

F. Vizoso*,
M.^a T. Allende**,
J. C. Rodríguez*,
A. González***,
M. L. Lamelas****,
M.^a C. Díez*,
A. Ruibal**

Acumulación de antígenos asociados a tumores en el fluido quístico de mujeres con enfermedad macroquística de la mama

Antigen accumulation associated to the presence of tumors in the cystic fluid in women with macrocystic breast disease

SUMMARY

Serum and cyst fluid concentration of human chorionic gonadotropin (β HCG), breast cancer mucin (BCM), glycoprotein TAG-72 defined by the monoclonal antibody B 72.3 (B 72.3) and SLX-1 (Sialyl Le^x-i o Sialyl SSEA-1), were determined in 37 patients suffering from gross cystic breast disease. Cyst fluid and serum samples were obtained during the luteal phase of the menstrual cycle. All women were divided into three groups according to cyst type. Thus, 16 had type I cysts with low Na⁺ and high K⁺ levels (Na⁺/K⁺ intracystic ratio < 0,5), characteristic of an intracellular fluid; 13 had type II cysts with high Na⁺ and low K⁺ concentrations (Na⁺/K⁺ ratio > 10), similar to those found in plasma; and 8 type III with intermediate levels of Na⁺ and K⁺ (Na⁺/K⁺ ratio between 0,5 and 10). β HCG, BCM, B 72.3 and SLX-1 concentrations were significantly lower ($p < 0.001$) in serum than in the cyst fluid in all patient groups. On the other hand, serum levels of these antigens were not significantly different between the three patient groups. In addition, BCM and B 72.3 intracystic levels were not significantly different between the three cyst types. However, β HCG and SLX-1 intracystic levels were significantly higher ($p < 0.001$) in type II than in type I and type III cysts.

We conclude that there is a chief accumulation of these tumor-associated antigens in cyst fluid suggesting a higher secretory activity. However, the mechanisms that regulate their intracystic concentrations still remains to be elucidated.

Palabras clave

Enfermedad macroquística mamaria, Fluido quístico, marcadores tumorales.

Key words

Gross cystic breast disease, Breast cyst fluid, Tumor markers.

*Servicio de Cirugía General.
Hospital de Jove. Gijón.
**Servicio de Medicina Nuclear.
Hospital Central de Asturias.
Oviedo.
***Servicio de Cirugía General.
Hospital General de Segovia.
****Servicio de Ginecología.
Hospital de Jove. Gijón.

Correspondencia:
F. Vizoso.
Servicio de Cirugía General.
Hospital de Jove.
Avda. Eduardo Castro, s/n.
33290 Gijón.

INTRODUCCION

La enfermedad macroquística de la mama (EMM) está considerada como la enfermedad mamaria be-

nigna más frecuente, afectando al 7% de las mujeres del mundo occidental y está caracterizada por la presencia de quistes mayores de 3 mm en diámetro.¹ Aunque las lesiones macroquísticas de la mama no

son consideradas como premalignas por sí mismas, estudios realizados en las 2 últimas décadas indican que esas mujeres tienen un riesgo mayor de desarrollar carcinoma mamario en relación a la población femenina considerada normal.^{2,3} Este hecho ha inducido a muchos autores a investigar la composición bioquímica y hormonal del fluido quístico tratando de encontrar una explicación racional de la fisiopatología de la enfermedad y su relación con el riesgo de cáncer de mama. Así se ha descrito la existencia de concentraciones variables de una amplia diversidad de componentes bioquímicos del fluido quístico, como electrólitos,^{4,5,6,7,8,9,10,11} hormonas^{4,6,12,13,14} y diferentes proteínas.^{15,16,17,18,19,20,21} En base a esos análisis, los quistes pueden ser clasificados en 2 grandes grupos:^{4,5,6,7,8,9,10,11,21} los tipo I, con baja relación Na^+/K^+ , altas concentraciones de andrógenos conjugados y epitelio de recubrimiento tipo apocrino, y los tipo II, con alta relación N^+/K^+ , elevado contenido de albúmina y limitados por un epitelio plano. Además, algunos autores^{4,6,9,10,11} también describen la existencia de quistes tipo III, que muestran valores intermedios de los parámetros anteriormente señalados y parecen representar un paso evolutivo entre los quistes tipos I y II.

Estos tipos de quistes pueden corresponder a diferentes estados funcionales del epitelio quístico y se ha sugerido que pueden tener significación para predecir la historia natural de la enfermedad,^{22,23} y en especial el riesgo de cáncer de mama.^{11,24} Por esa razón, y teniendo en cuenta el tipo de quiste, hemos evaluado en este trabajos los niveles intraquísticos de 4 marcadores tumorales (MT): la gonadotropina coriónica (β HCG) y los antígenos sialilado (SLX-1) tipo mucina del cáncer de mama (BCM) y la TAG 72 definida por el anticuerpo monoclonal 72.3 (B 72.3).

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

Fueron estudiadas 37 mujeres premenopáusicas no lactantes, de edades comprendidas entre los 31 y 49 años (media: 42,5) y diagnosticadas de EMM. El cáncer fue excluido mediante exploración clínica, estudio mamográfico, ecográfico y estudios citológicos. Todas esas pacientes tenían ciclos menstruales regulares y ninguna de ellas había recibido medicación

hormonal al menos en los 6 meses previos al estudio. Las muestras de fluido quístico fueron obtenidas por punción-aspiración durante la fase luteínica media del ciclo menstrual (5-9 días previos a la menstruación) confirmada tras dosificar los niveles sanguíneos de las hormonas luteinizante (LH), foliculoestimulante (FSH) y progesterona.

De acuerdo a los hallazgos ecográficos, el tamaño de los quistes mamarios varió de 1 a 3,5 cm en diámetro. Dos pacientes mostraron 2 quistes en diferentes cuadrantes y una 3 quistes. Esos quistes múltiples fueron aspirados al mismo tiempo y analizados por separado. Las muestras sanguíneas fueron tomadas al mismo tiempo que las de fluido quístico y el suero fue rápidamente centrifugado y almacenado a -20° C para las posteriores determinaciones hormonales y de los antígenos asociados a tumores.

Determinaciones bioquímicas

El volumen de fluido quístico varió de 2 a 20 ml. Después de separar una licuota para el estudio citológico, las muestras fueron centrifugadas a $4.000 \times g$ durante 15 minutos. Las concentraciones de sodio y potasio de los fluidos quísticos fueron determinadas mediante fotometría de llama (modelo Corning 450) con un electrodo interno de litio.

La composición de los componentes proteicos mayoritarios del fluido quístico fue también evaluada en todas las muestras del fluido quístico. Para ello las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles homogéneos de poliacrilamida al 12%, a 50 mA durante 30 minutos, de acuerdo al método de Laemmli.²⁵ Finalmente, las proteínas fueron teñidas con azul de Comassie.

La β HCG se determinó, en el suero y fluido quístico, mediante un RIA de doble anticuerpo comercializado por Dade-Clinical Assays-Baxter Travenol (Estados Unidos). Un anticuerpo está absorbido en fase sólida y el otro se encuentra marcado con ^{125}I . El límite inferior de sensibilidad fue de 1,5 U/ml. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo para concentraciones de 35 y 100 U/ml fueron del 6 y 4,8%, respectivamente, y el CV interensayo para un valor de 89 U/ml fue del 7,2%. El anticuerpo no mostró reacción cruzada con la TSH y FSH, pero sí un 3,7% de reacción cruzada con la LH.

El BCM es un antígeno asociado al cáncer de ma-

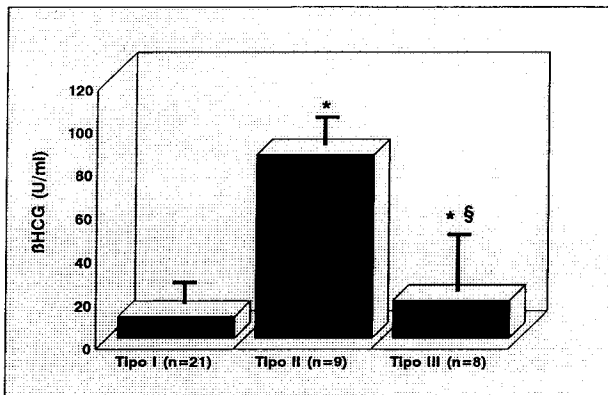


Fig. 1. Niveles de la β HCG en el fluido quístico de mujeres con enfermedad quística mamaria y que presentaban diferentes tipos de quiste (tipos I, II y III). Los valores representan la media \pm ESM. * $p < 0,001$ vs tipo I. § $p < 0,001$ vs tipo II. Entre paréntesis figura el número de muestras analizadas.

ma y localizado en una glucoproteína de elevado peso molecular tipo mucina.^{26,27} Este antígeno se dosificó en el suero y en fluido quístico mediante un análisis radioinmunométrico comercializado por Abbot (Estados Unidos). Se trata de un método que emplea 2 anticuerpos monoclonales, el M85 y el A169. El primero está fijado en la fase sólida y el segundo está marcado con ¹²⁵I. El límite inferior de la sensibilidad fue de 0,17 U/ml. Los CV intraensayo para concentraciones de 21,1 y 132 U/ml fueron del 8,3 y 12,5%, respectivamente. Los CV interensayo para valores de 11,6, 13,2, 55,2 y 137,7 U/ml fueron del 6,4, 4,2, 6,5 y 7,4%, respectivamente.

La TAG 72 (B 72.3) es una inmunoglobulina obtenida a partir de membranas enriquecidas del cáncer de colon humano^{28,29} y se determinó en el suero y en el fluido quístico mediante un análisis radioinmunométrico que emplea el anticuerpo monoclonal B 72.3, tanto en la fase sólida como el marcado con ¹²⁵I, y comercializado por Sorin (Italia). El límite inferior de sensibilidad se estableció en 3 U/ml. Los CV intraensayo para concentraciones de 12 y 50 U/ml fueron 3,9 y 6,7%, respectivamente, mientras que el CV interensayo para un valor de 30 U/ml fue del 6,0%.

El antígeno sialilado (SLX-1), que está definido por un anticuerpo monoclonal (FH6) y se asocia a adenocarcinomas,^{30,31} se determinó en el suero y en el fluido quístico, mediante un método radioinmunométrico comercializado por los laboratorios Otsuka (Japón). El límite inferior de la sensibilidad fue de 3,8 U/ml. Los CV

intraensayo para concentraciones de 35 y 100 U/ml fueron del 7,1 y 6,2%, respectivamente. El CV interensayo para concentraciones de 14, 28, 56 y 112 U/ml fueron 11,1, 12, 7,8 y 5,7%, respectivamente.

A causa del escaso volumen de fluido quístico aspirado en 6 mujeres, las concentraciones intraquísticas de β HCG, SLX-1, BCM y B 72.3 no pudieron ser medidas en algunas muestras.

Análisis estadísticos

Se utilizó el test del análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para comparar las medias de los antígenos asociados a tumores entre los 3 subgrupos de quistes. Cuando el test de ANOVA es significativo, se siguió el proceso estadístico aplicando el test de Newman Keuls.³² El test de la «t» de Student para datos no pareados se utilizó para valorar las medias entre los valores del fluido quístico y los séricos. El nivel de significación establecido fue del 95% ($p < 0,05$). Los resultados están representados como la media \pm ESM.

RESULTADOS

De acuerdo con nuestra clasificación de los quistes mamarios previamente establecida,¹⁰ 16 mujeres presentaron quistes tipo I con bajos niveles de Na^+ y altos de K^+ (relación Na^+/K^+ intraquística $< 0,5$), característicos de un fluido intracelular; 13 tipo II, con altos niveles de Na^+ y bajos de K^+ (relación $\text{Na}^+/\text{K}^+ > 10$), similares a los hallados en el plasma, y 8 tipo III, que muestran una relación catiónica intermedia entre los 2 principales tipos. Por otra parte, en todos los fluidos quísticos se confirmó, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, el patrón proteico clásico del fluido quístico de las mujeres afectas de EMM^{19,20,21} y que está constituido por la zinc-alfa²-glicoproteína, apolipoproteína D y GCDF-15. De esa forma, y de acuerdo a los estudios citológicos, se excluyó la presencia de lesiones macroquísticas de origen diferente.³³

La figura 1 representa los niveles intraquísticos de la β HCG en función del tipo de quiste mamario. Dichos niveles fueron diferentes entre los 3 tipos de quiste. Las concentraciones medias de ese antígeno asociado a tumores, y normalmente indetectable en el suero de mujeres no lactantes, fueron significativa-

TABLA I

NIVELES DE LA MUCINA DEL CANCER DE MAMA (BCM) EN SUERO Y EN FLUIDO QUISTICO DE MUJERES CON ENFERMEDAD QUISTICA DE LA MAMA

Tipo de quiste	BCM (U/ml)			
	Suero		Fluido quístico	
	Media ± ES	Intervalo	Media ± ES	Intervalo
I	9,0 ± 0,8 (16)	4,8-13,6	259 ± 93* (14)	9,9-1.242
II	9,4 ± 1,2 (13)	3,1-13,9	480 ± 121* (9)	7,3-1.138
III	8,7 ± 1,4 (8)	4,1-15,0	287 ± 116* (9)	2,0-823

* p < 0,001 vs suero. Entre paréntesis figura el número de datos.

mente (p < 0,001) superiores en el fluido de los quistes tipo II (84,5 ± 25,9 U/ml; intervalo: 5-214), a las observadas en los quistes tipo I (9,9 ± 3,7 U/ml; intervalo: 5-78) y tipo III (17,3 ± 10,5; intervalo: 5-85).

Como se puede observar en las tablas I, II y III, las concentraciones de BCM, B 72.3 y SLX-1 fueron siempre, independientemente del tipo de quiste, significativamente (p < 0,001) más elevadas que las halladas en el suero. Por otra parte, no existieron diferencias significativas en los niveles séricos de esos antígenos entre los 3 grupos de mujeres clasificadas de acuerdo al tipo de quiste que presentaban ni tampoco entre las concentraciones intraquísticas de BCM y B 72.3 detectadas en los 3 tipos de quiste (tablas I

TABLA II

NIVELES DEL ANTIGENO B 72.3 EN SUERO Y FLUIDO QUISTICO DE MUJERES CON ENFERMEDAD QUISTICA DE LA MAMA

Tipo de quiste	B 72.3 (U/ml)			
	Suero		Fluido quístico	
	Media ± ES	Intervalo	Media ± ES	Intervalo
I	5,1 ± 1,3 (16)	7-28	99,3 ± 58,6** (20)	7,2-1.200
II	3* (13)	-	129,6 ± 64** (10)	9,8-640
III	4,1 ± 1,4 (8)	3-16	42 ± 11,3** (9)	13,6-127

* El límite inferior de los valores ha sido tomado como 3. ** p < 0,001 vs suero. Entre paréntesis figura el número de datos.

TABLA III

NIVELES DEL ANTIGENO EMBRIONARIO ESPECIFICO DE ESTADIO SIALILATO (SLX-1) EN SUERO Y EN EL FLUIDO QUISTICO DE MUJERES CON ENFERMEDAD QUISTICA DE LA MAMA

Tipo de quiste	SLX-1 (U/ml)			
	Suero		Fluido quístico	
	Media ± ES	Intervalo	Media ± ES	Intervalo
I	21,2 ± 1,4 (16)	8-32	57,3 ± 17,9* (14)	7-219
II	33,1 ± 5,4 (13)	7-205	1.342 ± 396* ** (8)	141-3.200
III	48,4 ± 24,7 (8)	16-207	404 ± 154* ** ** (8)	131-1.365

* p < 0,001 vs suero. ** p < 0,001 vs tipo I. *** p < 0,001 vs tipo II. Entre paréntesis figura el número de datos.

y II). Sin embargo, las concentraciones de SLX-1 en el fluido quístico mostraron un comportamiento similar a la βHCG, puesto que los quistes tipo II tuvieron unos niveles significativamente (p < 0,001) superiores del antígeno en relación a los quistes tipos I y III (tabla III).

DISCUSION

El presente estudio demuestra la existencia en mujeres afectas de EMM de un acúmulo en el fluido quístico de mujeres afectas de EMM, de la βHCG y de los antígenos asociados a tumores BCM, B 72.3 y SLX-1. Ello nos sugiere que el epitelio de los quistes mamarios es capaz de sintetizar y secretar estas sustancias normalmente asociadas a tumores,^{30, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40} o bien, como ocurre con la βHCG, que sólo son detectables en el suero en situaciones fisiológicas muy específicas como es la gestación.

Otro autores también demostraron que el fluido quístico contiene diferentes MT en concentraciones más elevadas que en el suero. Esos MT presentes en el fluido quístico incluyen no sólo antígenos asociados a tumores,^{41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48} sino también agentes mitogénicos que pueden desempeñar un papel en la transformación maligna, como proteasas^{17, 49, 50} y factores de crecimiento.^{50, 51, 52, 53, 54, 55, 56} Además se ha comprobado que algunos de esos componentes bioquímicos muestran un comportamiento diferente en función del tipo de quiste mamario. Así los ni-

veles intraquísticos del antígeno carbohidrato CA 125,⁴⁴ CA 15.3,⁴⁶ antígeno tipo mucina asociado al carcinoma de mama (MCA),⁴⁷ el factor de crecimiento epidérmico (EGF)^{50, 54, 55, 56} y la catepsina D^{49, 50} han sido hallados en concentraciones más elevadas en los quistes tipo I en relación a los tipo II. Esos resultados podrían estar en la línea de aquellos estudios que indican un mayor riesgo de cáncer mamario en las mujeres que presentan aquel tipo de quiste mamario.^{11, 24} Pero por el contrario, se ha descrito que los quistes tipo II muestran, en relación a los quistes tipo I, concentraciones más elevadas del antígeno carcinoembrionario (CEA)⁴² y, como demuestra este estudio, también de los MT β HCG y SLX-1. Además, de acuerdo con nuestros resultados, los niveles intraquísticos de los antígenos asociados a tumores BCM y B 72.3 no mostraron diferencias significativas en relación al tipo de quiste.

Probablemente los niveles intraquísticos de los diferentes MT detectados en ese medio pueden estar en relación con el estadio evolutivo de la enfermedad quística mamaria. Los quistes tipo I parecen corresponder el primer estado funcional de la EMM, puesto que los microquistes también están limitados por un epitelio de recubrimiento tipo apocrino y muestran altos niveles intraquísticos de K^+ de dehidroepidandrosterona-sulfato.⁵⁷ Por ello la presencia de una elevada acumulación de determinados MT en el fluido de esos quistes puede reflejar la existencia de una fase activa de síntesis y secreción. Por el contrario, los quistes tipo II, con epitelio plano y concentraciones de esos componentes intraquísticos similares a los del plasma, se ha sugerido que pueden representar un estadio final de la evolución quística.^{58, 59} Así pues, los niveles persistentemente elevados de los antígenos BCM y B 72.3 en el fluido de este último tipo de quistes puede ser consecuencia de una vida media de ellos más larga en ese medio biológico. Por otra parte, y en línea con la hipótesis evolutiva de los quistes mamaros, una posible explicación de los niveles elevados en los quistes tipo II de la β HCG y el SLX-1 podría ser, dado el origen embrionario de esos antígenos, la de su propia producción «autónoma» por un epitelio que se ve privado de las condiciones fisiopatológicas hormonales que desencadenan y mantienen la enfermedad quística de la mama,^{60, 61} pudiendo el epitelio quístico volver a una dediferenciación funcional y secretar entonces esos marcadores.

Sin embargo, será necesario un largo seguimiento clínico de esas mujeres con concentraciones muy elevadas de MT en su fluido quístico para comprobar si esa condición puede indicar, independientemente del tipo de quiste, un mayor riesgo de transformación maligna. En ese sentido, estudios realizados sobre las secreciones mamaras obtenidas a través del pezón de mujeres no lactantes han demostrado la existencia de una asociación significativa entre los altos niveles en ese medio biológico de MT, como el CEA,⁶² la proteína oncogénica Erb-2⁶³ y la catepsina D⁶⁴ y la presencia de cáncer de mama.

RESUMEN

Las concentraciones de la gonadotropina coriónica (β HCG) y de los antígenos sililado (SLX-1), tipo mucina del cáncer de mama (BCM) y la TAG 72 definida por el anticuerpo monoclonal 72.3 (B 72.3), fueron determinadas en el suero y fluido quístico de 37 mujeres afectas de enfermedad macroquística de la mama (EMM). Las muestras de suero y de fluido quístico se obtuvieron en fase luteínica del ciclo menstrual, y todas las pacientes fueron clasificadas en 3 grupos de acuerdo al tipo de quiste que presentaban. Así, 16 tuvieron quistes tipo I con bajos niveles de Na^+ y altos de K^+ (relación Na^+/K^+ intraquística $< 0,5$), característicos de un fluido intracelular; 13 tipo II con altos niveles de Na^+ y K^+ (relación $Na^+/K^+ > 10$), similares a los hallados en el plasma, y 8 tipo III que muestran una relación catiónica intermedia entre los 2 principales tipos.

Las concentraciones de la β HCG, SLX-1, BCM y B 72.3 fueron significativamente ($p < 0,001$) más bajas en el suero que en el fluido quístico en todos los grupos de pacientes. Por otra parte, los niveles séricos de esos antígenos no mostraron diferencias significativas entre los 3 grupos de pacientes. Además, las concentraciones intraquísticas de BCM y B 72.3 tampoco mostraron diferencias significativas entre los 3 tipos de quiste. Sin embargo, los niveles intraquísticos de la β HCG y del antígeno SLX-1 fueron significativamente más elevadas ($p < 0,001$) en los quistes tipo II que en los tipos I y III.

Así pues, el acúmulo intraquístico de esos antígenos en mujeres afectas de EMM nos sugiere que el epitelio de los quistes mamaros es capaz de secre-

tar esas sustancias normalmente asociadas a tumores. Sin embargo, el mecanismo que regula sus concentraciones intraquísticas es todavía desconocido.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor L. M. Sánchez y a la doctora M. Balbín por su labor en la determinación de los componentes proteicos de las secreciones mamarias.

REFERENCIAS

1. Haagensen CD, Bodian C, Haagensen DE. Breast carcinoma: Risk and detection. WB Saunders. Philadelphia, 1981.
2. Davis HH, Simons M, Davis JB. Cystic disease of the breast: Relationship to carcinoma. *Cancer* 1964; 17: 957-978.
3. Bundred NJ, West RR, Dowd JO, Mansel RE, Hughes LE. Is there an increased risk of breast cancer in women who have had a breast cyst aspirated? *Br J Cancer* 1991; 64: 953-955.
4. Miller WR, Dixon JM, Scott WN, Forrest APM. Classification of human breast cysts according to electrolyte and androgen conjugate composition. *Clin Oncol* 1983; 9: 227-232.
5. Dixon JM, Miller WR, Scott WN, Forrest APM. The morphological basis of human breast cyst populations. *Br J Surg* 1983; 79: 604-606.
6. Dogliotti L, Orlandi F, Torta M et al. Cations and dehydroepiandrosterone-sulphate in cyst fluid of pre and menopausal patients with gross cystic disease of the breast. Evidence for the existence of subpopulations. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1301-1307.
7. Boccardo F, Valenti G, Zanardi S et al. Epidermal growth factor in breast cyst fluid: Relationship with intracystic cation and androgen conjugate content. *Cancer Res* 1988; 48: 5860-5863.
8. Molina R, Ballesta AM, Casals E et al. Value of biochemical examination of cyst fluid in the classification of mammary fibrocystic disease. *Prot Biol Fluids* 1988; 32: 851-854.
9. Angeli A, Bradlow HL, Bodian CA, Chasalow FI, Dogliotti L, Haagensen DE. Criteria for classifying breast cyst fluids. *Ann NY Acad Sci* 1990; 586: 49-52.
10. Vizoso F, Fueyo A, Allende MT, Fernández J, García-Morán M, Ruibal A. Evaluation of human breast cyst according to their biochemical and hormonal composition, and cytologic examination. *Eur J Surg Oncol* 1990; 16: 209-214.
11. Naldoni C, Constantini M, Dogliotti L et al. Association of cyst type with risk factors for breast cancer and relapse rate in women with gross cystic disease. *Cancer Res* 1992; 52: 1791-1795.
12. Bradlow HL, Schwartz MK, Fleisher M, Nisselbaun JS, Boyar R, O'Connor J, Fukushima K. Accumulation of hormones in breast cyst fluid. *J Clin Endocrinol Met* 1979; 49: 778-820.
13. Vizoso F, Fueyo A, Allende MT, Ruibal A. Niveles de estríol en el líquido quístico de mujeres afectas de enfermedad quística mamaria. *Rev Clín Esp* 1990; 186: 191.
14. Suárez B, Vizoso F, Allende MT et al. Active androgens in breast cyst fluids. *Int J Biol Markers* 1992; 7: 263-264.
15. Yap PL, Miller WR, Roberts MM et al. Protein concentration in fluid from gross cystic disease of the breast. *Clin Oncol* 1984; 10: 35-43.
16. Vizoso F, Allende MT, Fernández M et al. Total lactate dehydrogenase and tumor necrosis factor alpha levels in cyst fluid of women with gross cystic breast disease. *Int J Biol Markers* 1992; 7: 123-125.
17. Kesner L, Yu W, Bradlow L, Breed CW, Fleisher M. Proteases in cyst fluid from human gross cyst breast disease. *Cancer Res* 1988; 46: 6379-6383.
18. Sánchez LM, Freije JP, Merino AM, Vizoso F, Foltmann B, López-Otín C. Isolation and characterization of a pepsin C zymogen produced by human breast tissues. *J Biol Chem* 1992; 267: 24725-24731.
19. Haagensen DE, Mazoujian G. Biochemistry and immunohistochemistry of fluid proteins of the breast in gross cystic disease. En: Haagensen CD, ed. *Diseases of the breast*. Saunders. Philadelphia, 1986; 474-500.
20. Balbín M, Freije JMP, Fueyo A, Sánchez LM, López-Otín C. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem J* 1990; 271: 803-807.
21. Balbín M, Vizoso F, Sánchez LM, Venta R, Ruibal A, López-Otín C. GCDP-70 protein in cyst fluid identified as albumin and used to classify cysts in women with breast gross cystic disease. *Clin Chem* 1991; 37: 547-551.
22. Dixon JM, Scott WN, Miller WR. Natural history of cystic disease: Importance of cyst type. *Br J Surg* 1985; 72: 190-192.
23. Vizoso F. Comportamiento evolutivo de los tipos de quiste en mujeres afectas de enfermedad macroquística de la mama. *Rev Senología y Patol Mam* 1993; 6: 69-76.
24. Dixon JM, Lumnsden AB, Miller WR. The relationship of cyst type to risk factors for breast cancer and the subsequent development of breast cancer in patients with breast cystic disease. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985; 21: 1047-1050.
25. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 1970; 227: 680-685.
26. Papsidero LD, Nemoto T, Croghan GA, Chu TM. Expression of ductal carcinoma antigen in breast cancer sera as defined using monoclonal antibody F36/22. *Cancer Res* 1984; 44: 4653-4657.
27. Anderson B, Slota S, Kundus S et al. Characterization of monoclonal antibodies to paragloboside and sialosyl-PG, and an improved chromatogram binding assay for rapidly identifying antibodies to tumor antigens. *J Cell Biochem* 1987; 110 (suppl): 157.
28. Colcher D, Horan-Hand P, Nuti M, Schlom JA. A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1981; 78: 3199-3203.
29. Johnson VG, Scholm J, Paterson AJ, Bennett J, Magnani JL, Colcher D. Analysis of a human tumor associated glycoprotein (TAG 72) identified by monoclonal antibody B 72.3. *Cancer Res* 1986; 46: 850-857.
30. Fukushi Y, Nudelman E, Lavery SB, Hakomoni S, Rauvala H. Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma III. A hybridoma antibody (FH6) defining a human cancer-associated difucoganglioside

- (VI3NeuAcVIII3Fuc2nLc6). *J Biol Chem* 1984; 259: 10511-10517.
31. Kannagi R, Fukushi Y, Hakomori S. Carbohydrate specific monoclonal antibody that recognized cancer-associated mucin-specifically dealing with the SSEA-1 antigen group. *Cancer Chemother* 1986; 13: 812-825.
 32. Winer BJ. *Statistical principles in experimental design*. McGraw Hill. New York, 1971.
 33. Fernández-Cid A (ed). *Correlación de los distintos medios diagnósticos. Intento de clasificación de los quistes mamaros*. En: *Macroquistes mamaros*. Ed. Salvat, S. A. Barcelona, 1988; 45-71.
 34. Braunstein GD, Vaitukaitis JL, Ross GT et al. Ectopic production of human chorionic gonadotropin by neoplasm. *Ann Intern Med* 1973; 78: 39-45.
 35. Papsidero LD, Croghan GA, O'Connell MJ, Valenzuela LA, Nemoto T, Chu TM. Monoclonal antibodies (F36/22 and M7/105) to human breast carcinoma. *Cancer Res* 1983; 43: 1742-1747.
 36. Daver A, Lennart L, Bellia MF, Dalifard I, Lemieux P, Page M. Comparison of a new marker, BCM-EIA, to CA 15.3 and MCA for detection and monitoring of breast cancer patients. *Tumor Biology* 1990; 11: 84.
 37. Allende MT, Vizoso F, Fueyo A, Roiz MC, Lennartz L, Ruibal A. Serum BCM levels in patients with non tumoral pathologies: A value of 25 U/ml can be used as threshold for tumoral activity. *Int J Biol Markers* 1990; 5: 50-51.
 38. Allende MT, Vizoso F, Roiz MC, Fueyo A, Lennartz L, Ruibal A. High BCM seric levels in patients having non breast tumors. First results. *Bull Cancer (Paris)* 1990; 77: 1031-1032.
 39. Thor O, Ohurchi N, Szpack CD, Johnston W, Scholm J. The distribution of oncofetal antigen TAG 72 defined by the monoclonal antibody by 72.3. *Cancer Res* 1986; 46: 3118-3124.
 40. Hakomori S. Tumor-associated carbohydrate antigens. *Annu Rev Immunol* 1984; 2: 103-126.
 41. Fleisher M, Oettgen HF, Breed CN, Robbins CN, Robbins GF, Pinshy CM, Schwartz MK. CEA-like material in fluid from benign cysts of the breast. *Clin Chem* 1974; 20: 41-42.
 42. Olivati S, Cappellari A, Bagarella M, Corradi G, Zago L, Martinelli D. Carcinoembryonic antigen (CEA) in human breast cyst fluid: A study of 101 cases. *An N Y Acad Sci* 1986; 464: 599.
 43. Secreto G, Recchione C, Fariselli G, Grignolio E, Di Pietro S. Circulating levels and breast cyst fluid concentrations of human chorionic gonadotropin, progesterone and testosterone in women with gross cystic breast disease. *Tumori* 1984; 70: 523-527.
 44. Angeli A, Dogliotti L, Orlandi F, Beccati D. Mammary cyst: Pathophysiology and biochemistry. *Nucl Med Biol* 1987; 114: 397-406.
 45. Vizoso F, Allende MT, Fueyo A, Vigal G, García-Morán M, Ruibal A. CA 15.3 behaviour in cystic breast disease. *Int J Biol Markers* 1989; 4: 181-182.
 46. Vizoso F, Fueyo A, Allende MT et al. Tumor markers and hormonal levels in breast cyst fluids. *Tumor Biol* 1990; 11: 83-84.
 47. Vizoso F, Allende MT, Alexandre E, Ruibal A. Estudio de las concentraciones de MCA, séricas y del líquido quístico, en mujeres afectas de enfermedad macroquística de la mama. *Rev Esp Med Nucl* 1991; 10: 26-27.
 48. Abney TO, Teran AZ, Mahesh VB, Mullins WB, Greenblatt RB. Fibrocystic breast disease: The significance of β -human chorionic gonadotropin and other polypeptides in breast cyst fluid. *Fertil Steril* 1988; 49: 638-643.
 49. Sánchez LM, Vizoso F, Allende MT, Ruibal A, López-Otín C. Quantification and molecular analysis of cathepsin D in breast cyst fluids. *Eur J Cancer* 1992; 28A: 828-832.
 50. Scambia G, Benedetti Panici P, Ferrandia G et al. Cathepsin D and epidermal growth factor in human breast cyst fluid. *Br J Cancer* 1991; 64: 965-967.
 51. Jaspas JM, Franchimont P. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor in human breast cyst fluid. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985; 21: 1343-1348.
 52. Collette J, Hendrick JC, Jaspas JM, Franchimont P. Presence of alpha-lactalbumin, epidermal growth factor, epithelial membrane antigen, and gross cystic disease fluid protein (15,000 daltons) in breast cystic fluid. *Cancer Res* 1986; 46: 3728-3733.
 53. Wang DY, Hamed H, Mockridge CI, Fentiman IS. Radioimmunoassayable insulin-like factor-I in human breast cyst fluid. *Eur J Cancer* 1989; 25: 867-872.
 54. Lai LC, Ghilchik MW, Shaikh NA, Reed MJ, James VHT. Relationship between epidermal growth factor and dehydroepiandrosterone and its sulphate in breast cyst fluid. *Br J Cancer* 1989; 60: 320-323.
 55. Lai LC, Ghatei MA, Takahashi K et al. Mitogenic peptides in breast cyst fluid: Relationship with intracystic electrolyte ratios. *Int J Cancer* 1990; 46: 1014-1016.
 56. Vizoso F, Fueyo A, Díez MC, Ruibal A. Comportamiento del factor de crecimiento epidérmico en el líquido de los quistes mamaros. Diferencias en función de los 3 tipos de quistes existentes. *Rev Clín Esp* 1991; 4: 192-195.
 57. Dixon JM, Scott WN, Miller WR. An analysis of the content and morphology of human breast microcysts. *Eur J Surg Oncol* 1985; 11: 151-154.
 58. Page DL, Dupont WD. Are breast cysts a premalignant markers? *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 635-636.
 59. Ebbs SR, Bates T. Breast cyst type does not predict the natural history of cyst disease or breast cancer risk. *Br J Surg* 1988; 75: 702-704.
 60. Vizoso F, Allende MT, García-Muñiz JL, Alexandre E, Fueyo A, Ruibal A. Serum prolactin levels in women with breast gross cystic disease. *Int J Biol Markers* 1992; 7: 225-229.
 61. Vizoso F, Andicoechea A, Rodríguez JC et al. Niveles séricos de LH y FSH en mujeres con enfermedad macroquística de la mama. *Rev Senología y Patol Mam (en prensa)*.
 62. Mori T, Inaji H, Koyama H et al. Evaluation of an improved dot-immunobinding assay for carcinoembryonic antigen determination in nipple discharge in early breast cancer: Results of a multicenter study. *Jpn J Clin Oncol* 1992; 22: 371-376.
 63. Inaji H, Koyama H, Motomura K et al. ErbB-2 protein levels in nipple discharge: Role in diagnosis of early breast cancer. *Tumor Biol* 1993; 14: 271-278.
 64. Sánchez LM, Ferrando AA, Díez-Itza I, Vizoso F, Ruibal A, López-Otín C. Cathepsin D in breast secretions from women with breast cancer. *Br J Cancer* 1993; 67: 1076-1081.