

F. Vizoso Piñeiro,  
J. C. Rodríguez Díaz,  
M.<sup>a</sup> A. Martínez Menéndez

# Andrógenos y patología mamaria

## Androgens and breast pathology

### SUMMARY

*In the last twenty years has been reported several studies about the behaviour of androgens in breast pathology. These works demonstrated the existence of higher serum and breast cancer tissues levels of androgens from patients affected of breast cancer, as well as in cystic fluid from women affecting of breast gross cystic disease and in breast secretions obtained by nipple from patients with breast cancer. On the other hand, also has been reported the existence of an expression of androgen receptors by a significant percentage of breast carcinomas, in which it is associated with a favorable outcome and to be indicative of a specific pathway of hormonal responsiveness. All of these published data suggest the important role of androgens in the pathophysiology from breast diseases and specially in breast cancer.*

Servicio de Cirugía General.  
Hospital de Jove. Gijón.

Correspondencia:  
Francisco Vizoso Piñeiro.  
Servicio de Cirugía General.  
Hospital de Jove.  
Avda. Eduardo Castro, s/n.  
Apartado 385.  
33290 Gijón.

### Palabras clave

*Andrógenos, Secreciones mamarias, Enfermedad macroquística de la mama, Cáncer de mama.*

### Key words

*Androgens, Breast secretions, Breast gross cystic disease, Breast cancer.*

## INTRODUCCIÓN

La glándula mamaria tiene el mismo origen embriológico que las glándulas sudoríparas apocrinas de la piel. Ello sugiere la existencia de un efecto estimulador de los andrógenos sobre la mama, puesto que el epitelio apocrino, que es un hallazgo muy habitual en las mamas de las mujeres normales,<sup>1</sup> está bajo control de los andrógenos.<sup>2,3</sup> De hecho, en el fluido obtenido a través del pezón de las mujeres normales se han detectado elevadas concentraciones de andrógenos en relación a sus niveles séricos. Pero, además, existen datos que resultan indicativos de un cierto papel de estas hormonas esteroideas en la fisiopatología de las enfermedades de la glándula mamaria. Así se han encontrado concentraciones elevadas de andrógenos en el fluido quístico de las mujeres afectas de enfermedad macroquística de la mama (EMM), así como también en las secreciones y en el suero de pacientes con cáncer de mama. Por otra parte, también se ha demostrado la existencia

de elevadas concentraciones de determinados andrógenos en el tejido tumoral de los carcinomas mamaros, así como la presencia de determinadas proteínas inducibles por andrógenos que parecen tener importancia pronóstica en esta neoplasia. Y, finalmente, también se ha detectado la presencia de receptores androgénicos en el cáncer de mama cuya presencia parece tener también importancia en la biología molecular de este tumor maligno.

## NIVELES DE ANDRÓGENOS EN SECRECIONES MAMARIAS

Las secreciones mamarias pueden ser obtenidas por punción-aspiración de los quistes mamaros en las mujeres afectas por EMM, pero también por comprensión o aspiración del pezón. En esos fluidos mamaros se ha detectado la existencia de elevadas concentraciones de andrógenos. Así, por una parte, una de las peculiaridades más relevantes del fluido

quístico es la presencia de hormonas esteroideas a concentraciones marcadamente más elevadas que en el suero de las pacientes afectas de EMM.<sup>4</sup> De esas hormonas, la dehidroepiandrotendiona-sulfato (DHAS) es la que muestra niveles intraquísticos más elevados, alcanzando concentraciones hasta 200 veces superiores a las halladas en el suero de esas pacientes.<sup>4-6</sup> Además, también se han detectado en el fluido quístico diferencias significativas en los niveles intraquísticos de DHAS en función del tipo de quiste, siendo los quistes tipo I (alta relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> intraquística y epitelio de recubrimiento de tipo apocrino) los que muestran concentraciones más elevadas de ese andrógeno en relación a los quistes tipo II (relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> similar a la del suero y epitelio plano).<sup>4</sup> Ello sugiere que la DHAS puede ser de importancia en la fisiopatología de la EMM, considerando que los quistes tipo I parecen corresponder al estadio más inicial y activo de la enfermedad.<sup>7,8</sup> Finalmente, esas elevadas concentraciones intraquísticas de DHAS también sugieren la posibilidad de que el epitelio de los quistes mamarios puede tener la capacidad de sintetizar y secretar hormonas esteroideas. En este sentido se han detectado una serie de correlaciones hormonales en el fluido de los quistes tipo I que apoyan esta hipótesis. Así, se ha descrito la existencia de una correlación significativamente positiva entre las concentraciones intraquísticas de prolactina (PRL) y DHAS, y también entre las de ese derivado androgénico y las de estradiol.<sup>9</sup> Esos resultados sugieren que la PRL podría actuar sobre el epitelio de los quistes aumentando la síntesis de DHAS, que transformándose en metabolitos fisiológicamente activos en la mama pueden desempeñar un cierto papel en el desarrollo y mantenimiento de la EMM. Además, teniendo en cuenta que la DHAS es un precursor potencial de hormonas esteroideas se ha sugerido que el epitelio de los quistes podría sintetizar esas hormonas responsables de la proliferación típica de la EMM.<sup>10,11</sup>

También se han detectado concentraciones elevadas de andrógenos y otras hormonas esteroideas en el fluido mamario obtenido a través del pezón (FMP) de mujeres no lactantes.<sup>12</sup> El estudio del FMP representa un método rápido y no invasivo de acceder a las características metabólicas del epitelio mamario, que es la estructura anatómica donde tienen lugar la inmensa mayoría de los procesos patológicos que afectan a esta glándula. Además, mediante aspira-

ción o simple compresión periareolar es posible obtener FMP en el 50-71% de las mujeres no lactantes.<sup>13-15</sup> Así, estudios realizados en el FMP de esas mujeres demostraron la existencia de concentraciones más elevadas de andrógenos en relación a sus niveles séricos,<sup>12,16-19</sup> lo cual sugiere un papel de esas hormonas esteroideas en la fisiología de la mama normal. Pero, además, también se ha descrito la existencia de concentraciones significativamente más elevadas de testosterona en el FMP de mujeres con cáncer de mama con respecto a mujeres controles,<sup>18</sup> indicando que un «ambiente androgénico» local podría estar asociado con la concurrencia de este tumor maligno. De esta forma, los andrógenos podrían actuar directamente sobre el cáncer de mama interaccionando con sus receptores androgénicos, bien indirectamente como precursor de la síntesis de estrona y estradiol<sup>20</sup> o estimulando factores de crecimiento como, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico.<sup>21</sup>

Por otra parte, cabe señalar la presencia en las secreciones mamarias de proteínas que, como la apolipoproteína D, Zn- $\alpha$ 2-glucoproteína, GCDFP-15 y pepsinógeno C,<sup>22-26</sup> se ha demostrado que son inducibles por andrógenos en células humanas de cáncer de mama.<sup>27-30</sup> Además recientemente también se ha demostrado la presencia del antígeno prostático específico (PSA), una proteína de reconocido control androgénico, en el fluido de los quistes mamarios<sup>31</sup> y en el FMP.<sup>32</sup> Así pues, la presencia de cantidades significativas de todas esas proteínas en las secreciones mamarias sugiere que puede ser consecuencia del efecto directo de los andrógenos sobre el epitelio mamario.

## NIVELES SÉRICOS DE ANDRÓGENOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

El hecho de que el riesgo de desarrollar cáncer de mama haya sido asociado con determinados eventos de la vida reproductiva de la mujer, así como otras características de la enfermedad, indica que las hormonas sexuales esteroideas pueden desempeñar un papel en la carcinogénesis mamaria.<sup>33,34</sup> Ello ha motivado muchos trabajos publicados en la literatura con el objeto de dilucidar posibles diferencias en los niveles séricos y urinarios de esas hormonas entre las pacientes con cáncer de mama y las mujeres

controles.<sup>34</sup> Muchos de esos estudios describen que la exposición a niveles séricos elevados de estrógenos es una condición asociada a un mayor riesgo de desarrollar carcinoma de mama, principalmente en mujeres postmenopáusicas.<sup>35-38</sup> Pero otros autores demostraron que un exceso de andrógenos representa la anormalidad endocrina que caracteriza a las pacientes con cáncer de mama,<sup>39-42</sup> siendo los niveles séricos elevados de testosterona el hallazgo más frecuentemente descrito en la literatura,<sup>43-49</sup> aunque no todos los autores detectaron esa asociación.<sup>50-53</sup>

Por otra parte, en las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en estadio precoz se ha detectado que los niveles séricos elevados de andrógenos están asociados con un mayor riesgo de desarrollar metástasis.<sup>54, 55</sup> Además, en las mujeres hiperandrogénicas con cáncer de mama metastásico la remisión de las metástasis tras ooforectomía ha sido asociada con la normalización del exceso de andrógenos.<sup>56-58</sup> Así pues, ese hallazgo sugiere que el crecimiento tumoral es andrógeno-dependiente en un subgrupo de pacientes.

Sin embargo, a pesar de todas esas evidencias, los estudios sobre los niveles séricos de hormonas esteroideas en el cáncer de mama han sido realizados, en general, sobre pequeñas poblaciones de mujeres, lo que condiciona serias limitaciones metodológicas y, por tanto, la existencia de resultados conflictivos.<sup>59</sup>

## NIVELES TISULARES DE ANDRÓGENOS EN EL CÁNCER DE MAMA

Dado que el crecimiento celular del cáncer de mama está influenciado por las hormonas sexuales, se considera que los niveles de esas hormonas en el tejido tumoral pueden reflejar la actividad biológica de esos tumores. Además, teniendo en cuenta los resultados conflictivos existentes en la literatura en relación al comportamiento de los niveles séricos de andrógenos en las mujeres con cáncer de mama, una aproximación más convincente para explicar la importancia de estas hormonas esteroideas en esta neoplasia puede radicar en el estudio de sus niveles en el propio tejido tumoral. En este sentido, los estudios sobre las concentraciones tisulares de andrógenos en el carcinoma de mama demostraron la existencia de niveles elevados de androstendiol, DHEA, DHEAS

y androstendiona en relación a sus respectivos niveles séricos.<sup>60-63</sup> Ello sugiere que esa alta concentración de andrógenos presentes en los carcinomas mamarios puede desempeñar un papel en la regulación de su crecimiento. Por otra parte, aunque no parecen existir diferencias entre ambos medios en relación a las concentraciones de testosterona, se ha detectado, en cambio, la existencia de una amplia variabilidad individual de las concentraciones intratumorales de ese andrógeno,<sup>60, 61, 63</sup> pudiéndose identificar la existencia de dos grupos de tumores, uno de ellos con niveles tisulares más elevados de testosterona, si bien se desconoce todavía la posible significación biológica de esas diferencias.

El origen de estas hormonas en el tejido tumoral mamario puede proceder en parte de su acumulación tisular proveniente del plasma, pero también es posible su producción local *in situ*. En este sentido se ha demostrado suficientemente que los tumores mamarios muestran la capacidad de sintetizar o interconvertir hormonas<sup>64-66</sup> Además, la existencia de una actividad 5- $\alpha$ -reductasa en los tumores mamarios sugiere que, al menos, una proporción de dehidrotestosterona (DHT) intratumoral se origina de la conversión de testosterona en ese medio tisular, ya que la testosterona es el inmediato y obligado precursor de la DHT en la vía de síntesis de andrógenos.<sup>67</sup>

Aunque el mecanismo por el que los andrógenos influyen en el crecimiento de los carcinomas mamarios aún no es bien conocido, diferentes formas de actuación han sido propuestos. Así, en primer lugar, la unión de estas hormonas esteroideas a los receptores androgénicos puede, ya de por sí, ser un factor de estimulación del crecimiento en tumores andrógeno dependientes. En este sentido, se ha demostrado que los andrógenos estimulan el crecimiento en algunas líneas celulares de cáncer de mama.<sup>68, 69</sup> Además, Simon et al<sup>70</sup> también demostraron que la testosterona a concentraciones fisiológicas estimula el crecimiento de células cancerosas en cultivo derivadas de pacientes postmenopáusicas. Sin embargo, por el contrario, también se ha demostrado que la DHEA presenta un efecto protector contra el desarrollo del cáncer de mama espontáneo en ratones,<sup>71</sup> así como también contra el inducido por carcinógenos químicos en ratas.<sup>72, 73</sup> De acuerdo con esas observaciones, estudios realizados en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) indican la existencia de una acción antiproliferativa de los andrógenos que

parece debida específicamente a la activación de los receptores de andrógenos.<sup>74-77</sup> Aunque los mecanismos de esa inhibición no son todavía suficientemente conocidos, recientes investigaciones sugieren que determinados factores inducibles por andrógenos y secretados por las células cancerosas de la línea celular MCF-7 son los que finalmente ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de esas células.<sup>78</sup> En este sentido se ha propuesto que uno de esos factores o mediadores podría ser el factor transformante del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral<sup>79-81</sup> y cuya secreción es inducida por andrógenos en una gran variedad de tipos celulares.<sup>82, 83</sup>

Pero existen datos más recientes que sugieren un papel más complejo de los andrógenos en el cáncer de mama. Así, Buccuzi et al<sup>84</sup> demostraron que la DHEA estimula el crecimiento de las células cancerosas mamarias, pero en presencia de estradiol aquella hormona tiene un efecto contrario sobre el crecimiento tumoral, probablemente al antagonizar la acción del esteroide. Este hallazgo está de acuerdo con experimentos animales que demuestran cómo los andrógenos estimulan el crecimiento de los tumores mamarios en ratas ovariectomizadas,<sup>85</sup> mientras que, por el contrario, ejercen un efecto protector contra los tumores mamarios inducidos en ratas no ovariectomizadas.<sup>72</sup> Así pues, todo ello, trasladado a una hipótesis clínica, sugiere un efecto protector de los andrógenos adrenales en las mujeres premenopáusicas y, por el contrario, un posible efecto promotor en las mujeres postmenopáusicas. Además, Secreto et al<sup>86</sup> también demostraron que el medio hormonal en el que se desarrolla el cáncer de mama es diferente entre las mujeres postmenopáusicas de acuerdo a su edad y que esas diferencias concierne principalmente a las concentraciones intratumorales de andrógenos, siendo más elevados los niveles de DHT en las mujeres de menor edad dentro de ese grupo. Por tanto, teniendo en cuenta que la DHT estimula el crecimiento tumoral, esos resultados están de acuerdo con el hecho demostrado de que las mujeres ancianas muestran tumores con un comportamiento biológico menos agresivo.<sup>87-89</sup>

Por otra parte, independientemente de la unión de los andrógenos a sus receptores específicos, también se ha demostrado que esas hormonas a concentraciones elevadas se pueden unir a los receptores estrogénicos en los carcinomas mamarios huma-

nos, aportando así una estimulación estrogénica adicional sobre el crecimiento tumoral.<sup>90, 91</sup>

Un tercer mecanismo de cómo los andrógenos pueden influenciar el crecimiento de los tumores mamarios es mediante su conversión en estrógenos. Así, aunque algunos autores han destacado la actividad sulfatasa como la principal determinante de los niveles intratumorales de estrógenos en el cáncer de mama,<sup>61, 92</sup> la aromatización de los andrógenos a estrógenos *in situ* representa una fuente importante de la producción intratumoral de estas últimas hormonas esteroideas.<sup>93, 94</sup> En este sentido se ha detectado el complejo enzimático aromatasa en el 50-70% de los carcinomas mamarios humanos.<sup>93, 94</sup> Además esa actividad enzimática también fue hallada más elevada en los tumores de mama que en el tejido mamario normal<sup>61</sup> y que en tejido adiposo circundante al tumor.<sup>86, 95</sup>

En definitiva, todos esos datos indican que probablemente los andrógenos y estrógenos actúan en concierto en el control del crecimiento tumoral del cáncer de mama. Por ello, futuros estudios sobre esa dinámica hormonal podrán precisar la posible importancia del imbalance andrógenos/estrógenos en la fisiopatología de esta neoplasia.

## RECEPTORES DE ANDRÓGENOS EN CÁNCER DE MAMA

En una enfermedad heterogénea como es el cáncer de mama resulta trascendental subclasificar a los tumores de acuerdo a factores morfológicos o biológicos que finalmente nos permitan conocer determinadas peculiaridades de sus aspectos biológicos que puedan, a su vez, ser predictivos de la evolución clínica de la enfermedad. Entre esos aspectos ya bien establecidos de los tumores mamarios se encuentran el subtipo histológico, grado histológico, estado de afectación nodal, la actividad proliferativa del tumor y el estado de receptores hormonales como los de estrógenos y de progesterona. Sin embargo, la significación biológica y clínica de los receptores de andrógenos todavía no ha sido bien definida.

Hace ya más de una década que se ha demostrado la expresión de receptores de andrógenos por el 50-90% de los carcinomas mamarios<sup>96-99</sup> y que esa expresión está asociada con una pobre respuesta a la terapia antiestrogénica con tamoxifeno,<sup>96, 97, 100</sup>

añadiendo así información complementaria a la aportada por los receptores estrogénicos. Además, también se ha descrito en el cáncer de mama la existencia de una correlación significativamente positiva entre la presencia de receptores androgénicos y los de estrógenos y progesterona, sugiriendo que las hormonas esteroideas actúan en concierto en el crecimiento de los tumores de mama.<sup>101, 102</sup> Pero, a diferencia de los receptores estrogénicos, también se ha descrito que no parecen existir diferencias en la expresión tumoral de los receptores androgénicos en función del estado menopáusico de las pacientes.<sup>97, 99, 100</sup> Sorprendentemente, a pesar de esos primeros resultados alentadores, posteriormente han sido publicados muy pocos estudios acerca de la expresión y significación clínica de los receptores de andrógenos en el cáncer de mama. Ello pudo haber sido debido a la falta de un método estandarizado para su determinación.

Más recientemente Kuenen-Boumeester et al<sup>103, 104</sup> describieron la existencia de una expresión inmunohistoquímica de receptores androgénicos en torno al 70% de los carcinomas mamarios y, si bien detectaron una estrecha relación entre la expresión de esos receptores y los de estrógenos y progesterona, un 10% de los tumores mostraron los receptores de andrógenos como único receptor hormonal. Además esos resultados son similares a los recientemente obtenidos por nuestro grupo en los carcinomas mamarios utilizando para la determinación de esos receptores también un método inmunohistoquímico (Vizoso et al, datos no publicados). Por otra parte, otros autores también han demostrado la existencia de una correlación entre la pérdida de expresión tumoral de esos receptores y determinados factores de agresividad tumoral como son los índices de proliferación celular fase-S<sup>105</sup> y el antígeno nuclear Ki-67,<sup>104</sup> así como con una pobre respuesta al tratamiento hormonal con progestágenos.<sup>106, 107</sup> Por ello, la expresión tumoral de receptores androgénicos puede representar un nuevo factor pronóstico de evolución favorable en el cáncer de mama.

Así pues, la presencia de receptores androgénicos en los carcinomas mamarios puede ser indicativa de tumores que mantienen intacta una vía de respuesta hormonal. Por ello, su determinación puede aportar información pronóstica, así como criterios para seleccionar pacientes para tratamientos hormonales individualizadamente más adecuados. Sin embargo,

también debemos considerar la integridad funcional de los receptores androgénicos, su posible implicación en la progresión tumoral y en la respuesta al tratamiento. Así, por ejemplo, en el cáncer de próstata se ha descrito la existencia de mutaciones de esos receptores hormonales que son la base molecular de una insensibilidad androgénica de las células tumorales y que afectan la respuesta a la terapia hormonal.<sup>108, 109</sup> Por ello, de ahí la necesidad de nuevos parámetros biológicos o marcadores bioquímicos que puedan resultar indicativos del estado funcional de los receptores androgénicos. En este sentido, unos marcadores bioquímicos que pueden ser útiles para este propósito son las proteínas que se ha demostrado son inducibles por andrógenos en células de cáncer de mama. Estas proteínas, como ya hemos señalado, incluyen la apolipoproteína D, Zn- $\alpha$ 2-glucoproteína, GCDFP-15 y pepsinógeno C, y que, además, también son expresadas por un porcentaje significativo de carcinomas mamarios.<sup>110, 113</sup>

## CONCLUSIONES

Existen evidencias de un papel de los andrógenos en la fisiología de la glándula mamaria normal. Pero además, la información existente sobre estas hormonas esteroideas y sus receptores celulares en patología mamaria también inducen a considerar que tienen una significación biológica relevante en esos procesos, en especial en la enfermedad macroquística y en el cáncer. Sin embargo, aún son necesarias futuras investigaciones acerca del origen y significación fisiopatológica de las elevadas concentraciones de andrógenos en las secreciones mamarias y también a nivel tisular en el cáncer de mama, así como también sobre la significación clínica de los receptores androgénicos y su posible valor como marcadores de una vía específica de respuesta hormonal. Finalmente, la respuesta a esos interrogantes podría, abrir en el futuro la posibilidad de nuevas terapias para el cáncer de mama basadas en la manipulación hormonal androgénica.

## RESUMEN

En los últimos 20 años han sido publicados distintos estudios sobre el comportamiento de los andró-

genos en patología mamaria. Estos trabajos demostraron la existencia de niveles elevados de andrógenos en el suero y tejidos tumorales de pacientes afectas de cáncer de mama, así como también en el fluido quístico de mujeres con enfermedad macroquística de la mama y en las secreciones obtenidas a través del pezón de mujeres con cáncer de mama. Por otra parte, también se ha descrito la existencia de la expresión de receptores de andrógenos en un porcentaje significativo de carcinomas mamarios, donde su presencia parece estar asociada con un pronóstico favorable y ser indicativa de una vía específica de respuesta hormonal. Todos estos datos publicados sugieren un papel importante de los andrógenos en la fisiopatología de las enfermedades de la mama y especialmente en el cáncer.

#### REFERENCIAS

- Haagensen CD, ed. Epitelio apocrino. En: Enfermedades de la mama. Buenos Aires: Panamericana; 1987. p. 100-20.
- Wales NAM, Ebling FJ. The control of apocrine glands of the rabbit by steroid hormones. *J Endocr* 1971; 51:763-70.
- Barthe PL, Bullock LP, Mowszowicz I, Bardin WC, Orth DN. Submaxillary gland epidermal growth factor: a sensitive index of biologic androgen activity. *Endocrinology* 1974;95:1019-25.
- Vizoso F, Fueyo A, Allende MT, Fernández J, García Morán M, Ruibal A. Evaluation of human breast cysts according to their biochemical and hormonal composition, and cytologic examination. *Eur J Surg Oncol* 1990;16:209-14.
- Miller WR, Dixon JM, Scott WN, Forrest APM. Classification of human breast cysts according to electrolyte and androgen conjugate composition. *Clin Oncol* 1983;9:227-32.
- Dogliotti L, Orlahdi F, Torta M. Cations and dehydroepiandrosterone-sulphate in cyst fluid of the pre and menopausal patients with gross cystic disease of the breast. Evidence for the existence of subpopulations. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22:1301-7.
- Dixon JM, Scott WN, Miller WR. An analysis of the content and morphology of human breast microcysts. *Eur J Surg Oncol* 1985;11:151-4.
- Vizoso F. Fisiopatología de la enfermedad quística de la mama. *Cirugía Española* 1995;57:360-9.
- Suárez B, Vizoso F, Allende MT, Fernández M, Fernández B, Roig ML, Ruibal A. Active androgens in breast cyst fluids. *Int J Biol Markers* 1992;7:263-4.
- Raju U, Noumoff J, Levitz M, Bradlow HL, Breed CN. On occurrence and transport of estriol-3-sulphate in human breast fluid: the metabolic disposition of blood estriol-3-sulphate in normal women. *J Clin Endocrinol Metabol* 1981;53:847-51.
- Adams JB, Li K. Biosynthesis of 17-B-oestradiol in human breast carcinoma tissue and a novel method for its characterization. *Br J Cancer* 1975;31:429-33.
- Miller WR, Humeniak V, Forrest APM. Factors affecting dehydroepiandrosterone sulphate levels in human breast secretions. *Breast Cancer Res Treat* 1981; 1:267-72.
- Petrakis NL, Mason L, Lee K, Sugimoto B, Dawson S, Catchpool F. Association of race, age, menopausal status with breast fluid secretion in non-lactating women as determined by nipple aspiration. *J Natl Cancer Inst* 1975;54:829-33.
- Sartorius OW, Smith HS, Morris P, Benedict D, Friesen L. Cytologic evaluation of breast fluid in the detection of breast disease. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59:1073-8.
- Fernández A, Antuña B, López B, Bayón ML, Álvarez C, Sánchez MT, Lamelas ML, Vizoso F. Factores asociados con la obtención de fluido mamario a través del pezón: análisis de 1.230 mujeres no lactantes. *Rev Senología y Patol Mam* 1996;10:13-9.
- Miller WR, Hawkins RA, Creel RJ, Forrest APM. Oestrogen in breast fluid. *Lancet* 1977;2:1179.
- Miller WR, Humeniak V, Kelly RW. Dehydroepiandrosterone sulphate in breast secretions. *J Steroid Biochem* 1980;13:145-51.
- Hill P, Garbaczewski L, Wynder EL. Testosterone in breast fluid. *Lancet* 1983;1:761.
- Bocuzzi G, Brigandello E, Massobrio M, Bonino L. Breast duct dehydroepiandrosterone sulfate in fibrocystic disease. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23: 1099-102.
- Perel E, Wilkins D, Killinger DW. The conversion of androstenedione to estrone, estradiol and testosterone in breast tissue. *J Steroid Biochem* 1979;13: 89-94.
- Secreto G, Recchione C, Ballerini P, Callegari L, Cavalleri A, Attili A, Fariselli G, Moglia D, Del Prato I. Accumulation of active androgens in breast cyst fluids. *Eur J Cancer* 1991;27:44-7.
- 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*. Philadelphia: Saunders; 1986. p. 474-500.
- Sánchez LM, Vizoso F, Díez-Itza I, López-Otín C. Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast diseases. *Cancer Res* 1992;52:95-100.
- Sánchez LM, Freije JMP, 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;267:24725-31.
- Vizoso F, Sánchez LM, Díez-Itza I, Lamelas ML, López-Otín C. Factors affecting protein composition of breast secretions from nonlactating women. *Breast Cancer Res Treat* 1992;23:251-8.
- 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;271:803-7.
- Simard J, Hatton AC, Labrie C, Davois S, Zhao HF, Haagensen DE, Labrie F. Inhibitory effect of estrogens on GCDFF-15 mRNA levels and secretion in ZR-15-1 human breast cancer cells. *Mol Endocr* 1989;3:694-702.
- Simard J, Davois S, Haagensen DE, Lévesque C, Mérand Y, Labrie F. Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDFF-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer. *Endocrinology* 1990;126:3223-31.



29. López-Boado YS, Díez-Itza I, Tolivia J, López-Otín C. Glucocorticoids and androgen up-regulate the Z $\eta$ - $\alpha_2$ -glycoprotein messenger RNA in human cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1994;24:247-58.
30. Balbín M, López-Otín C. Hormonal regulation of the human pepsinogen C gene in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1996;271:15175-81.
31. Diamandis EP, Yu H, López-Otín C. Prostate specific antigen- a new constituent of breast cyst fluid. *Breast Cancer Res Treat* 1996;38:259-64.
32. Foretova L, Garber JE, Sadowsky NL, Verselis SJ, Li FP. Prostate-specific antigen in nipple aspirate. *Lancet* 1996;347:1631.
33. Zumoff B. Hormonal profiles in women with breast cancer [review]. *Anticancer Res* 1989;8:627-36.
34. Key TJA, Pike MC. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:29-43.
35. Garland CF, Friedlander NJ, Barrett-Connor E, Khaw KT. Sex hormones and postmenopausal breast cancer: a prospective study in an adult community. *Am J Epidemiol* 1992;135:1220-30.
36. Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Bush TL, Longcope C, Gordon GB, Comstock GW. A prospective study of endogenous hormones and breast cancer. *Cancer Detection Prevention* 1994;18:79-85.
37. Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, Banerjee S, Koenig KL, Shore RE, Strax P, Pasternack BS. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:190-7.
38. Key TJA, Wang DY, Brown JB, Hermon C, Allen DS, Moore JW, Bulbrook RD, Fentiman IS, Pike MC. A prospective study of urinary oestrogen excretion and breast cancer risk. *Br J Cancer* 1996;73:1615-9.
39. Grattarola R. Androgen in breast cancer. I. Atypical endometrial hyperplasia and breast cancer in married premenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1973;116:423-8.
40. Secreto G, Recchione C, Cavalleri A, Miraglia M, Dati V. Circulating levels of testosterone, 17-oestradiol, luteinising hormone and prolactin in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 1983;47:269-75.
41. Secreto G, Toniolo P, Pisani P, Recchione C, Cavalleri A, Fariselli G, Totis A, Di Pietro S, Berrino F. Androgens and breast cancer in premenopausal women. *Cancer Res* 1989;49:471-6.
42. Secreto G, Toniolo P, Berrino F, Recchione C, Cavalleri A, Pisani P, Totis A, Fariselli G, Di Pietro S. Serum and urinary androgens and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Res* 1991;51:2572-6.
43. McFadyen IJ, Forrest APM, Prescott RJ, Groom GV, Golder MP, Fahmy DR. Circulating hormone concentrations in women with breast cancer. *Lancet* 1976;1:1100-2.
44. Malarkey WB, Schroeder LL, Stevens VC, James AG, Lanese RR. Twenty-four hour preoperative endocrine profiles in women with benign and malignant breast disease. *Cancer Res* 1977;37:4655-9.
45. Hill P, Garbaczewski L, Kasumi F. Plasma testosterone and breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21:1265-6.
46. Takatani O, Nosano H, Okumoto T, Akamatsu K, Tamakuma S, Hiraide H. Distribution of estradiol and percentage of free testosterone in sera of Japanese women: preoperative breast cancer patients and normal controls. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:1199-204.
47. Key TJA, Chen J, Wang DY, Pike MC, Boreham J. Sex hormones in women in rural China and in Britain. *Br J Cancer* 1990;62:631-6.
48. Wang DY, Key TJA, Pike MC, Boreham J, Chen J. Serum hormone levels in British and rural Chinese females. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18:S41-S45.
49. Berrino F, Muti P, Micheli A, Bolelli G, Krogh V, Sciajno R, Pisani P, Panico S, Secreto G. Serum sex hormone levels after menopause and subsequent breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:291-6.
50. Wang DJ, Hayward JC, Bulbrook RD. Testosterone levels in the plasma of normal women and patients with benign breast disease or with breast cancer. *Eur J Cancer* 1966;2:373-6.
51. Wysowski DK, Comstock GW, Helsing KJ, Lan HL. Sex hormone levels in serum in relation to development of breast cancer. *Am J Epidemiol* 1987;125:791-9.
52. Pearce S, Dowsett M, McKinna JA. Albumin-bound and non-protein-bound oestradiol and testosterone in postmenopausal breast disease. *Eur J Cancer* 1991;27:259-63.
53. Langer M, Kubista E, Scheinger M, Spona J. Androgen receptors, serum androgen levels and survival of breast cancer patients. *Arch Gynecol Obstet* 1990;247:203-9.
54. Secreto G, Zumoff B. Paradoxical effects associated with supranormal urinary testosterone excretion in premenopausal women with breast cancer: increased risk of postmastectomy recurrence and higher remission rate after ovariectomy. *Cancer Res* 1983;43:3408-12.
55. Ballerini P, Oriana S, Duca P, Martinetti A, Venturelli E, Ferrari L, Dolci S, Secreto G. Urinary testosterone as a marker of risk of recurrence in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993;26:1-6.
56. Grattarola R, Secreto G, Recchione C, Castellini W. Androgens in breast cancer. II. Endometrial adenocarcinoma and breast cancer in married postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1974;118:173-81.
57. Grattarola R. Ovariectomy alone or in combination with dexamethasone in patients with advanced breast cancer and high levels of testosterone excretion. *J Natl Cancer Inst* 1976;56:11-9.
58. Secreto G, Boracchi P, Buzzoni R, Venturelli E, Cavalleri A, Dolci S. Testosterone levels as a marker of prognosis to goserelin treatment in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 1994;30:1629-31.
59. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993;15:48-65.
60. Mistry P, Griffiths K, Maynard PV. Endogenous C $_{19}$ -steroids and oestradiol levels in human primary breast tumour tissues and their correlation with androgen and oestrogen receptors. *J Steroid Biochem* 1986;24:1117-25.
61. Vermeulen A, Deslypere JP, Paridaens R, Leclercq G, Roy F, Heuson JC. Aromatase, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and intratissular sex hormone concentrations in cancerous and normal glandular breast tissue in postmenopausal women. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22:515-25.
62. Blanckstein MA, Maitimu-Smeele I, Donker GH, Daroszewski J, Milewicz A, Thijssen JHH. Tissue androgen and the endocrine autonomy of breast cancer. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992;43:167-71.

63. Recchione C, Venturelli E, Manzari A, Cavalleri A, Martinetti A, Secreto G. Testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol levels in postmenopausal breast cancer tissues. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995; 52:541-6.
64. Miller WR. Intra-mammary steroid transformation: implications for tumorigenesis and natural progression. En: Krey LC, Gulyas BJ, McCracken JA, eds. *Autocrine and paracrine mechanisms in reproductive endocrinology*. New York: Plenum; 1989;19:209-52.
65. James VHT, Reed MJ, Adams EF. Oestrogen uptake and metabolism *in vivo*. *Proc R Soc (Edin)* 1989; 95B:203-17.
66. Miller WR, O'Neill JS. The relevance of local oestrogen metabolism within the breast. *Proc R Soc (Edin)* 1989;95B:203-17.
67. Miller WR, Telford J, Dixon JM, Shivas AA. Androgen metabolism and apocrine differentiation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1985;5: 67-73.
68. Marugo M, Bernasconi D, Miglietta L, Fazzuoli L, Ravera F, Cassulo S, Giordano G. Effects of dihydrotestosterone and hydroxyflutamide on androgen receptors in cultured human breast cancer cells (EVS-T). *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992;42:547-54.
69. Hall RE, Birrell SN, Tilley WD, Sutherland RL. MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *Eur J Cancer* 1994;30:484-90.
70. Simon WE, Albrecht M, Trams G, Dietel M, Holzel F. *In vitro* growth promotion of human mammary carcinoma cells by steroid hormones, tamoxifen and prolactin. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:313-21.
71. Schwartz AG. Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H (A/a) mice by long term treatment with dehydroepiandrosterone. *Cancer Res* 1979;39:1129-32.
72. Teller MN, Hellman L, Stock CC, Fishman J, Bowie M, McMahon S. Antitumor activity of adrenal and gonadal steroid hormones and metabolites against DMBA-induced rat mammary tumors [abstract]. *Proc 69th Ann Mtg Am Ass Cancer Res* 1978;42.
73. Ratko TA, Detrisac CJ, Metha RG, Kelloff GJ, Moon RC. Inhibition of rat mammary gland chemical carcinogenesis by dietary dehydroepiandrosterone or a fluorinated analogue of dehydroepiandrosterone. *Cancer Res* 1991;51:481-6.
74. Poulin R, Baker D, Labrie F. Androgens inhibit basal and estrogen-induced cell proliferation in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Breast Cancer Res Treat* 1988;12:213-25.
75. Dauvois S, Li S, Martel C, Labrie F. Inhibitory effect of androgens on DMBA-induced mammary carcinoma in the rat. *Breast Cancer Res Treat* 1989;14:299-306.
76. Boccuzzi G, Di Monaco M, Brignardello E, Leonardi L, Gatto V, Pizzini A, Gallo M. Dehydroepiandrosterone anti-oestrogenic action through androgen receptor in MCF-7 human breast cancer cell line. *Anticancer Res* 1993;13:2267-72.
77. Boccuzzi G, Brignardello E, Di Monaco M, Gatto V, Leonardi L, Pizzini A, Gallo M. 5-en-androstene-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells when oestrogen receptors are blocked by oestradiol. *Br J Cancer* 1994;70:1035-9.
78. Di Monaco M, Leonardi L, Gatto V, Gallo M, Brignardello E, Boccuzzi G. Dihydrotestosterone affects the growth of hormone-unresponsive breast cancer cells: an indirect action. *Anticancer Res* 1995;15:2581-4.
79. Lippman M, Dickson R. Mechanism of normal and malignant breast epithelial growth regulation. *J Steroid Biochem* 1984;34:107-21.
80. Dickson R, Thompson E, Lippman M. Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J Steroid Biochem* 1984; 34:107-21.
81. Noguchi S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Down-regulation of transforming growth factor-alpha by tamoxifen in human breast cancer. *Cancer* 1993; 72:131-6.
82. Benz D, Haussler M, Thomas M, Speelman B, Komm B. High affinity androgen binding and androgenic regulation of alpha (I)-procollagen and transforming growth factor- $\beta$  steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1991;128:2723-30.
83. Olsen N, Zhou P, Ong H, Kovacs W. Testosterone induces expression of transforming growth factor- $\beta$  1 in the murine thymus. *J Steroid Biochem* 1993;45:327-32.
84. Boccuzzi G, Brignardello E, Di Monaco M, Forte C, Leonardi L, Pizzini A. Influence of dehydroepiandrosterone and 5-en-androsterone-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol on the growth of MCF-7 human breast cancer cells induced by 17 $\beta$ -estradiol. *Anticancer Res* 1992;12:799-804.
85. Spinola PG, Marchetti B, Labrie F. Adrenal steroids stimulate the growth of dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced rat mammary tumors [abstract]. *J Steroid Biochem* 1985;23:46S.
86. Secreto G, Venturelli E, Bucci A, Piromalli D, Fariselli G, Galante E. Intratumour amount of sex steroids in elderly breast cancer patients. An approach to the biological characterization of mammary tumours in the elderly. *J Steroid Biochem Biol* 1996;58:557-61.
87. Valentini B, Silvestrini R, Daidone MG, Coradini D, Galante E, Cerrotta AM, Abolafio G, Arboit L. 3H-thymidine labelling index, hormone receptors and ploidy in breast cancers from elderly patients. *Breast Cancer Res Treat* 1991;20:19-24.
88. Clark GM. The biology of breast cancer in older women. *J Gerontol* 1992;47:19-23.
89. Ingram DM, Roberts A, Nottage EM. Host factors and breast cancer growth characteristics. *Eur J Cancer* 1992;28A:1153-61.
90. Hahnel R, Twaddle E. The steroid specificity of the estrogen receptor of human breast carcinoma. *J Steroid Biochem* 1974;5:119-22.
91. Zava DT, McGuire WL. Androgen action through estrogen receptor in human breast cancer cell line. *Endocrinology* 1978;103:624-31.
92. Pasqualini JR, Schatz B, Varin C, Nguyen BL. Recent data on estrogen sulfatases and sulfotransferases activities in human breast cancer. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992;41:323-9.
93. Bolufer P, Ricart E, Lluch A, Vázquez C, Rodríguez A, Ruiz A, et al. Aromatase activity in human breast cancer: its relationship to estradiol and epidermal growth factor receptors and to tumor-node-metastasis staging. *J Clin Oncol* 1992;10:438-46.
94. Reed MJ. The role of aromatase in breast tumours. *Breast Cancer Res Treat* 1994;30:7-17.
95. O'Neill JS, Elton RA, Miller WR. Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumour site. *Br J Cancer* 1988;296:741-3.



96. Persijn JP, Korsten CB, Engelsman E. Oestrogen and androgen receptors in breast cancer and response to endocrine therapy. *Br Med J* 1975;4:503.
97. Trams G, Maass H. Specific binding of estradiol and dihydrotestosterone in human mammary cancers. *Cancer Res* 1977;37:258-61.
98. Seibert K, Lippman M. Hormone receptors in breast cancer. En: Baum M, ed. *Clinics in oncology*. London: WB Saunders; 1982;1:735-94.
99. Mercer RJ, Lie TH, Rennie GC, Bennett RC, Morgan FJ. Hormone receptor assays in breast cancer. A 5-year experience. *Med J Aust* 1983;1:365-9.
100. Bryan RM, Mercer RJ, Bennett RC, Rennie GC, Lie TH, Morgan FJ. Androgen receptors in breast cancer. *Cancer* 1984;54:2436-40.
101. Miller WR, Telford J, Dixon JM, Hawkins RA. Androgen receptor activity in human breast cancer and its relationship with oestrogen and progestogen receptor activity. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21:539-42.
102. Valyani SH, Roberts JV, Colletta AA, Iqbal JM. Sex hormone receptors in human breast cancer. Incidence and inter-relationship. *Anticancer Res* 1987;7:1281-4.
103. Kuenen-Boumeester V, Van Der Kwast TH, Van Putten WLJ, Claassen C, Van Ooijen B, Henzen-Logmans SC. Immunohistochemical determination of androgen receptors in relation to oestrogen and progesterone receptors in female breast cancer. *Int J Cancer* 1992;52:581-4.
104. Kuenen-Boumeester V, Van Der Kwast TH, Claassen CC, Look MP, Liem GS, Klijn JGM, Henzen-Logmans SC. The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer* 1996;32:1560-5.
105. Isola JJ. Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *J Pathol* 1993;170:31-5.
106. Teulings FAG, Van Gilse HA, Henkelman H, Alexieva-Figusch J. Estrogen, androgen, glucocorticoid and progesterone receptors in progestin-induced regression of human breast cancer. *Cancer Res* 1980;40:2557-61.
107. Hackenberg R, Hawighorst T, Filmer A, Huschmand Nia A, Schulz K. Medroxyprogesterone acetate inhibits the proliferation of estrogen- and progesterone-receptor negative MFM-223 human mammary cancer cells via the androgen receptor. *Breast Cancer Res Treat* 1993;25:217-24.
108. Vedscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GGJM, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, Van Rooij HCJ, Brinkmann AO, Mulder E. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:534-40.
109. Taplin M-E, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 1995;332:1393-8.
110. Díez-Itza I, Sánchez LM, Allende MT, Vizoso F, Ruibal A, López-Otín C. Zn- $\alpha_2$ -glycoprotein levels in breast cancer cytosols and correlation with clinical, histological and biochemical parameters. *Eur J Cancer* 1993;29A:1256-60.
111. Díez-Itza I, Vizoso F, Merino AM, Sánchez LM, Tolivia J, Fernández J, Ruibal A, López-Otín C. Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am J Pathol* 1994;144:310-20.
112. Wick MR, Lillemoc TJ, Copland GT, Swanson PE, Manivel C, Kiang DT. Goss cystic disease fluid protein-15 as a marker for breast cancer: immunohistochemical analysis of 690 human neoplasms and comparison with  $\alpha$ -lactalbumin. *Human Pathol* 1989;20:281-7.
113. Vizoso F, Sánchez LM, Díez-Itza I, Merino AM, López-Otín C. Pepsinogen C is a new prognostic marker in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:54-61.