

F. Vizoso*,
J. Vázquez**,
C. Villar*,
A. Andicoechea*,
M. L. Lamelas**,
E. Plaza***,
E. Cuesta*

pH y composición proteica de las secreciones mamarias de mujeres no lactantes

pH and the protein composition of breast secretions in nonlactating women

SUMMARY

Here we analyze the pH value and protein composition of the breast secretions obtained from the nipple in 48 control women, 37 with breast benign nonlactating pathology and 14 with breast cancer, all of them women. Of all of them, 63 (63.6%) presented type I secretions (majority of protein components: α_2 -zn-glycoprotein, apolipoprotein D and GCDFP-15), whereas 36 (36.4%) showed type II secretions (lactoferrin, lysozyme and α -lactoalbumine). In addition, there was a wide variability of the pH values of the breast secretions from womens (mean: 7.3 ± 0.4 ; range: 6.4-8.5). The women that were pregnant in the last four years prior to the study showed a percentage significantly ($p < 0.001$) higher of type II secretions (85%) and of pH value (7.61 ± 0.001) ($p < 0,01$) than in nulliparous women (10% of type II secretions; pH: 7.24 ± 0.33) or women that had a pregnancy more than four years ago (26% of type II secretions; pH: 7.28 ± 0.34). On the other hand, if we excluded the first group of women, breast cancer patients showed a percentage significantly ($p < 0.01$) higher of type II secretions (57%) and of pH values ($p < 0.05$) than patients with breast benign disease (18% of type II secretions; pH: 7.25 ± 0.27) and than women of the world group (8% of type II secretions; pH: 7.22 ± 0.36). Finally, our results demonstrate the existence of a significative association between protein composition from breast secretions and the value of their pH, being those values significantly ($p < 0.0001$) higher in type II (7.61 ± 0.36) than in those type I secretions (7.13 ± 0.30). Thus, our results demonstrate the existence of a wide variability of the pH values from breast secretions, and that the pH value may represent an useful biochemical marker of the protein composition from breast secretions of nonlactating women.

Palabras clave

pH, Fluido mamario, Secreción mamaria.

Key words

pH, Breast fluid, Breast secretion.

* Servicio de Cirugía General.
** Servicio de Ginecología.
*** Servicio de Anestesiología.
Hospital de Jove. Gijón
(Asturias).

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

INTRODUCCIÓN

El análisis del fluido mamario obtenido a través del pezón en mujeres no lactantes representa un método rápido y no invasivo de acceder a las características morfológicas y metabólicas del epitelio mamario. Así, estudios citológicos de esas secreciones mamarias

han revelado la presencia de células epiteliales anormales en mujeres con enfermedades mamarias y han permitido identificar mujeres con un riesgo mayor de desarrollar carcinoma mamario en relación a la población normal.¹⁻⁵ Por otra parte, análisis bioquímicos de esos fluidos biológicos han permitido identificar una variedad de sustancias que pueden desempeñar

un cierto papel en la transformación maligna. Esas sustancias acumuladas en los fluidos mamarios incluyen hormonas,^{6,7} componentes tóxicos,⁸ agentes mutáneos⁹⁻¹¹ y antígenos asociados a tumores.¹²⁻¹⁴

En esta línea, y como parte de nuestros estudios sobre las secreciones mamarias, recientemente describimos que esas secreciones obtenidas a través del pezón pueden ser clasificadas en dos tipos principales de acuerdo a sus componentes proteicos mayoritarios.¹⁵ Así, las secreciones tipo I están caracterizadas por la presencia de zn- α_2 -glicoproteína, apolipoproteína D y la proteína de 15 Kda (GCDFP-15), que son todas ellas componentes proteicos mayoritarios del fluido quístico de la enfermedad macroquística de la mama, mientras que las secreciones tipo II están caracterizadas por la presencia de lactoferrina, lisozima y α -lactoalbúmina, que son todas ellas componentes proteicos de la leche humana. Además en un estudio posterior pudimos comprobar que después de excluir las mujeres que utilizaban anticonceptivos orales y aquellas con embarazo a término en los último 4 años previos al estudio el porcentaje de mujeres con cáncer de mama y secreciones tipo II (47%) era significativamente más elevado en relación al de mujeres con patología mamaria benigna (16%) y al de las mujeres controles (7%).¹⁶ Por otro lado, las mujeres no lactantes con secreciones mamarias tipo II, obtenidas a través del pezón, pueden constituir una atractiva población para realizar estudios de prevención del cáncer de mama.

Teniendo en cuenta que el valor del pH muestra una amplia variabilidad individual en el fluido quístico de las mujeres afectas de enfermedad macroquística mamaria y que es un válido marcador del tipo de quiste,^{17,18} el objetivo del presente estudio ha sido analizar los valores del pH de las secreciones mamarias obtenidas a través del pezón y su relación con la presencia de patología mamaria, así como evaluar su posible valor como marcador bioquímico del patrón proteico de esos fluidos biológicos obtenidos de mujeres no lactantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada

Para este estudio fueron seleccionadas 99 mujeres de un total de 188 en las que se intentó obtener

fluido mamario a través de pezón y que acudieron consecutivamente al Hospital de Jove de Gijón. Los criterios considerados para la selección de esas mujeres fueron la de la obtención de al menos 20 μ l de fluido mamario a través del pezón, volumen mínimo requerido para la realización de los análisis bioquímicos, así como también que ninguna de ellas recibiese tratamiento hormonal al menos 6 meses previos al estudio, no padeciese ninguna enfermedad endocrinológica ni tampoco galactorrea espontánea.

De esas 99 pacientes finalmente seleccionadas en base a todos los criterios arriba señalados, 48 eran mujeres controles (edad media: $41,6 \pm 8,4$ años; intervalo: 27-63) sin patología mamaria, 37 con patología mamaria benigna (edad media: $40,8 \pm 6,5$ años; intervalo: 29-54) y 14 con cáncer mamario previamente a su tratamiento (edad media: $51 \pm 8,9$; intervalo: 36-69).

Las mujeres sin patología mamaria fueron voluntarias procedentes de la clínica de planificación familiar o de la clínica médica general, y en ellas fue excluida la presencia de patología mamaria maligna o benigna mediante exploración física, mamografía y/o ecografía mamaria. El diagnóstico de enfermedades mamarias benignas se estableció mediante estudios clínicos, mamográficos, ecográficos, citológicos y/o histológicos. De las mujeres procedentes de este grupo, 22 fueron diagnosticadas de mastopatía fibroquística, 10 de enfermedad macroquística de la mama y cinco de fibroadenomas. Los casos de cáncer mamario fueron confirmados por biopsia, y se trataban todos ellos de carcinoma ductal de tipo infiltrante. Todas las mujeres participantes en el estudio respondieron un detallado cuestionario acerca de su historia médica y reproductiva. El estado menopáusico fue determinado por la ausencia de menstruaciones cíclicas durante al menos un año previamente al estudio.

Obtención de secreciones mamarias y determinaciones de su pH

Los fluidos mamarios fueron obtenidos en la primera consulta clínica de las mujeres y mediante compresión manual de los cuatro cuadrantes periareolares del pezón recogidos por medio de tubos capilares y transferidos a un tubo de microcentrifuga. Dicha obtención del fluido mamario se realizó siempre previamente a cualquier tipo de intervención qui-

rúrgica. El volumen de secreciones mamarias varió de 20 a 265 μ l. Tras su obtención se determinó inmediatamente su pH mediante un pHímetro Crison (modelo 506). Posteriormente las muestras fueron almacenadas congelándolas a -20° C hasta la realización de los otros análisis bioquímicos. En 36 mujeres se pudieron obtener secreciones a través del pezón en ambas mamas, y esos fluidos fueron analizados separadamente.

Clasificación de las secreciones mamarias mediante electroforesis en geles de poliacrilamida

Las muestras de fluido mamario fueron analizadas mediante electroforesis en geles homogéneos de poliacrilamida al 12% de 0,5 mm de grosor a 50 mA durante 30 minutos en un aparato Bio-Rad de acuerdo al método de Laemmli.¹⁹ Con el objeto de abolir la interferencia de inmunoglobulinas, las muestras fueron tratadas con un tampón no reductor previamente al análisis electroforético. Finalmente, las proteínas fueron clasificadas de acuerdo a la composición de sus componentes proteicos mayoritarios y siguiendo nuestra clasificación previa.¹⁵ Las secreciones tipo I mostraron bandas distintas de 44, 24 y 17 kDa, mientras que las de tipo II exhibieron bandas de 80, 15 y 14 kDa (Fig. 1).

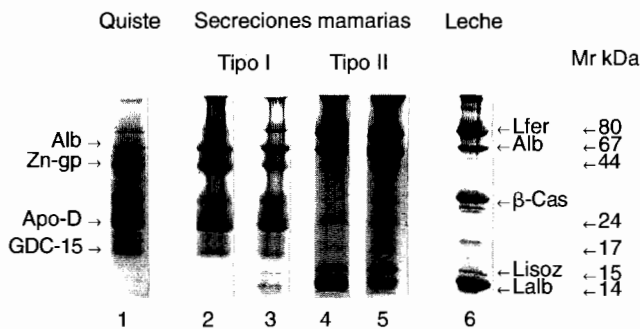


Fig. 1. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% de las proteínas de las secreciones mamarias, leche humana y fluido quístico. Las alícuotas (1 μ l) de fluido quístico (línea 1), leche humana (línea 6) y las representativas de la población estudiada (líneas 2, 3, 4 y 5) fueron tratadas con un tampón no reductor. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Ordenadas a izquierda y derecha están representadas las movilidades relativas y las masas moleculares en kilodaltons de la lactoferrina (Lfer), albúmina (Alb), β -caseína (β -Cas), lisozima (Lisoz), α -lactoalbúmina (Laib), Zn- α_2 -glicoproteína (Zn-gp), apolipoproteína D (Apo-D) y GCD-15 (GDC-15).

Análisis estadísticos

La significación estadística de las asociaciones entre los diferentes factores individuales de las mujeres y la composición proteica de las secreciones mamarias fue evaluada utilizando la prueba del Chi cuadrado. El test del análisis de la varianza (ANOVA) y el test de la «t» de Student fueron utilizados para comparar las medias de los valores de pH de las secreciones mamarias entre los diferentes grupos. En los casos en que se obtuvo secreción de ambas mamas, y con el objeto de evaluar los valores de pH en relación a las características de las pacientes, se consideró el valor obtenido de la secreción de la mama afecta en el caso de patología mamaria, o bien la media de los valores de pH en el caso de las mujeres sin patología mamaria. El coeficiente de correlación y las ecuaciones de regresión se calcularon por el método del cuadrado mínimo. Los valores de pH están representados como la media \pm desviación estándar (DE). El nivel de significación establecido fue del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Incidencia de los factores proteicos de las secreciones mamarias

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida de los fluidos mamaros confirmó nuestra descripción previa acerca de la existencia de dos tipos principales de secreciones en base a la composición de sus componentes proteicos mayoritarios (Fig. 1). Del total de las mujeres del estudio, 63 mujeres (63,6%) presentaron secreciones tipo I (componentes proteicos mayoritarios: Zn- α_2 -glicoproteína, apolipoproteína D y GCD-15) y 36 (36,4%) tuvieron secreciones tipo II (lactoferrina, lisozima y α -lactoalbúmina). Además, en 36 mujeres que pudimos obtener secreción de ambas mamas mostraron en ellas el mismo patrón polipeptídico de las secreciones mamarias.

Por otra parte, como se puede observar en la tabla 1, y de acuerdo con los datos previamente publicados por nuestro grupo,¹⁵ el porcentaje de secreciones tipo II fue significativamente ($p < 0,001$) superior en las mujeres que fueron gestantes en los 4 años previos al estudio (85%) en relación a las mujeres nulíparas o aquellas mujeres que habían sido gestantes hacía más de

TABLA 1
DISTRIBUCIÓN DE LOS PATRONES PROTEICOS Y DE LOS VALORES DE pH DE LAS SECRECIONES MAMARIAS DE ACUERDO A LA PARIDAD DE LAS MUJERES

Paridad	Años de embarazo	Núm. de mujeres	Tipo de secreción		Valores de pH	
			I	II	Media ± DE	Intervalo
Nulíparas ...	—	10	9 (90%)	1 (10%)	7,24 ± 0,33	6,7-7,63
Multiparas ..	1-4	20	3 (15%)	17* (85%)	7,61 ± 0,47	6,9-8,5**
	>4	69	51 (74%)	18 (26%)	7,28 ± 0,34	6,4-8,01

Entre paréntesis figura el porcentaje de los casos. *p < 0,001 y **p < 0,01 vs mujeres nulíparas y vs mujeres multiparas con último embarazo hace más de 4 años.

4 años (10 y 26%, respectivamente). Por tanto, ese hallazgo apoya hipótesis previas de que el embarazo y la lactancia tienen efecto por un largo tiempo sobre el medio hormonal de la mama. Así pues, tras excluir ese grupo de mujeres con embarazo a término en los 4 años previos a la obtención de las secreciones mamarias, y también de acuerdo con nuestros resultados previos, pudimos comprobar que las secreciones tipo I fueron las más habituales en las mujeres controles y en aquellas con patología mamaria benigna, mientras que las pacientes con cáncer de mama mostraron mayor porcentaje de secreciones tipo II (57%) que las pacientes con patología mamaria benigna (18%), y significativamente (p < 0,01) superior al de las mujeres controles (8%) (tabla 2).

TABLA 2
DISTRIBUCIÓN DE LOS PATRONES PROTEICOS Y DE LOS VALORES DE pH DE LAS SECRECIONES MAMARIAS EN MUJERES CON DIFERENTES PATOLOGÍAS MAMARIAS*

Patología mamaria	Núm. de mujeres	Tipo de secreción		Valores de pH	
		I	II	Media ± DE	Intervalo
No patología	36	33 (92%)	3 (8%)	7,22 ± 0,36	6,4-8,01
Benigna	29	21 (72%)	8 (18%)	7,25 ± 0,27	6,8-7,8
Maligna	14	6 (43%)	8** (57%)	7,47 ± 0,33	6,8-8***

Entre paréntesis figura el porcentaje de los casos. * No se consideraron las mujeres que fueron gestantes en los últimos 4 años. ** p < 0,01 vs mujeres sin patología mamaria. *** p < 0,05 vs mujeres sin patología mamaria y vs mujeres con patología mamaria benigna.

TABLA 3
VALORES DE pH DE TODAS LAS SECRECIONES Y DE ACUERDO AL TIPO DE PATRÓN PROTEICO

Tipo de secreción	Núm. de mujeres	Valores de pH		
		Media ± DE	Mediana	Intervalo
Tipo I	86	7,13 ± 0,30	7,20	6,40-7,66
Tipo II	49	7,61 ± 0,36	7,60	6,80-8,50
Total	135	7,30 ± 0,40	7,33	6,40 -8,50

p < 0,0001.

Valores de pH de las secreciones mamarias

Los valores de pH de las secreciones mamarias obtenidas a través el pezón en el grupo de estudio mostraron una amplia variabilidad individual (n = 135; media: 7,3 ± 0,4; intervalo: 6,4-8,5) (tabla 3). Además esos valores de pH de las secreciones mamarias mostraron diferencias significativas en función de paridad de las mujeres y de la patología mamaria. Así, como muestra la tabla 1, los valores de pH fueron significativamente (p < 0,01) más bajos en las mujeres con embarazo a término en los 4 años previos al estudio que en las nulíparas y aquellas que fueron gestantes hacía más de 4 años. Asimismo, después de excluir aquel primer grupo de mujeres pudimos comprobar que los valores de pH fueron significativamente (p < 0,05) más elevadas en las secreciones de las mujeres con cáncer de mama en relación a esas con patología mamaria benigna o sin patología mamaria (tabla 2). Finalmente, aunque las mujeres postmenopáusicas mostraron un valor medio de pH (n = 17; media: 7,41 ± 0,32; intervalo: 6,8-8) más elevado que las premenopáusicas (n = 82; media: 7,24 ± 0,33; intervalo: 6,4-8,01), esas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por otra parte, en las mujeres en las que pudimos obtener fluidos a través del pezón de ambas mamas, observamos la existencia de una correlación significativamente positiva entre los valores de pH de esas diferentes secreciones mamarias (R = 0,78; p < 0,0001) (Fig. 2).

Relación entre el patrón proteico y los valores de pH de las secreciones mamarias

Como muestra la tabla 3, en el conjunto de las secreciones mamarias, e independientemente de las

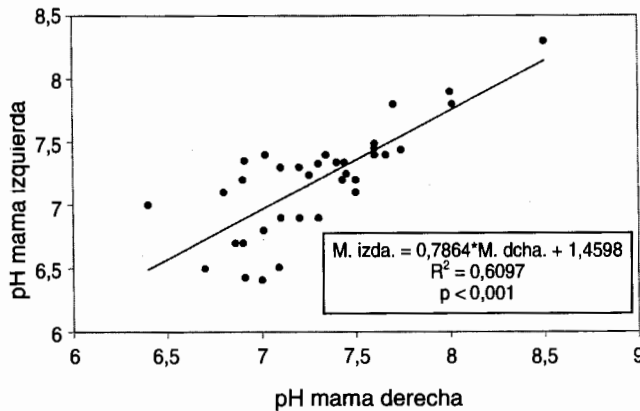


Fig. 2. Relación entre los valores de pH de ambas mamas en 36 mujeres no lactantes.

características de las pacientes, existieron diferencias significativas de sus valores de pH en función del patrón polipeptídico de las mismas. Así, los valores de pH fueron significativamente ($p < 0,0001$) más elevados en las secreciones tipo II ($n = 49$; media: $7,61 \pm 0,36$; intervalo: 6,8-8,5) que en las de tipo I ($n = 86$; media: $7,13 \pm 0,30$; intervalo: 6,4-7,66).

DISCUSIÓN

En primer lugar, los resultados de este estudio confirman nuestros resultados previos acerca del elevado porcentaje de secreciones mamarias tipo II caracterizadas por la presencia de proteínas lácteas, en mujeres con embarazo a término en los últimos 4 años previos al análisis, así como también en esas mujeres afectas de carcinoma de mama.^{15, 16} Por otra parte, los datos de este trabajo revelan la existencia de una alta variabilidad de los valores de pH de esas secreciones mamarias obtenidas a través del pezón en mujeres no lactantes y que parecen estar relacionadas con su tipo de patrón polipeptídico.

Los datos existentes hasta la fecha sobre el pH de las secreciones mamarias de mujeres no lactantes estaban referidos únicamente al fluido quístico de las mujeres afectadas de enfermedad macroquística de la mama. Así, en relación a ese fluido biológico diversos autores también describieron que presenta una alta variabilidad de sus valores de pH, con un intervalo de valores similar al descrito en el presente estudio para las secreciones obtenidas a través del pezón.^{17, 18, 20} Además, también se ha propuesto que

el valor de pH representa un marcador válido del tipo de quiste mamario,¹⁷ ya que los quistes denominados como tipo I (alta relación K^+/Na^+ intraquística y epitelio de recubrimiento de tipo apocrino) presentan valores de pH inferiores a los del plasma, mientras que en los quistes tipo II (baja relación K^+/Na^+ y epitelio tipo plano) esos valores son significativamente más elevados.^{17, 18, 20} Así pues, los valores de pH quístico parecen reflejar la actividad funcional de su epitelio.

Si bien desconocemos en la actualidad la verdadera significación biológica de los valores de pH de las secreciones mamarias obtenidas a través del pezón en mujeres no lactantes, nuestros resultados nos inducen a considerar que esos valores de concentración de protones pueden estar también en relación con la actividad funcional del epitelio mamario de esas mujeres. En este sentido los datos mostrados en este trabajo revelan la existencia de valores elevados de pH en las mujeres con embarazo a término en los 4 años previos al estudio y en las pacientes con cáncer de mama en relación a los otros grupos de mujeres. Si bien, de acuerdo a este estudio preliminar, esas diferencias parecen estar más en relación con el tipo de patrón polipeptídico de esas secreciones mamarias, ya que las secreciones de tipo II mostraron unos valores de pH significativamente más elevados que aquellas de tipo I.

En base a lo anteriormente expuesto, los resultados de este estudio indicando la existencia de unos valores de pH más elevados en las pacientes afectas de cáncer mamario en relación a las controles están de alguna forma en contraposición con los datos publicados en la literatura acerca de un mayor riesgo de desarrollar carcinoma de mama en las mujeres que muestran quistes tipo I (alta relación K^+/Na^+ y valores bajos de pH) en relación a las que muestran quistes tipo II (baja relación K^+/Na^+ y valores más elevados de pH).^{21, 22} Sin embargo, existen razones que pueden justificar esa aparente discrepancia. Así, en primer lugar, cabe señalar que otros autores no detectaron esa asociación entre el tipo de quiste mamario y el riesgo de cáncer de mama.²³ Además, otros estudios basados en el seguimiento clínico de pacientes afectas de enfermedad macroquística de la mama,²⁴ o en datos bioquímicos del fluido quístico,²⁵ sugieren que el tipo de quiste representa más bien el estadio evolutivo de la enfermedad, correspondiendo los tipos II al estadio más evolucionado.

Por otra parte, el valor del pH de las secreciones mamarias más que un marcador de riesgo de carcinoma puede representar un indicador bioquímico de la calidad de la secreción mamaria. En relación a este aspecto los valores intraquísticos más bajos de pH en los quistes tipo I parecen estar en relación con el tipo de secreción apocrina que muestran estos quistes.²⁵ Además también cabe señalar que el patrón polipeptídico de las secreciones tipo I obtenidas a través del pezón en las mujeres no lactantes, y caracterizado por la apolipoproteína D, Zn- α_2 -glicoproteína y GCDFP-15, como componentes proteicos mayoritarios, es el mismo que el presente en el fluido de los quistes mamarios^{26, 27} y que esas proteínas mayoritarias han sido propuestas como antígenos marcadores de diferenciación apocrina.^{26, 28} Por el contrario, las secreciones tipo II, caracterizadas por la presencia de proteínas lácteas como componentes proteicos mayoritarios y también, como reflejan nuestros resultados, con unos valores de más elevados de pH, pueden corresponder a una diferente actividad funcional y estimulación hormonal del epitelio mamario. Así, en relación a este último aspecto, se ha demostrado que las mujeres no lactantes con secreciones tipo II muestran una mayor capacidad de liberación pituitaria de prolactina.²⁹

En definitiva nuestros resultados parecen indicar la existencia de una amplia variabilidad de los valores de pH en las secreciones mamarias de mujeres no lactantes que pueden estar en relación con la actividad funcional de su epitelio. Además, que el valor de pH de esos fluidos mamarios puede representar un marcador bioquímico, fácilmente medible, del tipo de su composición proteica. Por tanto, la determinación del pH en las secreciones mamarias puede tener interés clínico de cara a futuras investigaciones la fisiopatología mamaria.

RESUMEN

En este estudio hemos analizado el pH y la composición proteica de las secreciones mamarias obtenidas a través del pezón en 48 mujeres controles, 37 con patología mamaria benigna y 14 con cáncer de mama, todas ellas no lactantes. De todas las mujeres del estudio, 63 (63,6%) presentaron secreciones tipo I (componentes proteicos mayoritarios: Zn- α_2 -glicoproteína, apolipoproteína D y GCDFP-15), mien-

tras que 36 (36,4%) mostraron secreciones tipo II (lactoferrina, lisozima y α -lactoalbúmina). Asimismo existió una amplia variabilidad de los valores de pH de las secreciones mamarias de las mujeres (media: $7,3 \pm 0,4$; intervalo: 6,4-8,5). Las mujeres que fueron gestantes en los 4 años previos al estudio presentaron un porcentaje significativamente ($p < 0,001$) más elevado de secreciones tipo II (85%) y de valores de pH ($7,61 \pm 0,47$) ($p < 0,01$) en relación a aquellas mujeres nulíparas (10% de secreciones tipo II; pH: $7,24 \pm 0,33$) o que habían sido gestantes hacía más de 4 años (26% de secreciones tipo II; pH: $7,28 \pm 0,34$). Por otra parte, si excluimos a aquel primer grupo de mujeres, las pacientes con cáncer de mama mostraron un porcentaje (57%) de secreciones tipo II significativamente más elevados ($p < 0,01$) y de valores de pH ($7,47 \pm 0,33$) ($p < 0,05$) en relación a las pacientes con patología mamaria benigna (18% de secreciones tipo II; pH: $7,25 \pm 0,27$) y a las mujeres controles (8% de secreciones tipo II; pH: $7,22 \pm 0,36$). Finalmente nuestros resultados también demostraron la existencia de una asociación significativa entre el tipo de composición proteica de las secreciones mamarias y el valor de su pH, siendo esos valores significativamente ($p < 0,0001$) más elevados en las secreciones tipo II ($7,61 \pm 0,36$) que en las tipo I ($7,13 \pm 0,30$).

Así pues, nuestros resultados demuestran la existencia de una amplia variabilidad de los valores de pH de las secreciones mamarias y que el valor del pH puede representar un marcador bioquímico útil del tipo de composición proteica de las secreciones mamarias de mujeres no lactantes.

REFERENCIAS

1. 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.
2. King EB, Chew KL, Petrakis NL. Nipple aspirate cytology for the study of breast cancer precursors. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:1115-21.
3. Wrensch MR, Petrakis NL, King EB, Miike R, Mason L, Chew KL, et al. Breast cancer incidence in women with abnormal cytology in nipple aspirates of breast fluid. *Am J Epidemiol* 1992;135:130-41.
4. Wrensch MR, Petrakis NL, King EB, Lee MM, Miike R. Breast cancer risk associate with abnormal cytology in nipple aspirates of breast fluid and prior history of breast biopsy. *Am J Epidemiol* 1993;137:829-83.
5. Sauter ER, Ross E, Daly M, Klein-Szanto A, Engstrom PF, Sorling A, et al. Nipple aspirate fluid: a promising non-invasive method to identify cellular markers of breast cancer risk. *Br J Cancer* 1997;76:494-501.

6. Rose DP, Tilton K, Lahti H, Wynders EL. Progesterone levels in breast duct fluid. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22:111-3.
7. Hill P, Garbaczewski L, Wynder EL. Testosterone in breast fluid. *Lancet* 1983;1:761.
8. Petrakis NL, Guenke LD, Beele TC, Craig JC, Castagnoli N. Nicotine in breast fluid of nonlactating women. *Science* 1978;199:303-4.
9. Petrakis NL, Maack A, Lee R, Lyon M. Mutagenic activity in nipple aspirates of human breast fluid. *Cancer Res* 1980;40:188-9.
10. Petrakis NL, Dupuy ME, Lee RE, Lyon M, Maack CA, Gruenke LD, et al. Mutagens in nipple aspirates of breast fluids. *Bambrury Report* 1982;13:67-82.
11. Scott WN, Miller WR. The mutagenic activity of human breast secretions. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:499-502.
12. Mori T, Inaji H, Higashiyama M, Yayoi E, Izuo M, Ueno E, et al. Evaluation of dot-immunobinding assay for carcinoembryonic antigen determination in nipple discharge as an adjunct in the diagnosis of early breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1989;19:373-9.
13. Inaji H, Koyama H, Motomura K, Noguchi S, Mori Y, Kimura Y, et al. ErbB-2 protein levels in nipple discharge: role in diagnosis of early breast cancer. *Tumor Biol* 1993;14:271-8.
14. Sánchez LM, Vizoso F, Allende MT, Ruibal A, López-Otín C. Quantification and molecular analysis of cathepsin D in breast fluids. *Eur J Cancer* 1992;28A:828-32.
15. 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.
16. 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.
17. Bradlow HL, Breed CN, Nisselbaum JS, Fleisher M, Schwartz MK. pH as a marker of breast cyst fluid biochemical type. *Eur Surg Oncol* 1987;13:331-4.
18. 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;16:209-14.
19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 1970;227:680-5.
20. Dixon JM, Miller WR, Scott WN. pH of human cysts fluids. *Clin Oncol* 1984;10:721-4.
21. Dixon JM, Scott WN, Miller WR. An analysis of the content and morphologic of human breast microcysts. *Eur J Surg Oncol* 1985;11:151-4.
22. Bruzzi P, Dogliotti L, Naldoni C, Bucchi L, Constantini M, Cicognani A, et al. Cohort study of association of risk of breast cancer with cyst type in women with gross cystic disease of the breast. *Br Med J* 1997;314:925-8.
23. Ebbs SR, Bates T. Breast cyst type does not predict the natural history of cyst disease or breast cancer risk. *Br J Surg* 1988;75:702-4.
24. Vizoso F. Comportamiento evolutivo de los tipos de quiste en mujeres afectadas de enfermedad macroquística de la mama. *Rev Senología y Patol Mamaria* 1993;6:69-76.
25. Sartorius W. The biochemistry of breast cyst fluids and duct secretions. *Cancer Res Treat* 1995;35:255-66.
26. Haagensen DE Jr, Mazoujian G. Biochemistry and immunohistochemistry of gross cystic disease proteins of the breast. En: Haagensen, CD, ed. *Diseases of the breast*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p. 474-500.
27. Balbin M, Freije JMP, Fueyo A, Sánchez LM, López-Otín C. Apolipoprotein D is the major protein component in cystic disease. *Biochem J* 1990;271:803-7.
28. Losi L, Lorenzini R, Eusebi V, Bussolati G. Apocrine differentiation in invasive carcinoma of the breast. *Applied Immunohistochemistry* 1995;3:91-8.
29. Vizoso F, Díez-Itza I, Sánchez LM, Tuya AF, Ruibal A, López-Otín C. Relationship between prolactin levels and composition of breast secretions in nonlactating women. *J Clin Endocr Metab* 1994;79:525-9.