

Originales

Estudio de las concentraciones del antígeno prostático específico en líquidos quísticos benignos mamarios. Correlación con otros parámetros clinicobiológicos

A. Ruibal***, M.J. Núñez***, V. Piqueras***, F. Rabadán***, M.C. del Río****, J. Schneider***** y A. Tejerina*****

*Servicio de Medicina Nuclear. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. **Fundación Tejerina. Madrid. ***Centro de Patología de la Mama. Madrid.

****Servicio de Bioquímica. Hospital de Barbanza. Ribeira.

Resumen

Introducción. El antígeno prostático específico (PSA, hK3) es una serín-proteasa no específica de la glándula prostática que puede ser detectada en los líquidos de quistes mamarios. El presente trabajo ha sido realizado con la finalidad de estudiar el comportamiento del PSA en líquidos de quistes mamarios benignos clasificados de acuerdo con la fase del ciclo menstrual, tipo de quiste y la existencia de quistes únicos o múltiples.

Pacientes y métodos. Hemos determinado, mediante un fluoroimmunoanálisis (Prostatus. PSA EQM. EC&G Wallac., Finlandia), las concentraciones de PSA en 160 líquidos de quistes mamarios benignos (134 tipo I, 26 tipo II, 42 únicos y 118 múltiples), correlacionándose con las de glucosa, pH, CEA y DHEA.

Resultados. Nuestros resultados fueron los siguientes: *a)* los quistes tipo I presentaron mayores concentraciones de PSA que los tipo II, no apreciándose diferencias cuando se consideraron la fase del ciclo menstrual y la existencia de quistes únicos o múltiples; *b)* en los quistes tipo I las concentraciones de PSA se correlacionaron significativamente con las de DHEA, mientras que en los quistes tipo II lo hicieron estadística y negativamente con las de glucosa, y *c)* en los quistes únicos no existieron diferencias en las concentraciones de PSA en función de la fase del ciclo menstrual, pero aquéllas fueron superiores estadísticamente en los quistes tipo I que en los tipo II; sin embargo, en los quistes múltiples no se constataron diferencias en las cifras de PSA cuando se consideraron el tipo y la fase del ciclo menstrual, las concentraciones de PSA fueron significativamente mayores en los quistes tipo II múltiples que en los tipos II únicos y no difirieron de las observadas en los quistes tipo I únicos.

Conclusiones. Nuestros resultados nos sugieren que el comportamiento del PSA en los líquidos de quistes mamarios benignos parece estar relacionado no sólo con el tipo I, sino también con la existencia de quistes múltiples.

Palabras clave: PSA. Líquido quístico mamario.

(Cir Esp 2001; 69: 95-98)

Correspondencia: Dr. A. Ruibal Morell.
Servicio de Medicina Nuclear. Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid.

Aceptado para su publicación en agosto del 2000.

STUDY OF PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN LEVELS IN BENIGN BREAST CYST FLUIDS: CORRELATION WITH OTHER CLINICAL AND BIOLOGICAL PARAMETERS

Introduction. Prostate specific antigen (PSA hK3) is a non-specific serin protease produced by the prostate gland, and which may be detected in breast cyst fluids. The aim of the present study was to determine the behavior of PSA in benign breast cyst fluids classified by phase of the menstrual cycle, type of cyst, and the presence of single or multiple cysts.

Patients and methods. Using fluoroimmunoassay (Prostatus. PSA EQM. EC&G Wallac. Finland), PSA levels were calculated in 160 samples of benign breast cyst fluid (134 type I, 26 type II, 42 single and 118 multiple) and the findings were correlated with levels of glucose, pH, CEA and DHEA.

Results. Type I cysts presented higher PSA levels than type II cysts. There were no significant differences in PSA levels when phase of menstrual cycle and the presence of single or multiple cysts were taken into account. In type I cysts, there was a significant correlation between PSA levels and DHEA levels, while in type II cysts there was a negative statistical correlation between PSA levels and glucose. There were no differences in PSA levels in single cysts when menstrual phase was considered, but type I cysts had statistically higher PSA levels than type II cysts. There were no differences in PSA levels by menstrual phase or by type of cyst in multiple cysts. PSA levels were significantly higher in type II multiple cysts than in type II single cysts and did not differ from those observed in type I single cysts.

Conclusions. Our results suggest that the behavior of PSA levels in benign breast cyst fluid may be related not only to type I cysts but also to the existence of multiple cysts.

Key words: PSA. Breast cyst fluids.

Introducción

El antígeno prostático específico (PSA, hK3, KLK3), miembro de la familia de las calicreinas cuyo gen se localiza en el cromosoma 19q¹, es una serín-proteasa que ejerce un papel muy importante en la biología del cáncer de próstata, donde es utilizado

como un útil marcador tumoral²⁻⁴. En un principio se consideró específico de la glándula prostática, pero en los últimos años se ha constatado su presencia en otras localizaciones, siendo un ejemplo de ello la glándula mamaria⁵, donde puede ser detectado en los líquidos quísticos, secreciones del pezón, leche y en el tejido normal, benigno y tumoral. En localizaciones no prostáticas, el PSA se presenta predominantemente en su forma libre, si bien es posible detectar, además, complejos con alfa-1-antiquimiotripsina. En los cánceres de mama, la positividad para el PSA es mayor que la de hK2 (calicreína glandular humana) (el 73 frente al 53%)⁶, otro miembro de la familia, y diferentes regiones de su gen están frecuentemente mutadas, en especial su elemento de respuesta a los andrógenos (ARE I)⁷. La expresión de PSA es dependiente de los andrógenos; asimismo, se asocia con la positividad para los receptores de estrógenos y de progesterona, una buena o moderada diferenciación tisular, un tamaño reducido y una baja proliferación. También los tumores positivos suelen ser diploides, axila negativa y se manifiestan en mujeres jóvenes^{8,9}, no habiéndose demostrado de forma unánime el valor pronóstico de la enzima¹⁰⁻¹², si bien, junto a la p53, se cree que es de utilidad para establecer subgrupos de riesgo¹³. En los tumores mamarios tratados con tamoxifeno tras recidiva, concentraciones elevadas de PSA se relacionan con una peor respuesta y con un menor intervalo libre de enfermedad y supervivencia, siendo un factor pronóstico independiente tras el análisis multivariante¹⁴. En las secreciones de pezón, las concentraciones de PSA se correlacionan inversamente con el riesgo de cáncer de mama y pueden ser utilizadas como indicador del mismo^{6,15}. En los líquidos quísticos, la presencia de PSA fue demostrada inicialmente por Diamandis et al^{16,17}, quienes detectaron concentraciones mayores de 0,01 y 0,03 ng/ml en el 64 y el 43%, respectivamente, y por Mannello et al¹⁸, que describieron cifras superiores a 0,05 ng/ml en el 65,6% de los líquidos analizados. Mayores concentraciones de la proteasa se han observado en los quistes tipo I y en los múltiples¹⁹, y en ellos la forma molecular predominante fue la libre. Dado que en los quistes múltiples suelen predominar los tipo I (índice $Na^+/K^+ < 3$ y con epitelio de recubrimiento apocrino secretor) y que los tipos II pueden presentar frecuentemente unas características hormonales más propias del tipo I, todo lo cual parece traducir una mayor base hormonal subyacente, hemos querido constatar si las concentraciones de PSA se modificaban al considerar el tipo de quiste, la fase del ciclo menstrual y, sobre todo, la existencia de quistes únicos o múltiples.

Pacientes y métodos

El grupo de estudio incluyó 160 líquidos de quistes mamarios benignos a cuyo diagnóstico se llegó tras estudios clínicos, mamográficos, ecográficos, termográficos y citológicos. De acuerdo con la relación Na^+/K^+ , los quistes fueron clasificados del siguiente modo: 134 tipo I ($Na^+/K^+ \leq 3$) y 26 tipo II ($Na^+/K^+ > 3$); asimismo, 42 eran únicos y 118 múltiples, pertenecientes estos últimos a 48 mujeres. El volumen osciló entre 2 y 40 ml, siendo la mediana de 4,5 cm³. Las concentraciones de Na^+ y K^+ , así como las de Cl^- , anión este último habitualmente utilizado en la caracterización de los quistes mamarios, fueron analizadas mediante el sistema Synchron EL-ISE Electrolyte (Beckman Instruments Inc., Galway, Irlanda). El PSA fue dosificado mediante un fluoroinmunoanálisis (Prostatus PSA EQM, de EC&G Wallac Oy, Turku, Finlandia), que utiliza dos anticuerpos monoclonales y mide el PSA de forma equimolar; es

TABLA 1. Distribución de las concentraciones de PSA (ng/ml) en los líquidos de quistes mamarios considerados globalmente

Parámetro	N.º	Intervalo	p 25	Mediana	p 75
Fase folicular	64	0,02-32,3	0,02	0,1	0,75
Fase luteínica	59	0,02-16,0	0,02	0,1	0,9
Menopausia	37	0,02-7,4	0,02	0,1	0,45
Quistes únicos	42	0,02-32,3	0,02	0,03	0,6
Quistes múltiples	118	0,02-16,0	0,02	0,13	0,8

p: percentil.

decir, la forma libre y la unida a la alfa-1-antiquimiotripsina. El límite inferior de sensibilidad lo establecimos en 0,02 ng/ml y los coeficientes intra e interanálisis fueron del 4,1 y el 6,8% para unas concentraciones medias de 3,2 y 7,6 ng/ml, respectivamente. Otros aspectos técnicos como la linealidad estuvieron dentro de los límites aceptables para una técnica inmunológica. Asimismo, fueron analizados los siguientes parámetros: glucosa, mediante un espectrofotómetro (ATOM A390, Barcelona) con reactivos de Biosystem (Barcelona), pH, con un PHmeter (microprocessor, Phmeter, Weiheim, Alemania); antígeno carcinoembrionario (CEA), mediante un fluoroinmunoanálisis (EC&G Wallac Oy, Turku, Finlandia) y la hormona deshidroepiandrosterona sulfato (DHEA), mediante un enzimoinmunoanálisis de Di Sorin (Italia). Después de su obtención mediante punción-aspiración, los líquidos fueron centrifugados a 3.000 rpm durante 15 min y los sobrenadantes congelados a -20 °C hasta su manipulación. El análisis estadístico fue realizado mediante el programa BMDP3 y, dado que los diferentes parámetros analizados no siguieron una distribución normal, hemos empleado tests no paramétricos, expresándose los resultados mediante el intervalo, mediana y los percentiles 25 y 50. Una diferencia fue considerada estadística cuando el valor de p fue inferior a 0,05.

Resultados

En el grupo de estudio, considerado globalmente, las concentraciones de PSA oscilaron entre 0,02 y 32,3 ng/ml (mediana 0,1) y fueron mayores estadísticamente ($p = 0,0319$) en los quistes tipo I (intervalo 0,02-32,3; mediana 0,135) que en los tipo II (intervalo 0,02-0,9; mediana 0,05 ng/ml). No se constataron diferencias significativas en las cifras de PSA al considerar la fase del ciclo menstrual, ni si los quistes eran únicos o múltiples (tabla 1). En los quistes tipo I, el PSA se correlacionó significativamente ($p < 0,05$) con las concentraciones de DHEA ($r = 0,3061$), mientras que en los quistes tipo II lo hizo significativa y negativamente con las de glucosa ($r = -0,3652$).

En los 42 quistes únicos (tabla 2) las concentraciones de PSA oscilaron entre 0,02 y 32,3 (mediana 0,05), no difirieron estadísticamente en función de la fase del ciclo menstrual, pero fueron mayores ($p = 0,0011$) en los quistes tipo I que en los tipo II. En los 118 quistes múltiples los valores de la proteasa oscilaron entre 0,02 y 16 ng/ml (mediana 0,135) y no se constataron diferencias significativas al considerar la fase del ciclo menstrual ni el tipo de quiste. Asimismo, las concentraciones de PSA fueron mayores ($p = 0,0055$) en los quistes tipo II múltiples que en los quistes tipo II únicos. Un aspecto interesante fue que en los quistes únicos fueron observadas más frecuentemente en los quistes tipo I que en los II unas cifras de PSA superiores a 0,02, 0,1 y 0,5 ng/ml (19/31 frente 2/11, $p = 0,0221$; 16/31 frente a 1/11, $p = 0,0207$; 11/31 frente a

TABLA 2. Distribución de las concentraciones de PSA (ng/ml) en los líquidos de quistes mamarios benignos clasificados como únicos o múltiples

Parámetro	Número	Intervalo	p 25	Mediana	p 75	p
Quistes únicos	42					
Fase folicular	14	0,02-32,3	0,02	0,1	0,8	
Fase luteínica	15	0,02-5,8	0,02	0,02	0,9	
Menopausia	13	0,02-0,97	0,02	0,02	0,2	
Tipo I	31	0,02-32,3	0,02	0,2	0,9	0,0011
Tipo II	11	0,02-0,06	0,02	0,02	0,05	
Quistes múltiples	118					
Fase folicular	50	0,02-10,9	0,02	0,1	0,7	
Fase luteínica	44	0,02-16,0	0,02	0,25	0,85	
Menopausia	24	0,02-7,4	0,02	0,16	0,65	
Tipo I	103	0,02-16,0	0,02	1,12	0,8	NS
Tipo II	15	0,02-0,9	0,02	0,4	0,8	

p: percentil.

0/11, p = 0,0312, respectivamente), pero ello no ocurrió en los quistes múltiples (64/103 frente a 11/15, 53/103 frente a 8/15 y 3/103 frente a 5/15, respectivamente).

Cuando comparamos los quistes tipo I únicos y múltiples no se apreciaron diferencias al considerar unos umbrales de PSA superiores a 0,02, 0,1 y 0,5 ng/ml (19/31 frente a 64/103, 176/31 frente a 53/103 y 11/31 frente a 31/103), mientras que los quistes tipo II múltiples presentaron mayores porcentajes de positividades que los quistes tipo II únicos (11/15 frente a 2/11, p = 0,0096; 8/15 frente a 1/11, p = 0,0312; 0/11 frente a 5/15, p = 0,0549). Además, los quistes tipo II múltiples no presentaron diferencias significativas con los quistes tipo I únicos (11/15 frente a 18/31, 8/15 frente 16/31 y 5/15 frente a 11/31).

Discusión

En los últimos años, la familia de las calicreínas ha aumentado notablemente el número de sus componentes, 13 hasta el momento, y ha adquirido gran relevancia por estar ligada biológicamente al diagnóstico, seguimiento y terapia de numerosos tumores, como son los de mama, próstata y testículo^{1,20}. El más conocido es el PSA (hk3, PSA, KLK3), por su gran interés en el seguimiento y monitorización de los tumores prostáticos. En un principio se consideró que el PSA era un marcador específico de la glándula prostática, pero en el momento actual esto último no puede ser aceptado, pues en los últimos años se ha descrito su presencia en otras localizaciones, siendo una de ellas la glándula mamaria, donde está presente en tejido normal, maligno, secreciones y leche^{5,21-23}. También otros nuevos miembros de la familia de las calicreínas (hK2, prostase/KLK-L1 y KLK-L4) se han detectado en la mama y pueden estar implicados en la patogenia y/o progresión de los tumores mamarios²⁴⁻²⁶.

En los líquidos de quistes hemos observado cifras de PSA superiores a 0,02 ng/ml en 96 de los 160 líquidos estudiados (60%), porcentaje similar al descrito por Diamandis et al¹¹ y Manello et al¹⁸. Las concentraciones de la proteasa fueron mayores estadísticamente en los quistes tipo I (aquellos con una relación $Na^+/K^+ < 3$ y un epitelio de recubrimiento apocrino secretor), lo cual concuerda con lo descrito por otros grupos¹⁹. No constatamos diferencias al tener presente la fase del ciclo menstrual, ni si los quistes eran únicos o múltiples. El papel biológico de la presencia de PSA no ha sido todavía establecido, si bien se cree que está relacionado, como otras proteasas,

con la génesis y mantenimiento de los quistes a través de la producción de péptidos responsables de la presión osmótica, aunque también podría ejercer su acción modulando la presencia y efecto biológico de ciertos factores de crecimiento como ocurre en la próstata. Mannello et al¹⁸ consideran que el PSA participa en toda la evolución natural del quiste, es decir, en la formación, tamaño y posible transformación. También otro miembro de la familia, la hK2, que presenta una alta homología con el PSA, ha sido detectado en los líquidos de quistes²⁴, estando su expresión bajo control de andrógenos y progestágenos de un modo similar al PSA²⁷. La hK2 y el PSA se correlacionan positivamente ($r = 0,53$, $p = 0,002$) en los aspirados de pezón²⁸. El pepsinógeno C, otra proteasa, está presente en todos los líquidos de quistes con unas concentraciones que oscilan entre 3 y 31.000 ng/ml, asociándose preferentemente a los tipo I, al contrario de la prostaglandina D sintetasa que lo hace con los tipos II. El pepsinógeno C no se correlacionó con el número de quistes e historia familiar de cáncer de mama²⁹. No creemos que el PSA realice un efecto antiproliferativo sobre el crecimiento celular, como ha sido demostrado en líneas celulares hormonodependientes de cáncer de mama²⁴, ni que se asocie con un menor riesgo de transformación, pues es más abundante en los quistes tipo I, y precisamente éstos son los que tienen mayor riesgo³⁰⁻³². Por ello, el hecho de que todas estas proteasas se asocien predominantemente a los quistes con epitelio de recubrimiento apocrino –secretor y con una importante base hormonal subyacente– sugiere una síntesis local consecuencia de la “actividad” biológica de los mismos y este hecho es apoyado por lo descrito recientemente por Malatesta et al³³, quienes demuestran que es el epitelio de los quistes tipo I el responsable de la producción y secreción del PSA. Asimismo, la correlación positiva entre las concentraciones de PSA y de DHEA apoya la idea de que la proteasa esté ligada a la actividad funcional del quiste, pues los valores de la hormona son superiores en los quistes tipo I. Además, la relación estadística y negativa entre el PSA y la glucosa refuerza la relación entre aquél y los quistes tipo I, pues éstos son los que cursan habitualmente con menores concentraciones de azúcares.

Al considerar sólo los quistes únicos, pudimos observar mayores concentraciones de PSA en los tipo I frente a los tipo II, no influyendo en ellas la fase del ciclo menstrual, es decir, lo mismo que hemos descrito al considerar globalmente el grupo estudio. Sin embargo, al considerar los quistes múltiples comprobamos que tanto la fase del ciclo menstrual como el tipo de quiste no influyeron significativamente en las concentraciones del PSA. Al comparar los quistes tipo I únicos y múltiples no constatamos diferencias en las concentraciones de PSA, pero los tipo II múltiples presentaron mayores cifras que los tipo II únicos y similares a los del tipo I únicos. Ello indica que los quistes tipo II múltiples difieren de sus homólogos únicos y son similares a los tipo I únicos, los más activos funcionalmente. Centrándonos en los quistes múltiples, sabemos que en ellos predominan los tipo I, que poseen una mayor actividad mitógena, cursan con mayores concentraciones de factores de crecimiento que estimulan la proliferación (factor de crecimiento epidérmico, EGF) y se asocian a un mayor riesgo de cáncer de mama^{32,33}. Por ello, los mayores valores de PSA en los quistes tipo II múltiples, superiores a los constatados en los dos únicos y similares a los de los tipo I únicos, nos sugiere que la presencia de la proteasa es consecuencia de la actividad funcional del quiste, siendo ésta mayor en los quistes tipo II múltiples que en los únicos. Apoya esta afirmación el hecho de que las concen-

traciones de DHEA son superiores estadísticamente ($p = 0,01793$) en los quistes II múltiples ($i = 1.200-164.000$; mediana 24.200 $\mu\text{g}/\text{dl}$) que en los quistes II únicos ($i = 600-191.400$; mediana 15.500). Sin embargo, el papel biológico del PSA en los líquidos quísticos difiere del observado con la DHEA, pues, en nuestra experiencia, hemos observado mayores concentraciones ($p = 0,00093$) de la hormona en los quistes tipo I únicos ($i = 13.500-184.800$; mediana 65.600 $\mu\text{g}/\text{dl}$) en relación con los tipo II múltiples (1.200-164.000; mediana 24.200), hecho no constatado con la serin-proteasa, todo lo cual nos sugiere la posibilidad de que existan otros factores que modulen la síntesis y secreción del PSA en los quistes mamarios benignos.

Los resultados anteriores nos inducen a las siguientes consideraciones: *a)* las concentraciones de PSA son mayores estadísticamente en los quistes tipo I que en los tipo II, no estando influidas por la fase del ciclo menstrual ni por el hecho de que los quistes sean únicos o múltiples; *b)* en los quistes tipo I las concentraciones de PSA se correlacionaron significativamente con las de DHEA, mientras que en los tipo II lo hicieron negativa y significativamente con los de glucosa; *c)* en los quistes únicos, las concentraciones de PSA fueron mayores en los tipo I que en los tipo II, no estando influidas por la fase del ciclo menstrual; por el contrario, en los quistes múltiples no se constataron diferencias significativas cuando la fase del ciclo menstrual o la existencia de quistes únicos o múltiples fue considerada; *d)* los valores de PSA fueron significativamente mayores en los quistes tipo II múltiples que en los quistes tipo II únicos, no difiriendo de los observados en los quistes tipo I únicos, y *e)* el comportamiento del PSA en los líquidos quísticos parece relacionarse no sólo con los quistes, sino también con la existencia de quistes múltiples.

Bibliografía

1. Yousef GM, Luo LY, Diamandis EP. Identification of novel human kallikrein-like genes on chromosome 19q13.3-q13.4. *Anticancer Res* 1999; 19: 2843-2852.
2. Oesterling JE. Prostate specific antigen: a valuable tool. *Oncology* 1990; 5: 107-113.
3. Morate J, Ruibal A, Palou J, De Torres JA, Soler Roselló A. Clinical evaluation of PSA and PAP. A comparative study. *Eur J Urology* 1988; 14: 360-366.
4. Diamandis EP, Yousef GM, Luo I, Magklara I, Obiezu, CV. The new kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 54-60.
5. Yu H, Berkel H. Prostate specific antigen (PSA) in women. *J La Stata Med Soc* 1999; 151: 209-213.
6. Black MH, Diamandis EP. The diagnostic and prognostic utility of prostate specific antigen for diseases of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59: 1-14.
7. Majumdar S, Diamandis EP. The promoter and the enhancer region of the KLK3 (prostate specific antigen) gene is frequently mutated in breast tumours and in breast carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1999; 79: 1594-1602.
8. Lai LC, Erbas H, Lennard TW, Peaston RT. Prostate specific antigen in breast cyst fluid: possible role of prostate specific antigen in hormone dependent breast cancer. *Int J Cancer* 1996; 66: 743-746.
9. Yu H, Levesque MA, Clark GM, Diamandis EP. Prognostic value of prostate specific antigen for women with breast cancer: a large United States cohort study. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1489-1497.
10. Kucera E, Kainz C, Tempfer C, Seillinger R, Koelbl H, Sliutz G. Prostate specific antigen (PSA) in breast and ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 4735-4737.
11. Griniatsos J, Diamantis E, Gioti J, Karyda I, Vassilopoulos PP, Agnanti N. Correlation of prostate specific antigen immunoactivity (IE PSA) to other prognostic factors in female breast cancer. *Anticancer Res* 1998; 18: 683-688.
12. Sauter ER, Babb J, Daly M, Engstrom PF, Ehta H, Malick J et al. Prostate specific antigen production in the female breast: association with progesterone. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 315-320.
13. Yu H, Levesque MA, Clark GM, Diamandis EP. Enhanced prediction of breast cancer prognosis by evaluating expression of p53 and prostate specific antigen in combination. *Br J Cancer* 1999; 81: 490-495.
14. Foekens JA, Diamandis EP, Yu H, Look MP, Meijer Van Gelder ME, Van Putten WL et al. Expression of prostate specific antigen (PSA) correlates with poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 888-894.
15. Sauter ER, Daly M, Linahan K, Ehya H, Engstrom PF, Bonney G et al. Prostate specific antigen levels in nipple aspirate fluid correlate with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 967-970.
16. Diamandis EP, Yu H, López Otin C. Prostate specific antigen-a new constituent of breast cyst fluid. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 38: 259-264.
17. Diamandis EP. Prostate specific antigen-new applications in breast and other cancers. *Anticancer Res* 1996; 16: 3983-3984.
18. Mannello F, Bocchicotti G, Bianchi G, Marcheggiani F, Gazzanelli G. Quantification of prostate specific antigen immunoreactivity in human breast cyst fluids. *Breast Cancer Res Treat* 199; 38: 247-252.
19. Borchert GH, Yu H, Tomlinson G, Giai M, Roagna R, Ponzone R et al. Prostate specific antigen molecular forms in breast cyst fluid and serum of women with fibrocystic breast disease. *J Clin Lab Anal* 1999; 13: 75-81.
20. Yousef GM, Diamandis EP. The expanded human kallikrein gene family: locus characterization and molecular cloning of a new member, KLK-L3. *Genomics* 2000; 65: 184-194.
21. Diamandis EP, Yu H. Non prostatic sources of prostate specific antigen. *Urol Clin North Am* 1997; 24: 275-282.
22. Filella X, Molina R, Alcover J, Menéndez V, Giménez N, Jo J et al. Prostate specific antigen detection by ultrasensitive assay in samples from women. *Prostate* 1996; 29: 311-316.
23. Abate I, Musci MD, Paradiso F, Scituulli F, Correale M. Determination of free PSA in breast cancer cytosols by IRMA. *Int J Biol Markers* 1996; 11: 53-54.
24. Magklara A, Scorilas A, López Otin C, Vizoso F, Ruibal A, Diamandis EP. Human glandular kallikrein in breast milk, amniotic fluid, and breast cyst fluid. *Clin Chem* 1999; 45: 1774-1780.
25. Yousef GM, Obiezu CV, Luo LY, Black MH, Diamandis EP. Prostate/KLK-L1 is a new, member of the human kallikrein gene family, is expressed in prostate and breast tissues, and is hormonally regulated. *Cancer Res* 1999; 59: 4252-4256.
26. Yousef GM, Chang A, Diamandis EP. Identification and characterization of KLK-L4, a new kallikrein-like gene that appears to be downregulated in breast cancer tissues. *J Biol Chem* 2000; 275: 11891-11898.
27. Magklara A, Grass L, Diamandis EP. Differential steroid hormone regulation of human glandular kallikrein (hK2) and prostate specific antigen (PSA) in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59: 263-270.
28. Black MH, Magklara A, Obiezu C, Levesque MA, Sutherland DJ, Tindall DJ et al. Expression of a prostate associated protein, human kallikrein (hk2) in breast tumours and in normal breast secretions. *Br J Cancer* 2000; 82: 361-367.
29. Borchert GH, Melegos DN, Yu H, Giai M, Roagna R, Ponzone R et al. Quantification of pepsinogen C and prostaglandin D synthase in breast cyst fluid and their potential utility for cyst type classification. *Clin Biochem* 1999, 32: 39-44.
30. Mannello F, Bocchicotti G, Troccolli R, Gazzanelli G. Lipid associated sialic acid levels in human breast cyst fluids. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24: 167-170.
31. Dixon JM, Scott WN, Miller WR. Natural history of cystic disease: the importance of cyst type. *Br J Surg* 1985; 72: 190-192.
32. Haagensen DE Jr. Is cystic disease related to breast cancer? *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 687-694.
33. Malatesta M, Mannello F, Asebastini M, Bianchi G, Gazzanelli G. Prostate specific antigen found in type I breast cyst fluids is a secretory product of the apocrine cells lining breast gross cysts. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 57: