-11).

Algunos autores japoneses así como otros grupos de investigadores han mostrado que los RE se pueden demostrar en tejidos fijados en formaldehído e incluidos en parafina (10-12).

## **OBJETIVO**

Conocer si las células neoplásicas en el carcinoma de la vesícula biliar expresan RE.

## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

### **HIPOTESIS NULA:**

Los tumores de la vesícula biliar no expresan RE.

Es poco probable que los pacientes con éste tumor se beneficien con tratamiento antiestrogénico.

### **HIPOTESIS ALTERNA:**

Los tumores de la vesícula biliar expresan RE.

Es probable que los pacientes con éste tumor se beneficien con tratamiento antiestrogénico.

## **JUSTIFICACION**

La alta frecuencia del carcinoma de la vesícula biliar en México, su elevada mortalidad y las pocas opciones terapéuticas que existen en la actualidad hacen necesario que se exploren algunos factores hasta ahora desconocidos que pudieran modificar su conducta biológica. La presencia de RE en esta neoplasia podría sugerir la participación de hormonas en su desarrollo y

justificaría la realización de protocolos futuros para explorar el efecto de la supresión de estrógenos, quirúrgica o farmacológica para su tratamiento.

## **MATERIAL Y METODO**

Se seleccionaron los casos de carcinoma de vesícula biliar estudiados en el Departamento de Patología Quirúrgica del Hospital General de México, SS, UNAM., entre los años de 1986 a 1990 y se clasificaron de acuerdo a su variedad histológica.

Durante estos años se recolectaron 31 casos que cumplieron con los requisitos para incluirlos en el estudio como: diagnóstico histológico de carcinoma invasor, disponibilidad de bloques de parafina con tumor representativo y con poca necrosis. En todos los casos se revisaron las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina provenientes del archivo del departamento y estas fueron vistas por dos patólogos al mismo tiempo para confirmar el diagnóstico y escoger los bloques más representativos para los estudios de inmunohistoquímica.

Los carcinomas de la vesícula biliar se clasificaron de acuerdo a criterios previamente establecidos, en los siguientes grupos:

- 1) Adenocarcinoma bien diferenciado
- 2) Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
- 3) Adenocarcinoma poco diferenciado
- 4) Adenocarcinoma papilar

- 5) Adenocarcinoma intestinal
- 6) Adenocarcinoma de células claras
- 7) Adenocarcinoma mucinoso
- 8) Carcinoma epidermoide
- 9) Carcinoma indiferenciado de células pequeñas
- 10) Carcinoma mucoepidermoide
- 11) Carcinoma indiferenciado de células grandes

Los estudios de inmunohistoquímica se realizaron utilizando el método de avidina-biotina con anticuerpos monoclonales (kit Abbott ER-ICA) con la siguiente metodología:

1.- Se desparafinaron los cortes con xilol, hidrataron con etanol de diferentes grados y se lavaron con buffer de fosfatos (PBS) 0.01 mol/L a pH 7.2-7.4.

2.- Se pasaron los cortes a buffer TRIS de 0.05 mol/L, pH 7.8 con tripsina porcina tipo II 0.5 mg/mL (Sigma T-8128) y 1.34 mg/mL CaCl<sub>2</sub> por 5 minutos.

3.- Se lavaron los cortes con agua corriente y posteriormente con PBS.

4.- Se cubrieron los cortes con 3-4 gotas de solución de DNase (5 mg DNase/mL de buffer TRIS de 0.05 mol/L, pH 7.4 y sulfato de magnesio de 0.01 mol/L) por 10 minutos en cámara húmeda.

5.- Se lavaron en PBS.

6.- Se efectuaron incubaciones de acuerdo con las direcciones del kit de Abbott ER-ICA.

7.-Después del tratamiento con el reactivo de peroxidasa-antiperoxidasa, se lavaron los cortes con PBS.

8.- Se preparó solución cromógena que contenía buffer TRIS 0.05 mol/L, pH 7.4; 0.02% (w/v) de clorhidro de cobalto; 0.05% (w/v) de diaminobencidina; y 0.0012% (w/v) de peróxido de hidrógeno.

Se incubaron las laminillas por 7 minutos cuando se usó el anticuerpo primario no diluido y por 10 minutos cuando se usó el anticuerpo diluido a 1:1.

9.- Se deshidrató en etanoles de diferentes grados, aclaró con xilol y montaron las laminillas.

Como controles se utilizaron carcinomas de glándula mamaria positivos y negativos para RE previamente determinados por métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos.

Estos procedimientos se llevaron a cabo en el laboratorio de inmunohistoquímica del Departamento de Patología de la Universidad de Minneapolis, Minnesota.

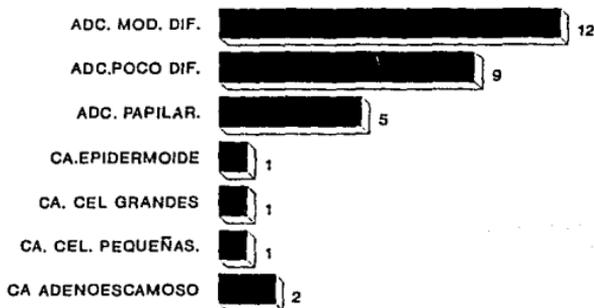
Si el cromógeno derivado de la inmunoreacción se encontraba presente en núcleo de las células neoplásicas se consideró positivo para RE.

## RESULTADOS

Los tumores de la vesícula biliar fueron clasificados como se muestra en la figura 5.

Ninguno de los 31 casos resultó positivo para RE con el método de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos monoclonales (Abbott ER-ICA) y tejidos fijados en formaldehído al 10% e incluidos en parafina. Estos casos tuvieron como controles carcinomas de glándula mamaria positivos mediante métodos bioquímicos con la prueba de puente ligadura de formaciones citosólicas e inmunohistoquímicos, idénticos a los utilizados para evaluar los casos.

### ADENOCARCINOMAS DE LA VESICULA BILIAR TIPOS HISTOLOGICOS



Adenocarcinoma (ADC)  
Carcinoma (CA)

No. de casos 31

Figura 5

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## DISCUSION

Desde hace varios años se conoció que más de un tercio de los carcinomas de glándula mamaria tienen una regresión temporal con la ablación de los ovarios, con hipofisectomía o con terapia hormonal. El descubrimiento de los RE presentes en ciertos tejidos como el endometrio y miometrio y el epitelio de la glándula mamaria necesarios para la reactividad estrogénica de estos órganos, hizo que algunos investigadores se preguntaran si los RE también estaban presentes en carcinomas de estos órganos, la medición de los cuales podría servir como un marcador de dependencia hormonal. Esta hipótesis ya ha sido probada; actualmente se sabe que pacientes con tumores que no contienen RE raramente responden a tratamiento endocrino, los que si contienen RE responden favorablemente a este tipo de tratamiento.(7)

Para la medición de RE se han utilizado diversas técnicas entre las cuales están métodos bioquímicos y métodos de inmunohistoquímicos en tejidos procesados por congelación o tejidos fijados e incluidos en parafina. (10,11,12).

Los resultados en las determinaciones de RE son diversos con diferentes métodos. Cuando se comparan unos con otros la correlación es variable; en algunos estudios es de 80-90%. Sin embargo, la sensibilidad de los métodos varía considerablemente y depende de factores como tipo de tumor estudiado (tumor hormonodependiente e independiente), forma de procesar los tejidos, etc.

En la mayor parte de los estudios donde se comparan los

métodos bioquímicos, y los de inmunoperoxidasa en tejidos frescos o en tejidos fijados en formaldehído al 10%, la concordancia de la positividad para los RE es más del 90%, aunque hay que mencionar que estos estudios se realizaron en carcinomas de glándula mamaria que es un órgano "blanco" para estrógenos (10,11,12). En algunos de estos estudios la correlación fué significativa únicamente entre los métodos bioquímicos y el método de inmunoperoxidasa con tejidos frescos, y no fue adecuada con el método de inmunoperoxidasa en tejidos fijados lo cual se puede deber a varios factores entre los que podemos mencionar el tipo de fijación (formaldehído al 10%, Bouin, etc), el procesamiento de los tejidos y por último el período de almacenamiento de los bloques de parafina (9-12).

Otros de los factores que pueden influir en la positividad o negatividad de diferentes tipos de tumores son el grado histológico. Algunos autores informan que los carcinomas de mama bien diferenciados tiene mayor cantidad de RE (7). Otros investigadores han demostrado reactividad variable para otro tipo de tumores. Por ejemplo el carcinoma gástrico poco diferenciado con células en anillo de sello, frecuentemente en hombres jóvenes, tiene mayor cantidad de RE que los carcinomas de tipo intestinal que son más frecuentes en mujeres y en edades más avanzadas (13,14). Por otro lado también hay informes de que los carcinomas gástricos con diferenciación endocrina tienen mayor cantidad de RE (15). Algunos melanomas malignos expresan abundantes RE y algunos casos han respondido adecuadamente al tratamiento antiestrogénico (5).

En carcinomas de glándula mamaria donde se han estudiado la presencia de RE por métodos de inmunoperoxidasa, se puede ver al mismo tiempo la reacción para RE y el aspecto histológico lo que permite observar que no todos los núcleos de las células neoplásicas reaccionan con el anticuerpo monoclonal, sino que algunas son positivas y otras negativas. La proporción de células positivas para RE es importante ya que aquellos tumores que contienen pocas células positivas responden menos al tratamiento antihormonal. A diferencia de los métodos bioquímicos, las inmunoreacciones permiten la observación directa y cuantificación porcentual de las células neoplásicas con RE; al mismo tiempo es factible eliminar del análisis al tejido no neoplásico que pudiera expresar estos receptores (9,6).

En algunos tumores del tubo digestivo como los del colon, estómago y vesícula biliar, se han demostrado RE. Se cree que la presencia de éstos ocurre por la desrepresión del gen para el RE en forma análoga a lo que posiblemente pasa con los genes responsables de la producción de hormonas ectópicas en ciertos tumores como la gonadotropina coriónica en carcinomas del colon (17,19).

La escasa reactividad para RE al utilizar métodos inmunohistoquímicos puede deberse a que los epitopes específicos reconocidos por los anticuerpos monoclonales no estén presentes en los RE de estos tumores ya que los anticuerpos monoclonales son producidos específicamente para la detección de RE en carcinomas de glándula mamaria (16).

En algunos estudios se a informado el hallazgo de RE en carcinomas de la vesícula biliar. En uno de ellos de 3 casos, dos fueron positivos por el método de esteroides radioactivos (11). Recientemente se estudiaron diversas lesiones benignas y malignas de la vesícula biliar así como epitelio normal y se obtuvieron diferentes porcentajes de positividad variando desde un 20% para casos de vesícula con colelitiasis hasta un 50% para casos de adenomas. El método que se utilizó en este estudio fue el inmunohistoquímico con anticuerpos monoclonales específicos para RE. En relación a los carcinomas, obtuvieron un 22.8% de positividad de 114 casos; no se pudo demostrar variación en la sobrevivida de los pacientes con positividad y negatividad para RE. Los adenomas y carcinomas los dividieron en dos grupos aquellos con metaplasia y otros sin metaplasia. La positividad fue mayor en el grupo con metaplasia y se concluyó que la presencia de RE en la mucosa de la vesícula biliar esta relacionada con estos cambios y no con la edad, sexo, benignidad o malignidad de la lesión o tipo histológico de carcinoma.

En el presente estudio de los 31 casos estudiados todos fueron negativos para RE al utilizar anticuerpos monoclonales en tejidos fijados en parafina.

Nuestro estudio no apoya el resultado del grupo japonés.

Resultados discordantes semejantes han sido informados por otros grupos al estudiar la expresión de RE en tumores del tubo digestivo por métodos aparentemente semejantes (16).

## CONCLUSIONES

- 1.- En carcinomas de la vesícula biliar no se detectaron RE por métodos inmunohistoquímicos en tejidos fijados en formol.
- 2.- Si la ausencia de RE es real, es poco probable que las manipulaciones endócrinas modifiquen la historia natural del tumor.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Benítez Bribiesca L, Diehl G: Receptores estrogénicos. *Patología* 18:205-220, 1980.
- 2.- Chan L, O'Malley B: Mechanism of action of the sex steroid hormones (first of three parts). *N Eng J Med* 10:1322-1328,1976.
- 3.- Chan L, O'Malley B: Mechanism of action of the sex steroid hormones ( second of three parts). *N Eng J Med* 17:1372-1381,1976.
- 4.- Chan L, O'Malley B: Mechanism of action of the sex steroid hormones ( thrid of three parts). *N Eng J Med* 24:1430-1437,1976.
- 5.- Stedman K, Moore G, Morgan R: Estrogen receptor proteins in diverse human tumors. *Arch Surg* 115:244-248,1980.
- 6.- Hanna W, Ryder D, Mobbs B: Cellular localization of estrogen binding sites in human breast cancer. *Am J Clin Path* 11:391-395,1981.
- 7.- Osborne CK, Fisher E, Redmond C, Knigh WA, Yochmowitz MG, McGuire WL: Estrogen receptor, a marker for human breast cancer differentiation and patient prognosis.
- 8.- McCarty K Jr, Barton T, Fetter B, Woodard B, Mossler J, Reeves W, Daly J, Wilkinson W, and McCarty K Sr: Correlation of estrogen

and progesterone receptors with histologic differentiation in mammary carcinoma. Cancer 46:2851-2858,1980.

9.- Taylor C, Cooper C, Kurman R, Goebelsmann U, and Markland F: Detection of estrogen receptor in breast and endometrial carcinoma by the immunoperoxidase technique. Cancer 47:2634-2640,1981.

10.- Hiort O, Kwan P, DeLellis R: Immunohistochemistry of estrogen receptor protein in parafin seccions. Am J Clin Pathol 90:559-563,1988.

11.- Cudahy T, Boeryd B, Franlund B, and Nordenskjold B: A comparison .of three different methods for the determination of estrogen receptors in human breast cancer. Am J Clin Path 90:583-590,1988.

12.- Raymond W, and Leong A: Oestrogen receptor staining of paraffin-embedded breast carcinomas following short fixation in formalin: a comparison with cytosolic and frozen section receptor analyses. J Path 160:295-303,1990.

13.- Sica V, Nola E, Contieri E, Bova R, Masucci MT, Medici N, Patrillo A, Weisz A, Molinari AM, and Puca GA: Estradiol and progesterone receptors in malignant gastrointestinal tumors. Cancer Resch 44:4670-4674,1984.

14.- Tokunaga A, Nishi K, Matsukura N, Tanaka N, Onda M, Shiota A, Asano G, and Hayashi K: Estrogen and progesterone receptors in gastric cancer. *Cancer* 57:1376-1379,1986.

15.- Nishi K, Tokunaga A, Shimizu Y, Yoshiyuki T, Wada M, Matsukura N, Tanaka N, Onda M, Asano G: Immunohistochemical study of intracellular estradiol in human gastric cancer. *Cancer* 59:1328-1332,1987.

16.- Dawson PM, Shousha S, Blair SD, Carter GD, Jones J, Alaghband-Zadeh J, Theodorou NA: Oestrogen receptors in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 43:449-451,1990.

17.- McClendon J, Appeby D, Claudon D, Donegan W, DeCosse J: Colonic neoplasms. Tissue estrogen receptors and carcinoembryonic antigen. *Arch Surg* 112:240-241,1977.

18.- Albores-Saavedra J, Henson DH: Tumors of the gallbladder and extrahepatic bile ducts. Second series, fascicle 22, Armed Forces Institute of Pathology. 1986.

19.- Keshgegian A, Wheeler J: Estrogen receptor protein in malignant carcinoid tumor. *Cancer* 45:293-296, 1980.

20.- Yamamoto M, Nakajo S y Tahara E: Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in human gallbladder. *Acta Pathol Jpn* 40:22-29, 1990.