

2ej
121



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA**

T E S I S

**INTRODUCCION AL ESTUDIO DEL
ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNICO EN
UNA POBLACION DE VILLAHERMOSA**

Sustentante: ALEJANDRO SORIANO GARIBAY

Carrera: QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

México, D. F.

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PÁGINA.
CAPÍTULO I. OBJETIVOS	3
CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN,	4
CAPÍTULO III. GENERALIDADES.	6
1. NATURALEZA DEL CANCER	6
1.1. Etiología del Cáncer.	6
1.2 Aspectos Inmunológicos en el Desarrollo Tumoral	14
1.3 La Célula Tumoral.	18
2. PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO Y EVALUACION DE TUMORES HUMANOS	24
2.1 Detección de Anticuerpos Humorales y Antígenos Asociados al Tumor.	25
2.2 Evaluación de Reacciones Inmunes Mediadas por Células	27
2.3 Marcadores Tumoraes.	29
3. ANTIGENO CARCINOEMBRIONICO (C E A).	31
3.1 Distribución del CEA en Tejido Normal y Dañado.	32
3.2 Distribución del CEA en Adenocarcinomas del Tracto Gastrointestinal.	32
3.3 Presencia del CEA en Varios Tumores	36

	PÁGINA
3.4 Características Químicas del CEA	38
3.5 Utilidad Clínica del CEA.	42
3.6 Fundamento de los Métodos de Análisis del CEA	49
4. VALORES DE REFERENCIA	52
CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODO.	59
CAPÍTULO V. RESULTADOS	72
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN	87
CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN.	94
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.	96

CAPÍTULO I. OBJETIVOS.

1. Exponer la situación actual en el estudio del Antígeno Carcinoembrionario puesto que se han logrado considerables avances en el estudio de este antígeno, sobre todo en la presente década, tanto en su relación con diferentes tipos de cáncer como en la metodología para su de terminación.

1.1 Asentar las bases teóricas para el uso correcto del Antígeno Carcinoembrionario (CEA) como marcador tumoral, así como para la interpretación adecuada de resultados.

2. Introducirnos al estudio del CEA en la población de Villahermosa, estableciendo los valores de referencia para dicho antígeno y así tener un parámetro real con el que se puedan valorar posteriormente los resultados que sobre dicho antígeno se obtienen en la población estudiada.

2.1 Evaluar el método de análisis del CEA empleado en la presente tesis.

CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN.

Como causa de muerte el cáncer y sus complicaciones alcanzan un 5% a nivel nacional (82). Una de las razones por las que el cáncer ocupa esta posición radica en el hecho de ser un padecimiento difícil de detectar -- tempranamente, esto es, antes de que se presente sintomatología alguna. -- Es un proceso de largo desarrollo que puede llevar hasta treinta años para manifestarse clínicamente, lo cual constituye una gran dificultad para su eliminación completa.

Hasta ahora es bien conocido que para establecer un diagnóstico temprano del cáncer prácticamente sólo se cuenta con dos pruebas, la citología exfoliativa y el análisis histológico del tejido que se sospecha canceroso; por medio de ellas a menudo puede detectarse a tiempo un tumor y, con un tratamiento adecuado, ser eliminado exitosamente. Sin embargo, -- cuando el cáncer no ha sido detectado a tiempo, los problemas que se presentan son evidentes. Resultan particularmente problemáticos aquellos ca sos en que los pacientes que han tenido una resección tumoral vuelven a -- desarrollar la enfermedad.

Desde el punto de vista clínico es muy importante evaluar el estado tumoral del paciente, pues haciéndolo es posible el manejo terapéutico --

adecuado, así como la realización de una cirugía en el momento preciso. - El análisis del estado tumoral puede ser evaluado por medio de pruebas en el laboratorio clínico o fuera de él. La presente tesis es un estudio de uno de los análisis de laboratorio, el del Antígeno Carcinoembriónico, empleado en la evaluación del estado tumoral.

El Antígeno Carcinoembriónico (CEA) es una glucoproteína presente en intestino fetal y tejido tumoral, pero ausente en tejido adulto normal. - El primer reporte de este antígeno fue hecho por Gold y Freedman en 1965- (35), quienes lo encontraron en tejido canceroso de colon; hasta la fecha se ha visto que el Antígeno Carcinoembriónico tiene una distribución más amplia que la descrita originalmente, pues se ha encontrado en varios tejidos tumorales, así como en la sangre de personas que los presentan. En esta tesis se expone el significado de tales hallazgos.

Lo anteriormente expuesto constituye una de las partes de que está compuesta la presente investigación, y ha sido desarrollada en el capítulo de Generalidades, comprendiendo una revisión bibliográfica de lo que se conoce hasta la fecha sobre el Antígeno Carcinoembriónico (CEA) y, desde luego, el contexto en que se da el análisis de esta substancia: el estudio del cáncer. Los capítulos posteriores corresponden a la parte - - práctica del trabajo y que consiste en un análisis descriptivo dirigido a establecer los valores de referencia para el CEA en la población de Villa hermosa. Dichos valores son parámetros necesarios para interpretar las - variaciones que hubiera de este antígeno en las personas con cáncer.

CAPÍTULO III. GENERALIDADES.

1. NATURALEZA DEL CANCER.

1.1 ETIOLOGÍA DEL CANCER.

De manera análoga a una respuesta inflamatoria, el cáncer puede una reacción inespecífica del huésped hacia una gran variedad de factores; es estimulado e influenciado por factores como virus, agentes físicos y químicos.

Un tumor aislado de un paciente es una gran agregación de células cancerosas que descienden de una célula "fundadora". Este antecedente fue una célula normal con una función específica en un tejido particular; sufre un cambio principal y empieza a dividirse y proliferar en respuesta a estímulos propios más que en respuesta a un estímulo externo que requiere habitualmente para su crecimiento. Eventualmente esta célula es el -- origen de millones de células alteradas que constituyen la masa tumoral.

El comportamiento anormal de las células cancerosas está caracterizado por muchos aspectos diferentes (70, 71, 78, 110). El más evidente -- de éstos es el crecimiento incontrolado. Las células cancerosas tienen -- una forma que es muy diferente de las células normales. Algunas son inva

sivas, pues se pueden localizar más allá de sus tejidos particulares. Muchas consumen carbohidratos en grandes cantidades. Su metabolismo puede ser anaeróbico. La membrana de las células cancerosas es diferente de -- las normales, pues en aquéllas se hallan presentes antígenos tumorales -- que le dan características inmunológicas diferentes.

Este es sólo el comienzo de una larga lista. La longitud de la misma y la complejidad del fenotipo (el conjunto total de características estructurales y funcionales que definen a una célula cancerosa) implica conocer aspectos importantes, como el de saber cuál de esas características son esenciales para el estado canceroso y cuáles son secundarias; si por ejemplo una célula cancerosa tiene 100 aspectos diferentes, saber si cada uno de ellos es adquirido individualmente en el proceso de la carcinogénesis; saber si la célula normal tiene que pasar a través de esos 100 estadios en el curso de transformación a célula tumoral. La respuesta a estas cuestiones parece estar en función de un mecanismo "pleiotrópico": un elemento celular que actúa centralmente es alterado y entonces es capaz de expresar simultáneamente un gran número de cambios en el fenotipo (110).

Hay evidencias de que el estado canceroso es matenido por genes (41, 108, 110). Esto puede argumentarse fácilmente ya que la mayoría de los aspectos del cáncer están en función del ADN, pues como responsable de la actividad celular, ejerce su influencia sobre el proceso de crecimiento, división y diferenciación celular. Existen evidencias para afirmar que la -

interferencia con el ADN en casi cualquier forma concebible, sirve como preludio para la inducción del cáncer. Puesto de otra forma, es difícil que un evento oncogénico no involucre modificación del ADN, de una forma u otra (108).

Los investigadores han estado acumulando datos sobre virus asociados a procesos cancerosos, así como sobre carcinógenos no virales, incluyendo formas de radiación y un gran número de agentes químicos que pudieran inducir la transformación celular. Estos carcinógenos en lugar de -- aportar información genética nueva a la célula, alteran la información ya existente. Muchos carcinógenos dañan el ADN, pero su acción no es tan directa, sino que forma parte de un proceso asociado a la desrepresión de genes (26, 39, 40, 41).

De esta forma, el origen del cáncer puede ser comprendido como un proceso genético de muchos pasos (4, 53, 108, 110). Estos pueden ser clsificados globalmente dentro de tres pasos mayores: a) daño inicial en el ADN; b) rompimiento y rearreglo cromosomal; c) selección de células mutantes. La exposición que a continuación se hace sobre estos puntos es está centrada en los mecanismos principales y más comunes del proceso de transformación de célula normal a tumoral.

a) Daño inicial en el ADN. Este daño en el ADN está influenciado por agentes físicos, químicos y virus, y resulta finalmente en una mutación.

Desde hace algunos lustros se sabe que hay muchas sustancias químicas que pueden ocasionar cáncer. Dichos carcinógenos se unen al ADN mediante enlaces covalentes o mediante fuerzas electrostáticas y pueden actuar de diferentes formas, siendo la inserción y su presión unas de las principales; también pueden unirse y afectar -- los complejos enzimáticos de replicación y de transcripción, y muchas otras enzimas y proteínas (p. ej. histonas y no-histonas). Todo este proceso se traduce directamente en una mutación. Las radiaciones ionizantes (rayos-X y gama) y la luz ultravioleta entre otros también pueden causar mutación.

Una gran mayoría de carcinógenos tienen en común la propiedad de formar enlaces covalentes en varias sustancias nucleofílicas, -- las cuales incluyen grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, carboxilo e imidazol. En el ADN hay partes especialmente susceptibles a reaccionar con estos carcinógenos, como el átomo 7 de la guanina, los -- nitrógenos 1 ó 3 de la adenina, el 3 de la citosina y el oxígeno 6 de la guanina. También pueden reaccionar, aunque en menor grado, -- los átomos de fosfato de las cadenas de ADN y las proteínas asociadas a éste (108).

Otro mecanismo que ha sido propuesto para explicar el proceso canceroso radica en la activación de oncogenes. Los oncogenes son versiones alteradas de los genes que orginariamente se encuentran --

en las células normales y que han sido asociados directamente con la producción de cáncer (4, 24, 42, 53, 108).

Los oncogenes fueron descubiertos originalmente en virus. Los primeros estudios fueron con los retrovirus: virus cuyo material genético no es ADN sino ARN, el cual es transcrito "en reversa" en ADN. En cultivo de tejidos y en animales de experimentación se ha demostrado que los virus tienen un gene, que es responsable de la inducción de cáncer: un oncogene. Sin embargo, esos oncogenes virales no son realmente virales, sino de origen celular: son genes que se encuentran en las células normales, el virus los toma y modifica para posteriormente integrarlos nuevamente a la célula, convirtiéndola así en una célula neoplásica. Se ha sugerido que un mecanismo similar pudiera ocurrir en el hombre, aunque faltan evidencias directas (53, 110). Otro mecanismo mediante el cual pudiera activarse el oncogene es por medio de la acción de la luz ultravioleta o por carcinógenos químicos.

b) Rompimiento y Rearreglo Cromosomal. En este segundo paso ya ha habido una mutación que no ha sido reparada; se inicia la división celular en la que se manifiesta posteriormente una transposición cromosomal con el consiguiente cambio genotípico. Puesto que la replicación del ADN es una precondition necesaria para la división celular, constituye un blanco vulnerable para la acción de carcinóge-

nos que pueden conducir a una mutación más, además de las ya producidas (40).

La célula tumoral exhibe un rango extremadamente amplio de defectos en su genoma. Estos defectos se hacen evidentes en la fase cromosomal, en donde es posible observar variaciones en número y grado entre células diferentes en el mismo tejido. Esos defectos incluyen aneuploidía, poliploidía, y numerosos tipos de anormalidades estructurales. El desarrollo de técnicas de bandeo cromosomal han ayudado al avance de la investigación citogenética del tumor, originando el descubrimiento de varias asociaciones constantes entre tipos específicos de neoplasias y cambios cromosomales (16, 63).

El primer caso que se asoció con un defecto cromosomal específico fue la leucemia mielocítica crónica (LMC), en la que aproximadamente el 90% de los casos exhibieron un cromosoma 22 pequeño (Filadelfia ó Ph¹). Con el uso de los métodos de bandeo ha sido posible demostrar que existe una translocación del cromosoma 22 al 9. Esta translocación es adquirida y limitada a las células hemotopoyéticas de los granulocitos, eritrocitos y megacariocitos. El cromosoma Ph¹ también ha sido encontrado en varios pacientes con leucemia mielocítica aguda (LMA). Esta leucemia, en contraste con la LMC no está caracterizada por un solo defecto cromosomal. Aproximadamente el 40% de pacientes con LMA exhiben un cariotipo normal, y

el 60% muestran cambios cromosomales relativamente no específicos:-- el 80% de los defectos descubiertos involucran un cromosoma 8 adicional, pérdida de un cromosoma 7, y/o translocación entre el 8 y el 21.

El linfoma de Burkitt es un tipo de proceso neoplásico asociado con el virus de Epstein-Barr y exhibe un cromosoma 14 anormalmente largo. Otro tumor, el retinoblastoma, es un tumor que se presenta en la niñez y con una frecuencia alta entre dos grupos de individuos genéticamente predispuestos: aquéllos que heredan una predisposición al tumor de un modo autosomal dominante, y aquéllos que nacen con una deleción parcial del brazo largo del cromosoma 13, -- quienes habitualmente también muestran retraso mental y defectos congénitos. Este último grupo es de particular importancia puesto que representa el único caso conocido en el hombre en el cual un defecto cromosomal específico que ocurre precigóticamente puede predisponer a los individuos afectados a un determinado tumor. También en tumores malignos neurogénicos (neuroblastomas y gliomas -- principalmente) se encuentran aberraciones cromosomales (63), y lo mismo ocurre en ciertos desórdenes autosomales recesivos en los que se presenta una tendencia a mostrar aberraciones cromosomales y desarrollar neoplasias, como ocurre en la anemia de Fanconi, ataxia-telangiectasia, síndrome de Bloom, síndrome de Werner y varios más (16, 63, 85).

c) Selección de Células Mutantes. Esta tercera etapa en el desarrollo tumoral es una consecuencia del daño en el ADN: los arreglos en el genotipo generan nuevos fenotipos. La selección favorece esos fenotipos de células bien diferenciadas y proliferantes. Finalmente, los fenotipos específicos se manifiestan en los diferentes tejidos (95).

Los párrafos anteriores tienen evidentemente una explicación darwiniana: la selección tiene dos componentes que son la mutación y la fijación (113), aunque es claro que en el caso de la carcinogénesis esta mutación no es por evolución natural (desarrollada en millones de años) sino por la acción de carcinógenos (en cuyo caso el tiempo máximo de desarrollo pueden ser sólo algunas décadas). El término "fijación" se refiere a mantener estable esta mutación. Una vez mantenida la mutación los cambios fenotípicos son evidentes.

Nos hemos referido anteriormente a mutaciones puntuales (que provocan cambios en la secuencia de bases en el ADN), pero hay también otro tipo de mutaciones que son las llamadas mutaciones reguladoras. Estas no alteran la secuencia de bases en el ADN, sino que provocan cambios en la vecindad del ADN (principalmente en histonas y no-histonas) y que determinan la actividad o inactividad del gene, esto es, alteran los mecanismos reguladores y pueden conducir a la desrepresión de genes (26, 39, 40, 41). Como consecuencia de esta

desrepresión de genes, ciertas proteínas embrionicas son sintetizadas nuevamente. Entre estas proteínas se encuentra el antígeno carcinoembrionario (CEA) y otros antígenos fetales.

Esto es, a grandes rasgos, el proceso de transformación neoplásica, ya que un estudio detallado está lejos del alcance de la presente tesis.

En los siguientes puntos de este capítulo se describirán algunos de los cambios (fenotípicos) de la célula neoplásica, terminando con una descripción más detallada del antígeno carcinoembrionario, CEA, tema central de esta tesis.

1.2 ASPECTOS INMUNOLOGICOS EN EL DESARROLLO TUMORAL.

Una de las modificaciones más significativas y que se expresa - - principalmente en la membrana plasmática es su modificación antigénica. - La aparición de nuevos determinantes antigénicos es la regla en las células tumorales, aunque su especificidad dependa, entre otros factores, de la naturaleza del agente etiológico: en las neoplasias producidas por virus o cuando el tumor es transplantado, los antígenos tienen la especificidad del agente causal, independientemente del tejido o especie animal - donde se haya producido el tumor, o sea, el antígeno es igual; en los tumores inducidos por agentes químicos, los antígenos son específicos del - tumor, es decir, cuando en un mismo animal se inducen varios tumores, éstos presentan diferentes antígenos entre sí (70, 71, 91).

Se han descubierto varios antígenos embrionicos en ciertos tejidos-fetales y tumorales, los cuales no son detectables en tejido adulto normal. Este grupo de antígenos son los llamados antígenos oncofetales y su presencia, en la mayoría de los casos, constituye una de las características de la célula tumoral. Los antígenos que están presentes en células tumorales, pero ausentes en las normales han sido llamados antígenos asociados al tumor, AAT; los antígenos capaces de inducir una respuesta inmune o resistencia al crecimiento del tumor, han sido llamados antígenos -- asociados al trasplante de tumores, AATT, aunque su presencia no asegura un rechazo del tumor (1, 73, 96).

Cuando se comparan las células tumorales con sus contrapartes normales pueden mostrar: a) deleción de antígenos normales de la membrana celular; b) formación de antígenos asociados al trasplante de tumores; c) desdiferenciación retrogresiva con formación de antígenos fetales; d) alteración en la membrana celular con cambios en la composición y reactividad inmunológica.

a) La deleción y pérdida de antígenos celulares ha sido notada en muchos tumores humanos. Varios de los cánceres epiteliales muestran una pérdida temprana de antígenos de grupos sanguíneos A, B, y H e inclusive se han empleado en el diagnóstico temprano de carcinomas. Se ha propuesto como explicación el que la superficie celular pudiera combinarse con un carcinógeno y actuar como neoantígeno, -- conduciendo a la producción de anticuerpos y así, el anticuerpo ori

ginara la delección del antígeno de la membrana por endocitosis del complejo inmune (83).

b) Los antígenos asociados al trasplante de tumores (AATT) están bajo control genético y son transmitidos de cada generación de células a la otra. En los tumores que son inducidos por carcinógenos químicos o por agentes físicos tales como radiación, cada tumor tiene su propia antigenicidad específica. Los AATT inducidos por virus muestran una especificidad antigénica similar, puesto que cada tumor inducido contiene el mismo antígeno en la membrana celular (73, 91).

c) Otra de las alteraciones inmunológicas presentes en la célula neoplásica es la presencia de antígenos fetales o embrionicos. En efecto, se ha postulado que durante los eventos de la carcinogénesis se lleva a cabo una de desdiferenciación o retrodiferenciación, la cual conduce a la expresión incrementada de la información genética que está reprimida normalmente en la célula madura; esto conduce a la formación de componentes embrionicos, a veces en cantidades significativas, para su posterior liberación a la circulación sanguínea (26, 39, 40, 41, 55). Los antígenos fetales más importantes por su valor diagnóstico son: antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-1-fetoproteína (AFP), alfa₂H-ferroproteína; fosfatasa alcalina Regan (o placentaria), sulfoglucoproteína y gama-fetoproteína.

d) Otras alteraciones en la membrana de las células tumorales no corresponden precisamente a la pérdida o adquisición de antígenos, pues también hay un cambio en la distribución de la densidad de macromoléculas en la membrana. Estos cambios pueden ser demostrados por diferencias en la interacción de células normales y transformadas, con la concanavalina A, una aglutinina vegetal (37, 70, 71, 83).

En lo referente a la teoría inmunológica del cáncer, se tiene lo siguiente: cualquier mecanismo que pudiera resultar en la aberración o desbalance del mecanismo de vigilancia inmune está relacionado con el desarrollo de neoplasias. En la teoría inmunológica del cáncer (73), las células malignas continúan su desarrollo debido a que han perdido antígenos específicos tisulares y por lo tanto ya no están sujetas a los mecanismos de control homeostáticos tisulares (73, 78). También se ha sugerido que la asociación de cambios malignos con enfermedades autoinmunes órgano específicas resulten posiblemente de la selección autoinmune de las células tumorales. El ataque autoinmune a las células tumorales pudiera conducir a una redistribución de componentes específicos del tejido, seguida de la pérdida de dichos componentes (complejos inmunes) por endocitosis (83). - El mecanismo de acción de los anticuerpos es consistente con la hipótesis inmunológica del cáncer (1, 73, 78, 83).

Por otro lado, en estudios in vitro se han encontrado sustancias con propiedades inmunosupresoras en el suero de personas que presentan algún tumor, aunque no es clara su importancia in vivo. La presencia de estas

sustancias podría aclarar un poco más la tolerancia inmune hacia el tumor (66).

1.3 LA CELULA TUMORAL.

Las diferencias de comportamiento entre las células tumorales y las normales aparecen tanto en células aisladas y mantenidas en cultivos, como en células tumorales en el seno de organismos multicelulares. En el caso de las células tumorales conservadas en cultivo, su comportamiento autónomo se expresa por una serie de propiedades peculiares que no ocurren en células normales y que se correlacionan con su capacidad para formar tumores.

Los cambios que se producen en la célula tumoral son variados. Las alteraciones morfológicas son en número y generalmente se presentan como un aumento o disminución, o bien pérdida de detalles morfológicos. Por otro lado, las alteraciones funcionales se reflejan sobre todo en la membrana celular.

1.3.1 ALTERACIONES EN ORGANELOS.

Las alteraciones que se presentan en la célula tumoral son bastantes, aunque resulta difícil aislar aquellos cambios en la estructura, generalmente sutiles, que pudieran ser específicos del carácter tumoral.

En las células tumorales el nucleólo es de mayor tamaño y su forma es más irregular que en las normales, y con frecuencia hay varios. Ade -

más de distintos tipos de modificaciones en el nucleólo, como penetración en la cromatina asociada al interior del organelo, aumento en el número de granulaciones de ribonucleoproteína, conformación anular, etc., también pueden observarse vacuolas únicas o múltiples, generalmente llenas de un precipitado proteico, o bien, numerosas inclusiones formadas por material granular. Estos gránulos han sido observados en los nucleólos de células de pacientes con la enfermedad de Hodgkin, y llaman la atención por el gran parecido a los gránulos presentes en células infectadas por distintos virus, como el del poliovirus o el herpes simple. Las alteraciones nucleolares son las más útiles para reconocer a las células malignas.

Las alteraciones en las mitocondrias se presentan frecuentemente en diferentes tumores. En algunos de éstos, como en el carcinoma retinal o el oncocitoma de las glándulas salivales, el citoplasma está lleno de mitocondrias, muchas de ellas de aspecto normal. En algunos tumores se han descrito mitocondrias con alteraciones en las cristas, así como disminución en su número, aparición de mielina y otras inclusiones como cuerpos densos, cristales de proteína o de glucógeno, etc. (70, 71).

En otros organelos se presentan también alteraciones como aumento o disminución en su número (lisosomas, por ejemplo hiperplasia (retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi), presencia de vacuolas (en lisosomas y nucleólo), inclusiones citoplasmáticas, etc.

Los principales cambios en la célula tumoral son los siguientes: -
a) aumento de tamaño celular, a veces en forma característica (como en el carcinoma del cuello uterino); b) variación en el tamaño del núcleo;-
c) pérdida de la relación núcleo/citoplasma, siempre en favor del núcleo; esta relación es debida no sólo al aumento del núcleo, sino también a la disminución del citoplasma; d) hiperchromatismo, debido a la poliploidía.

Además de las modificaciones mencionadas, las células tumorales -- muestran cambios anormales en sus relaciones con otros elementos tisulares; en algunos casos la alteración fundamental se manifiesta como un trastorno de comportamiento celular. Un ejemplo de esta situación es la presencia de tejido tiroideo histológicamente normal en pleno parénquima pulmonar, en forma de un nódulo metastásico. En este caso, las células han adquirido un grado tal de autonomía que son capaces de establecerse, sobrevivir, dividirse y hasta llevar a cabo sus funciones especializadas (síntesis y secreción de hormonas tiroideas, para el ejemplo mencionado) en el seno de un tejido extraño.

El otro extremo de la variación histológica de las neoplasias es -- la anaplasia marcada en que las células pierden todos sus caracteres distintivos y adoptan una morfología redondeada o fusiforme completamente -- inespecífica. Esta pérdida de la diferenciación celular se acompaña además de la pérdida de la arquitectura histológica.

1.3.2 ALTERACIONES EN MEMBRANA PLASMÁTICA.

En la célula tumoral la parte más afectada es la membrana plasmática. Por ejemplo, las células tumorales muchas veces contienen queratina-inmunoreactiva y pueden ser diferenciadas de tumores no epiteliales; los rhabdiosarcomas contienen mioglobina por lo que pueden ser diferenciados de otros tumores de tejido blando; las neoplasias cerebrales tienen su origen en las células gliales, las cuales contienen proteínas fibrosas de ácido gliálico por lo que pueden ser distinguidas de aquéllas que no tienen su origen en células gliales; y tumores mesenquimatosos, los cuales contienen vimentina, pueden ser diferenciados de los tumores no-mesenquimatosos pues carecen de esta proteína. Estos son algunos ejemplos de diferencias entre distintas células tumorales. La diferencia entre células normales y tumorales es aún mayor (80).

Todos estos cambios en la membrana plasmática, visualizados desde un punto de vista estructural, se reflejan en la ausencia de uniones celulares o bien, disminución en su número. Estas uniones sirven para mantener la estructura tisular y para la comunicación metabólica y nerviosa. Entre este tipo de uniones se encuentran los desmosomas, conexones y uniones firmes (7, 98, 104), siendo estas últimas las que disminuyen en número.

Estudios cuantitativos en las uniones firmes de distintos tipos de carcinomas de cuello uterino han demostrado que mientras el epitelio cer-

vical normal tiene diez uniones firmes por célula en la zona intermedia -- más diferenciada, entre células tumorales hay menos de una unión firme -- por célula. A manera de comparación, en los epitelios normales pero no -- neoplásicos (p. ej. metaplasia epidermoide), el número de uniones firmes -- por célula es igual al normal. Respecto a la forma, es muy frecuente que los elementos tumorales adopten varias formas y tamaños diversos, como lo son las células gigantes y multinucleadas que se observan en el esputo de sujetos con carcinoma broquiolo-alveolar.

Como se mencionó anteriormente, las alteraciones producidas en la membrana de una célula tumoral son varias. Estas se reflejan esencialmente en la pérdida de la adhesividad celular y de la inhibición por contacto, así como alteraciones inmunológicas.

1.3.2.1 ADHESIVIDAD CELULAR.

Normalmente la mayoría de las células no migran e invaden tejidos sanos; las excepciones son linfocitos, leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y otros elementos móviles. Aunque durante la morgogénesis existe migración de distintas células, cuando termina el desarrollo del individuo, los distintos elementos que lo constituyen ya han establecido relaciones de contacto de carácter permanente. La observación de que las células tumorales muestran mayor movilidad que las normales (in vitro), ha sugerido que es precisamente su movilidad lo que explica la invasión de tejidos vecinos.

1.3.2.2 INHIBICION POR CONTACTO.

Cuando se cultivan fibroblastos o células epiteliales en medios sólidos, las células se desplazan y tienen gran actividad en la membrana. Tal actividad se caracteriza por la aparición de microfilamentos en toda la periferia de la célula (109), aunque predominan en el área correspondiente a la dirección del desplazamiento. Cuando las membranas de dos células se ponen en contacto, la formación de microfilamentos cesa bruscamente y las células dejan de desplazarse, aunque las porciones de las membranas alejadas de la zona de contacto con otros elementos del mismo cultivo continúan su movimiento. Este proceso se conoce como "inhibición por contacto del movimiento celular" (70, 71). Algunos glucolípidos tienen un papel muy importante en este proceso (37, 38).

La importancia de esta inhibición por contacto estriba en que las células tumorales no la muestran. El proceso se ha relacionado con la capacidad de las células tumorales para diseminarse, invadiendo tejidos vecinos y formando nódulos secundarios o distantes del tumor primario (metástasis).

Otro proceso clásicamente relacionado con la membrana celular es la inhibición por contacto de la multiplicación: cuando la monocapa celular de un cultivo en medio sólido se aproxima a la confluencia total, hay una disminución rápida de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo que se traduce en ausencia de multiplicación celular.

Si el cultivo es de células tumorales la inhibición por contacto no ocurre, de manera que los nuevos elementos empiezan a acumularse unos encima de otros, produciendo un cultivo con varias capas de células. Esta observación se interpreta como un equivalente de lo que ocurre en el organismo, donde las células normales detienen su crecimiento al llegar a cierta densidad de población, mientras que las células tumorales continúan multiplicándose indefinidamente (70, 71).

2. PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO Y EVALUACION DE TUMORES HUMANOS.

Las pruebas de laboratorio que pueden emplearse en el estudio del cáncer son varias. Con los avances en la investigación inmunológica estas pruebas están pasando por cambios constantes, sobre todo en la presente década (por ejemplo, el estudio de las interleucinas y algunas otras sustancias es a partir de la presente década). La caracterización más detallada de las células tumorales con respecto a detalles inmunológicos están aportando nuevos datos para una mejor evaluación de la respuesta inmune en el estado tumoral. Sin embargo, dadas las características de esta tesis, nos restringiremos a mencionar a aquéllas pruebas que son empleadas en un laboratorio clínico. Estas pruebas pueden servir básicamente para ayuda en el diagnóstico de tumores humanos, evaluación del estado inmune del paciente con cáncer y como ayuda en la selección y control de la terapia.

Enseguida se mencionan ciertos aspectos generales sobre las pruebas mencionadas.

2.1 DETECCION DE ANTICUERPOS HUMORALES Y ANTIGENOS ASOCIADOS AL TUMOR.

El principio básico para la medición de anticuerpos circulantes - contra células tumorales es la medición de la interacción de las inmunoglobulinas del suero con el tumor del paciente o un componente específico. Pueden ser empleadas diferentes pruebas para la detección de antígenos tumorales. Los antígenos circulantes se pueden detectar por técnicas inmunológicas estándar como la doble difusión, el radioinmunoensayo y en general, por la técnica ELISA. Los antígenos que se encuentran en tejido tumoral y no son liberados en cantidades apreciables en la sangre, pueden ser detectados más comúnmente por medio de las siguientes pruebas: a) - pruebas de citotoxicidad; b) prueba de inhibición de formación de colonias; c) pruebas de inmunofluorescencia; y d) microscopía electrónica.

a) Pruebas de Citotoxicidad. En presencia de complemento los anticuerpos reaccionan con la superficie de la célula tumoral y de esta manera causan lisis. Las reacciones citotóxicas pueden ser medidas por la habilidad de las células viables para impedir que ciertos colorantes penetren al citoplasma. También se puede efectuar esta prueba marcando las células con cromo radioactivo y al liberarse éste, una vez que se ha llevado a cabo la reacción cito-

tóxica, puede ser medido. Esta última prueba es de las más empleadas (52).

(b) Pruebas de Inmunofluorescencia. Este método ha sido empleado en la detección de anticuerpos tumorales y antígenos en una amplia variedad de tumores (31, 99, 111). Las células se congelan y se fijan en placas de vidrio antes de que sea añadido el antisuero apropiado. En muchos casos se emplea este análisis, pues es relativamente sencillo.

c) Inhibición del Crecimiento de Células Tumorales o Formación de Colonias. Muchos tumores humanos pueden desarrollarse en cultivos de tejidos y tienen la habilidad de formar colonias. Los linfocitos sensibilizados inhibirán la formación de colonias. El método ha sido empleado para detectar inmunidad humoral y celular hacia el tumor (52).

d) Microscopía Electrónica. Aunque la microscopía electrónica no es precisamente un implemento al alcance de un laboratorio ordinario, no por esto deja de tener una utilidad excelente para localizar el sitio de reacción antígeno-anticuerpo en la membrana celular o en el citoplasma. Es común emplear anticuerpos marcados con una enzima.

2.2 EVALUACION DE REACCIONES INMUNES MEDIADAS POR CELULAS.

Los linfocitos-T tienen un papel importante en la inmunidad celular contra las células tumorales. Los linfocitos-T tienen receptores específicos que interactúan con el antígeno tumoral y pueden estar involucrados directa o indirectamente con la destrucción de células que tengan antígenos tumorales. Las células tumorales pueden ser destruidas por contacto inmediato con un linfocito sensibilizado que lleva receptores específicos (aunque los linfocitos-T no producen anticuerpos, los adquieren por absorción y probablemente son complejos inmunes unidos a receptores - Ig fracción Fc. Estas fracciones sí las produce el linfocito T). El linfocito sensibilizado puede interactuar a su vez con el antígeno libre o unido a la superficie, y así producir un gran número de factores solubles mediadores en la respuesta inmune.

Básicamente se pueden clasificar en cinco las pruebas para evaluar las reacciones inmunes mediadas por células en los procesos tumorales, -- pues son las más importantes. A continuación se hace una breve descripción de las mismas.

a) Reacciones de Hipersensibilidad Retardada. Estas reacciones -- han sido observadas después de la inoculación intradérmica de antígenos tumorales autólogos, como el del melanoma, linfoma de Burkitt, leucemia aguda, fibrosarcoma y carcinoma de seno (22). La -- evaluación de esta prueba es difícil y es preferible evaluar de --

otra forma los mecanismos de inmunidad celular.

b) Pruebas de Transformación de Linfocitos. La transformación de linfocitos in vitro por antígenos ha sido aplicada al estudio de glioblastomas, leucemias, cáncer de seno, y algunos otros tumores. Al igual que la prueba anterior, es poco su uso debido a que presenta poca especificidad.

c) Prueba de Inhibición de Formación de Colonias. En este método se mide la habilidad de las células tumorales para dividirse y formar colonias. El método ha sido empleado para detectar inmunidad celular específica hacia el tumor.

d) Prueba de Ensayo Citotóxico en Placa. Cuando los linfocitos son puestos sobre un área de un cultivo de tejidos de células tumorales, forman una placa. Los linfocitos sensibilizados causarán destrucción focal de las células tumorales en el punto de aplicación (52). El procedimiento se ha empleado para estudiar algunos tumores como el carcinoma postnasal.

e) Inhibición de la Migración de Macrófagos. Cuando los linfocitos sensibilizados son expuestos a antígenos tumorales se produce el factor de inhibición de la migración. Esta prueba ha sido empleada para detectar la inmunidad celular en casos de pacientes con cáncer de seno, y puede emplearse también para estudiar una amplia variedad de tumores.

2.3 MARCADORES TUMORALES.

Los marcadores tumorales pueden ser definidos como aquellas sustancias que son producidas por tumores y que cuando se encuentran presentes en la circulación sanguínea en cantidades significativas pueden indicar la presencia de enfermedades neoplásicas (27). En la tabla I se dan algunos ejemplos de marcadores tumorales (se excluye el antígeno carcinoembrionario que será tratado más adelante).

TABLA I. EJEMPLOS DE MARCADORES INVOLUCRADOS
EN EL ESTUDIO DE TUMORES HUMANOS.

LOCALIZACION DEL TUMOR.	MARCADOR TUMORAL	REFERENCIAS
Tracto gastro-intestinal.	Fosfatasa alcalina Regan (FAR), antígeno tisular polipeptídico (TPA), pseudouridina, alfa ₁ -fetoproteína (AFP), sulfoglucoproteína fetal (FSA); sustancias de grupos sanguíneos, antígeno carbohidrato -- 19-9 (CA 19-9), elastasa, lípido unido a ácido siálico (LBSA), etc.	80, 81, 90, 111.
Tracto genito-urinario.	AFP, FAR, antígeno carbohidrato 12-5 (CA 12-5), sustancia similar al antígeno-T, fosfatasa ácida prostática, prolactina, antígeno NB/70K, hormona beta-gonadotropina cariónica, etc.	27, 80, 90, 100
Tiroides	Calcitonina	10, 84

Los altos niveles de esos marcadores tumorales en la circulación - pueden ser debidos a: a) producción inapropiada, como ocurre con los antígenos oncofetales (antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína) y hormonas ectópicas (beta-gonadotropina coriónica, adrenocorticotropina); b) accesibilidad incrementada a la circulación, como en el caso de la fosfatasa ácida prostática; ó c) necrosis celular y liberación del contenido de la célula tumoral en la circulación, como en el caso de la pseudouridina.

No todas las sustancias utilizadas como marcadores tumorales deben ser antígenos asociados al tumor. Como ejemplo puede citarse la pseudouridina. Esta sustancia es un producto de degradación del ARN de transferencia; su determinación se puede efectuar por medio de la cromatografía-líquida de alta resolución, HPLC (81).

El uso más significativo de los marcadores tumorales es su aplicación en el manejo clínico del paciente con cáncer. Sin embargo, la aplicación exitosa en el monitoreo de pacientes para la detección temprana de recurrencia y progresión al tumor, o para evaluar los efectos de la terapia utilizada, requiere de un conocimiento profundo de la producción y metabolismo de esas sustancias. Desafortunadamente este tipo de información no siempre se conoce, ni aun para los marcadores más estudiados, y debe ser obtenida de la experiencia clínica con el marcador analizado. Puesto que el antígeno carcinoembrionario (CEA) es el marcador tumoral más empleado y por ser el tema de este trabajo, se describe detalladamente en

el siguiente punto.

3. ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNICO (CEA).

El antígeno carcinoembriónico (CEA) es una glucoproteína presente en varios adenocarcinomas y en el intestino fetal; de ahí su nombre. Fue descrito originalmente por Gold y Freedman en 1965 (35). Cuando este antígeno fue detectado en sangre de pacientes con adenocarcinomas, inmediatamente se reconoció su potencial como una prueba en el estudio del cáncer.

El CEA es un antígeno que básicamente se encuentra en la membrana celular de donde es liberado a la circulación, aunque también es localizado en pequeñas cantidades en el citoplasma (18, 31, 80, 83, 111, 115). Se ha propuesto que la síntesis del CEA es el resultado de un proceso de diferenciación desrepresiva de los genes fetales normales en las células tumorales, de tal manera que varios genes pueden codificar para distintas moléculas con diferentes determinantes antigénicos del CEA y que esos genes pueden ser controlados individualmente (83).

En tejidos tumorales mantenidos in vitro las células continúan produciendo CEA, lo cual es un hecho que puede permitir la aclaración del significado biológico, así como el modo de síntesis del CEA. Con la ayuda de cultivos celulares se ha logrado establecer que la etapa en que se acentúa la producción de CEA corresponde a la fase estacionaria de creci-

miento, mientras que la liberación del CEA (al espacio intercelular) ocurre en la fase lag (18, 116).

En cuanto al metabolismo del CEA se conoce poco, pero hay evidencias que sugieren que el CEA es metabolizado por el hígado (64, 90).

3.1 DISTRIBUCION DEL CEA EN TEJIDO NORMAL Y DAÑADO.

El CEA tiene una distribución amplia en el cuerpo en la gran mayoría de individuos. Se ha detectado en extractos de tejidos, orina, saliva, jugo gástrico, lavado colónico, heces y suero de personas normales; sin embargo, su concentración es siempre baja (77, 83, 118).

En pacientes con enfermedades inflamatorias y pectorales, padecimientos hepáticos (cirrosis, hepatitis, congestión), colitis ulcerativa; en pacientes con falla renal y cardiaca y en algunos tumores benignos -- (57, 77, 83, 118), el valor del CEA del suero puede alcanzar concentraciones ligeramente elevadas (con base en un valor de referencia), aunque generalmente más bajas que en pacientes con adenocarcinoma metastásico. En personas fumadoras también se presentan pequeñas elevaciones en el nivel del CEA.

3.2 DISTRIBUCION DEL CEA EN ADENOCARCINOMAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (GI).

Durante los últimos treinta años prácticamente no ha habido cam --

bios en la mortalidad por adenocarcinomas del tracto gastrointestinal -- (tracto GI) a pesar del avance en gran número de disciplinas enfocadas a resolver este problema (81, 86). Resultan particularmente problemáticos los casos en que aun después de una resección del tumor continúa el desarrollo tumoral. Si esa recurrencia en la enfermedad pudiera detectarse -- tempranamente, había la posibilidad de una cirugía adicional para la completa curación.

Desde que Gold y Freedman caracterizaron el adenocarcinoma colónico se indicó que el 97% de todos los pacientes tenían niveles mayores de 2.5 ng/ml (111). Reportes en los posteriores dieciséis años han demostrado que esta cifra no es tan alta, pero no es menor del 60% (12, 64, 79, 81, 86, 107, 118). Esta positividad (más de 2.5 ng/ml) es menor en las -- primeras etapas del desarrollo tumoral y mayor en la etapa metastásica. -- En este último caso la positividad sobrepasa el 90% de los casos.

Dentro del estudio de adenocarcinomas del tracto GI y su relación con los niveles del CEA, el adenocarcinoma colorectal es el más ampliamente estudiado, pues es en este caso en el que más se ha visto concordancia entre el nivel del CEA y el estadio de la enfermedad, así como con el tratamiento de la misma. En efecto, Wanebo y col. (107) han encontrado que la medición preoperatoria del CEA ayuda en la información pronóstica de -- pacientes con cáncer resectable Dukes B y C (ver tabla II). Los resultados sugieren que los niveles preoperatorios pueden ser empleados para di-

vidir a los pacientes en grupos de alto y bajo riesgo, división que deberá ser incluida en la clasificación del cáncer colorectal. Es útil el monitoreo secuencial postoperatorio en la detección de recurrencia local, - pero su utilidad se aprecia más claramente en la detección temprana de metástasis al hígado (64, 107, 118).

La relación existente entre niveles del CEA y cáncer también se presenta en otros sitios del tracto GI, además de la región colorectal. Un ejemplo claro de esto es el carcinoma gástrico en el que el nivel del CEA se encuentra elevado (más de 2.5 ng/ml) en más del 50% de los casos (79).

TABLA II. RELACION DEL CEA Y ESTADO DEL TUMOR
EN PACIENTES CON CANCER COLORECTAL +

ESTADO DEL TUMOR	NUMERO DE PACIENTES	CASOS CON CEA MAYOR DE 2.5 ng/ml	CASOS CON CEA MAYOR DE 10.0 ng/ml
Lesiones colónicas benignas	47	10 (21%)	- - -
Dukes A ++	58	16 (28%)	- - -
Dukes B (51) y Dukes C (63)	114	70 (61%)	27 (9%)
Dukes D	31	26 (84%)	19 (61%)
Recurrente o metastásico	155	125 (81%)	96 (62%)

+ Modificado de Wanebo y col. (107).

++ La clasificación original de Dukes del cáncer colorectal comprende -- tres estadios; el cuarto se agregó posteriormente. A: cáncer invasivo confinado a la pared intestinal sin haber penetrado la muscularis; B: cáncer extendido a través de la muscularis (en recto o colon); C: -cáncer metastásico en nódulos linfáticos; D: cáncer que ha perforado, con sembrado peritoneal, extensión a otros órganos, metástasis al hígado, o cáncer primario no-resectable.

En otro de los órganos del tracto GI, en el páncreas, se pueden presentar varios tipos de cáncer. Horie y col. (51) han estudiado uno de ellos, el carcinoma acinar y ha encontrado que en el cáncer bien diferenciado la correspondencia con los niveles del CEA es menor que la existente con cáncer pancreático pobremente diferenciado. Sin embargo, en los demás tipos de cáncer pancreático, sobre todo en el ductal (y hay que recordar que la mayoría de los tumores pancreáticos son de origen ductal) (51) sí se observa correspondencia con los niveles del CEA, según lo reporta Zamcheck (118) y Satake y col. (87). El primero de ellos ha encontrado además que el nivel del CEA es positivo (más de 2.5 ng/ml) más frecuentemente que cualquier otra prueba, incluyendo series (rayos-X) de tracto GI alto, duodenografías, arteriografía coeliaca y colangiografía transhepática percutánea.

El estudio del CEA no se limita a la determinación de este antígeno en sangre, sino también comprende el estudio inmunocitoquímico. La aplicación de este tipo de estudios ha servido para correlacionar el CEA tisular con el estadio del tumor, y como una aplicación práctica, para establecer un pronóstico (56, 114). Un ejemplo claro de esto se presenta en el cáncer gástrico en el que se ha encontrado que en más del 50% de los casos está presente el CEA en tejidos obtenidos por biopsia y posteriormente teñidos para CEA usando la técnica de la inmunoperoxidasa; otro ejemplo es en adenocarcinomas de endometrio y endocérnix (102). Sin embargo, para otros tumores se ha demostrado que la tinción para CEA no es tan alta y de hecho parece no haber relación entre tinción y tumor (33, -

76, 99), como sucede en adenocarcinomas del intestino delgado y próstata, que son dos ejemplos claros. Perzin (76) hace notar que ésto se puede deber a que el estudio inmunocitoquímico no siempre es de tejidos tumorales, pues aproximadamente la mitad de dichos carcinomas han sido descritos como lesiones "invisibles" y muchas de las veces los carcinomas son descubiertos solamente durante el examen microscópico. Así, el análisis-inmunoquímico para CEA es limitado y se debe básicamente a que el análisis se efectúa con una mínima parte de tejido y, considerando la heterogeneidad del tumor (23, 111), la muestra no es tan representativa, pues dentro de un mismo tejido tumoral el CEA es sintetizado por algunas células y por otras no. Este problema en la falta de relación no se presenta cuando el CEA es determinado en sangre, pues en este fluido el antígeno se encuentra homogéneamente distribuido.

3.3 PRESENCIA DEL CEA EN VARIOS TUMORES.

La producción del CEA se presenta en tejidos cancerosos de diversos órganos además de los del tracto GI (ver tabla III). Se han encontrado niveles de CEA aumentados en el suero de pacientes con cáncer de seno, de tracto genitourinario y respiratorio; en cáncer de tiroides y glándulas salivales; en neuroblastoma, sarcoma osteogénico, leucemia y enfermedad de Hodking (10, 14, 27, 31, 67, 68, 72, 80, 84, 87, 92, 99, 100).

La relación de niveles de CEA y estadio de enfermedad es buena sobre todo en cáncer pulmonar y de seno; en neuroblastoma la corresponden-

cia es del 100%. En los demás tipos de cáncer la relación es mala o definitivamente es inexistente.

TABLA III. DISTRIBUCION DEL CEA +

	NUMERO DE CASOS	VALOR DE CEA	
		0 a 3 ng/ml	más de 3 ng/ml
PERSONAS SANAS			
No-fumadoras	413	97%	3%
Fumadores	129	83%	17%
Total	542	94%	6%
CARCINOMA ++			
Colorectal	454	49%	51%
Pulmonar	206	47%	53%
Gástrico	52	46%	54%
De seno	191	73%	27%
Páncreas	44	48%	52%
De ovario	158	79%	21%
Uterino	44	66%	34%
Otros	180	63%	37%
ENFERMEADES NO MALIGNAS			
Cirrosis hepática	22	32%	68%
Colitis ulcerativa	25	92%	8%
Diverticulitis	47	70%	30%
Pólipos rectales	39	87%	13%
Otros tumores benignos (no de seno)	51	86%	14%
Otros	560	76%	24%

+ Modificado de "Procedimiento CEA-EIA" (79).

++ La frecuencia de positividad de los niveles del CEA es significativamente más baja en pacientes con no-evidencia de enfermedad activa, comparados con aquéllos con enfermedad activa.

Los adenocarcinomas de la cavidad pleural se han estudiado haciendo la comparación entre la concentración del CEA de las efusiones pleurales y la del suero, para diferenciar entre carcinoma epitelial y no epitelial (p. ej.) para diferenciar entre un adenocarcinoma y un mesotelioma, encontrándose que sólo en los carcinomas epiteliales es donde se encuentra elevado el CEA, tanto en la efusión pleural como en el suero; además, en los pacientes con algún tumor que involucre el espacio pleural la relación (cociente) CEA del fluido pleural/CEA del suero es mayor de 1.0 en la mayoría de los casos (21, 50).

3.4 CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL CEA.

El CEA es una glucoproteína soluble en ácido perclórico 1 mol/L, tiene una movilidad beta-electroforética, un coeficiente de sedimentación de 7 a 8 S, y un peso molecular entre 180,000 y 200,000 (2, 58, 59, 79, 80). El procedimiento para la obtención del CEA consiste en la homogenización del tejido tumoral (de colon humano generalmente) con una solución amortiguadora, extracción con ácido perclórico, y posteriormente la purificación. Esta es la parte más variable con respecto a la forma en que la llevan a cabo los diferentes laboratorios. El extracto rico en CEA es absorbido con suero anti-NCA (el NCA es un antígeno que da reactividad cruzada con el CEA). Con este procedimiento el extracto de CEA ya no contiene NCA y posteriormente se purifica por cromatografías repetidas en Sepharosa-Concanavalina A (Sepharosa-Con A), Sephadex G-200, Sephacryl S-200. La columna de Sepharosa-Con A se emplea al principio y al final

de la purificación. Una vez que se efectúa el procedimiento anterior, se analiza la pureza del CEA, casi invariablemente de la siguiente forma: el CEA obtenido es adsorbido en suero anti-CEA previamente purificado en el laboratorio (o bien, del abastecido por alguna compañía como DAKO) y el inmunoprecipitado resultante es analizado por electroforesis en gel de --acrilamida-dodecil sulfonato de sodio (SDS PAGE) (58, 59).

La cantidad de carbohidrato de preparaciones de CEA varía entre 50 y 60%. La composición de aminoácidos de diferentes preparaciones de CEA es muy similar. Este antígeno es rico en ácido glutámico y aspártico y serina (59).

El CEA es un solo péptido con muchas cadenas de oligosacáridos unidos por medio de enlaces N-glucosídicos a los residuos de asparagina. Sin embargo, no puede descartarse que contenga algunos oligosacáridos unidos al péptido por medio de enlaces con el oxígeno (enlaces O-acil y O-metil), aunque este tipo de enlaces aún no ha sido demostrado en preparaciones purificadas de CEA (58).

Algunas investigaciones indican que la parte de carbohidratos posee alguna actividad antigénica (54, 69); sin embargo, se considera que los mayores inmunodeterminantes del CEA residen en la parte proteica (6, 54, 58). Kuroki y col. han encontrado que tres de las principales determinantes antigénicas del CEA están presentes en la parte proteica.

Es importante señalar que la mayoría de los investigadores han coincidido en afirmar que hay varias moléculas de CEA, e inclusive hay quienes las han clasificado como CEA-1, 2, 3. Estos hechos indican que la molécula de CEA es heterogénea (8, 11, 25). Sin embargo, la heterogeneidad no afecta sustancialmente los ensayos del CEA (ver más adelante, punto 3.6).

Varios investigadores han identificado CEA y antígenos parecidos en una gran variedad de tejidos tumorales y normales, incluyendo los tejidos del tracto GI normal (5, 34, 80, 99). Los antígenos de tejido normal que dan reactividad cruzada con el CEA fueron reportados por primera vez en 1972. Posteriormente han aparecido al menos diez casos de antígenos que dan reactividad cruzada, y han sido encontrados en tejido normal y neoplásico. Aproximadamente la mitad de esos antígenos son considerados ahora como idénticos (por criterio inmunoquímico), y se les ha llamado NCA+ (59). Este antígeno es el más importante de los que dan reactividad cruzada con el CEA, pues es el que la presenta en mayor grado.

Las propiedades físicas y químicas del grupo de antígenos parecidos al NCA es variable, por lo que pueden estar incluidas en este grupo diferentes especies. Los pesos moleculares estimados de estas moléculas

+ Del inglés "Nonspecific Cross-reacting Antigen".

TABLA IV. COMPARACION DE LA COMPOSICION QUIMICA ENTRE NCA Y CEA.

AMINOACIDO	PORCIENTO MOLAR	
	NCA ++	CEA
Ac. aspártico	14.7	14.7
Treonina	8.3	8.6
Serina	8.9	10.3
Ac. Glutámico	11.7	10.3
Prolina	7.8	7.6
Glicina	6.9	5.9
Alanina	6.6	6.1
Cisteína	1.7	1.9
Valina	7.1	6.8
Metionina+++	- -	0.3
Isoleucina	4.6	4.7
Leucina	8.5	8.7
Tirosina	4.2	3.5
Fenilalanina	2.5	2.2
Lisina	2.8	3.0
Histidina	1.4	1.8
Arginina	3.4	3.8
CARBOHIDRATO	PORCIENTO EN PESO	
Manosa	10.7	5.9
Fucosa	2.8	7.5
Galactosa	0.7	10.4
N-Ac. Galactosamina	10.7	26.6
Ac. siálico	no determinado	2.0
Aminoác. totales	74.3	47.7
Carbohid. totales	24.9	52.4

+ Modificado de Laferté y Krantz (59).

++ Esta molécula de PM 50,000 corresponde Inmunoquímicamente a varios antígenos llamados NCA.

+++ El NCA no contiene metionina. La presencia de este aminoácido en algunas preparaciones de NCA es debida a material copurificado (2).

son de alrededor de 50,000 (5, 59) y de 100,000 a 120,000 en otros casos (5, 80). El contenido de carbohidratos del grupo de antígenos parecidos al NCA es de alrededor del 25%, comparado con el 60% ó menos del CEA, lo que indica que las moléculas de NCA también tienen cadenas complejas de oligosacáridos (5, 59). La composición de aminoácidos es también parecida, pero hay una diferencia notable: el NCA no contiene metionina (2). En la tabla IV se presenta una comparación más detallada entre la composición del CEA y el NCA.

La reactividad cruzada del NCA y CEA es aparentemente por medio de una inmunodifusión pero en un radioinmunoensayo e inmunoensayo enzimático dicha actividad es mínima o despreciable (25, 62).

3.5 UTILIDAD CLINICA DEL CEA.

Antes de evaluar la utilidad de las mediciones del CEA, debemos en tender el contexto en que se da esta prueba. El CEA es un marcador tumoral y de éstos hay varios; el análisis de los marcadores tumorales es una de las pruebas de laboratorio empleadas para evaluar un estado tumoral, pero hay otras que se utilizan con el mismo fin. Además, existen otro ti po de estudios para examinar al paciente (p. ej. endoscopías, ultrasono - grafías, etc.). Cuando se dispone de todos los resultados es cuando real mente se puede evaluar exitosamente un proceso tumoral.

El CEA es el marcador tumoral más ampliamente usado y aunque a ve-

ces su utilidad se ve limitada, con bastante frecuencia se ha comprobado su utilidad.

3.5.1 CEA Y DIAGNOSTICO DE CANCER.

Dentro de las limitaciones para utilizar la determinación del CEA con fines de diagnóstico temprano de cáncer endodermal, se tienen los siguientes hallazgos:

1) No todos los pacientes con cáncer tienen valores de CEA elevados (10, 27, 80, 84, 90, 100). En general, se ha descrito que sólo el 50-60% de pacientes con adenocarcinomas del tracto GI, de seno y de pulmón presentan valores elevados (79). Debido a esta restricción, un resultado positivo para CEA no es la regla para afirmar que existe una enfermedad neoplásica (ver tabla III).

2) El aumento del nivel del CEA se observa más frecuentemente en pacientes con metástasis que en aquéllos que no la presentan todavía (27, 81). Por ejemplo, en el cáncer colorectal (107) el CEA presenta un aumento hasta que el cáncer alcanza el estado a Dukes-D, o lo pasa (ver tabla II). Es por esto que no es adecuado el uso del CEA para establecer un diagnóstico temprano de cáncer.

3) Hay elevaciones del CEA en pacientes sin cáncer (81). Los resultados falsos-positivos se presentan en varias alteraciones be -

nignas o inflamatorias (ver tabla II), aunque las elevaciones del CEA no exceden cuatro o cinco veces el valor más alto del intervalo de referencia. En este tipo de desórdenes el nivel del CEA presenta una caída cuando ha pasado la fase aguda de la enfermedad; - un valor falso-positivo puede ser identificado algunas veces por este comportamiento. Un incremento significativo en los niveles del CEA y que continúa en aumento en determinaciones seriadas es altamente sugestivo de una enfermedad neoplásica (81).

3.5.2 EL CEA EN LA DETECCION DE RECURRENCIA Y PROGRESION DEL TUMOR.

En primer lugar es necesario establecer el nivel del CEA para cada paciente; los valores posteriores de este marcador serán interpretados con respecto a esta línea base original. Este tipo de acciones ayuda a distinguir un cambio significativo en el nivel del CEA. Este término "significativo" puede interpretarse de varias formas, por ejemplo, en la evaluación del cáncer de seno se ha visto que son importantes las fluctuaciones del CEA que exceden del 20%. También se ha reportado que dos cambios consecutivos mayores del 12% han sido acompañados por una respuesta clínica positiva (disminución del CEA) o por progresión del tumor (aumento del CEA). Este comportamiento se ha visto en pacientes con cáncer de seno. En cáncer del tracto GI se han considerado significativos los cambios mayores del 35%. Otros investigadores consideran necesaria una evaluación más profunda del paciente con cáncer de colon, con posibilidad de cirugía, cuando el nivel del CEA tenga un cambio que exceda el nivel ba -

sal por más de dos desviaciones estándar (25, 67, 68). Con estos datos se pueden identificar a aquellos pacientes que requieren un exámen más -- contínuo que puede consistir en análisis más frecuentes de CEA.

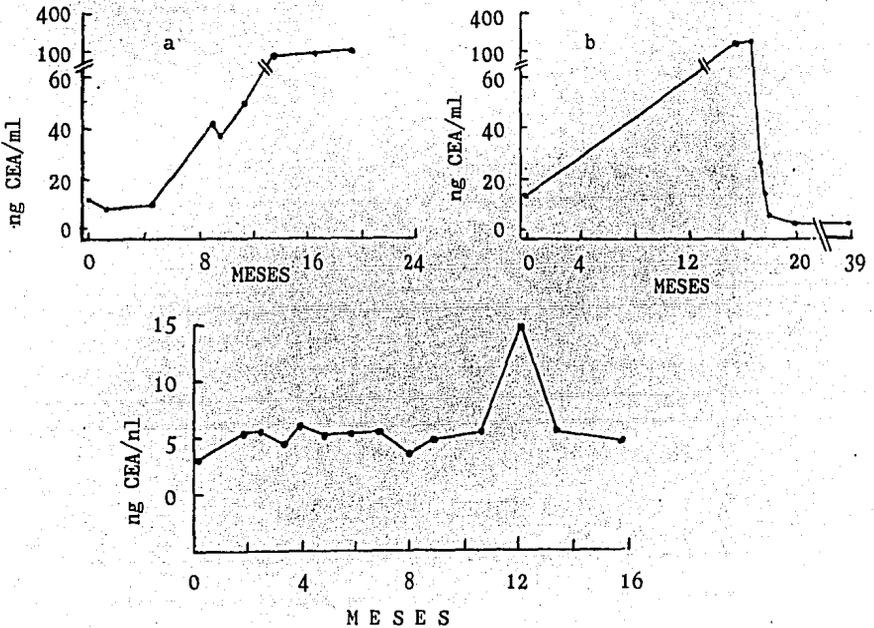
La frecuencia con que se efectúen los análisis es algo que aún no está definido, pues depende de varios factores como el tipo de tumor, estado del paciente y experiencia que se tenga con este marcador.

Un análisis útil en las determinaciones seriadas del CEA es el análisis de la gráfica que resulta de relacionar tiempo de tratamiento de la enfermedad con el nivel del CEA obtenido a lo largo de dicho tratamiento-- (ver figura I). Este es un método útil para lograr establecer la diferencia entre una recurrencia local del tumor y metástasis del mismo. Al respecto, varios investigadores han confirmado que un incremento rápido del nivel del CEA está más estrechamente asociado con un proceso metastásico-- que con una recurrencia local, por lo que debe haber mucho cuidado en la interpretación de la gráfica. A veces una elevación del nivel del CEA -- puede ser consecuencia de metástasis y no debido precisamente a la presencia de una gran masa tumoral (27).

3.5.3 CEA Y RESPUESTA A LA TERAPIA.

El uso más definido y por lo tanto más práctico del CEA es en la -- evaluación de la eficacia de la terapia. En esta evaluación también se -- pueden presentar algunos resultados falsos--negativos, pero hay que subrayar que esta falta de concordancia es mínima.

FIGURA I. VARIACIONES DEL NIVEL DEL CEA DURANTE EL TIEMPO DE TRATAMIENTO DEL ADENOCARCINOMA.



- Ia. INCREMENTO DEL NIVEL DEL CEA, ASOCIADO CON PROGRESION DEL TUMOR + - (cáncer de colon). En el mes 18 la laparatomía exploratoria reveló metástasis a los nódulos periaórticos. El paciente murió en el mes número 20.
- Ib. DISMINUCION DEL NIVEL DEL CEA, ASOCIADO CON UN TRATAMIENTO EFECTIVO.+ (cancer de colon). En el mes 18 se practica cirugía (hemicolectomía) y para el mes 39 el paciente está clínicamente sano.
- Ic. VARIACION FALSA-POSITIVA DEL CEA, ASOCIADA CON UNA ENFERMEDAD NO TUMORAL⁺⁺ (cáncer de seno). Entre los meses 11 y 14 la paciente presentó una influenza severa, siendo ésta la causa de la elevación del nivel-del CEA⁺⁺⁺.

+ Ejemplos tomados de M.E.D. Com. (65).

++ Ejemplo tomado de Fritsche y col. (27).

+++ Deberá notarse que este aumento es "momentáneo" (3 meses) comparado con el aumento constante durante un proceso metastásico, como en los casos de las figuras Ia y Ib en los que el aumento continúa durante 18 meses.

Un problema que se presenta algunas veces es la obtención de resultados falsos-negativos. Habitualmente ocurren cuando los pacientes están respondiendo a la terapia: aún cuando no hay una completa remisión del tumor, el nivel del CEA disminuye al valor original, cayendo incluso en el rango normal; la explicación a este hecho es que la masa tumoral se ha reducido a un tamaño tal que ya no es capaz de producir cantidades significativas de CEA. En otras ocasiones la masa tumoral puede ser bastante grande y clínicamente evidente y la razón por la cual el nivel de CEA ha disminuído está en función de la heterogeneidad del tumor (81); ésta parece ser la base de los resultados falsos-negativos. Otra explicación tiene como base la sensibilidad (susceptibilidad) de los diferentes tipos celulares al agente quimioterapéutico.

Cuando se usa el CEA para el monitoreo de pacientes después de una cirugía, se recomienda que la determinación de este marcador se realice de dos a cuatro semanas después de la cirugía. En pacientes a los que se les ha resectado completamente su tumor gastrointestinal, el nivel del CEA vuelve a ser normal después de un período de dos a seis meses. Los valores postoperatorios del CEA que continúan en aumento pueden ser debidos a una incompleta resección, recurrencia, o metástasis del tumor.

Por último, las mediciones seriadas del CEA pueden ser indicadoras para el cambio temprano de la terapia, interrumpiendo así una terapia no efectiva y evitando efectos tóxicos innecesarios.

Es necesario recalcar que en todos los casos debe establecerse el nivel basal para cada paciente. Este nivel es la referencia para la interpretación de los resultados posteriores. Si el análisis del CEA va a ser empleado como un monitor clínico de la enfermedad, la discrepancia -- ocasional entre los dos métodos de análisis indica que siempre hay que utilizar el mismo método; si es necesario cambiar de método de análisis, se deberán efectuar mediciones adicionales con el nuevo método (25).

A pesar de la buena correlación entre los niveles del CEA y los cambios en el estado clínico del paciente, deberá recordarse que las decisiones para cambiar o mantener una terapia y efectuar o no una cirugía de ben estar basadas en TODAS las evidencias y resultados disponibles, tanto clínicas como del laboratorio. En este contexto, las mediciones del CEA nos dan una confirmación excelente de datos (25, 81).

R E S U M E N

La utilidad de las determinaciones del CEA debe evaluarse de acuerdo a las tres situaciones diferentes previamente descritas: diagnóstico de cáncer, recurrencia y progresión del tumor, y respuesta a la terapia. En el diagnóstico de cáncer la utilidad del CEA es prácticamente nula, por lo que este análisis no debe emplearse como escrutinio para la detección de cáncer. En el diagnóstico de recurrencia (regresión) y progresión del tumor, la utilidad es buena. Por último, el mayor uso y beneficio de la determinación del CEA es en el manejo terapéutico del paciente.

3.6 FUNDAMENTO DE LOS METODOS DE ANALISIS DEL CEA.

Los métodos de análisis del CEA que más se emplean son el radioinmunoensayo (RIA) y el inmunoensayo enzimático (EIA).

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica muy especializada con una amplia variedad de aplicaciones. Es rápida, sensible y precisa. La concentración de un antígeno desconocido se determina midiendo su habilidad para competir con una cantidad fija de antígeno radiomarcado para una cantidad limitante de anticuerpo. Este último puede estar inmovilizado o en un soporte insoluble, o en solución.

El inmunoensayo enzimático (EIA) que se emplea en la determinación del CEA es un sistema en fase sólida basado en el principio del "emparedado". Este lo forman el soporte recubierto con anti-CEA, el CEA presente en la muestra y suero anti-CEA conjugado con una enzima. Las características de este método y del RIA se resumen en la tabla V. El EIA que es el método de análisis empleado para el presente trabajo, es expuesto detalladamente en el siguiente capítulo.

Tanto el RIA (de la compañía Hoffman-La Roche) como el EIA (de Abbott Laboratories) son los más empleados, pero no son los únicos: hay otros equipos RIA como el de las compañías DAKO (Dinamarca) y CIS-SORIN (Italia), así como variedades de este análisis como el ensayo inmunométrico, IRMA (105); el EIA también presenta una variación que es el in-

munoensayo enzimático monoclonal, M-EIA, en el que se emplean anticuerpos monoclonales.

En el presente estudio solamente hacemos la comparación entre el RIA de Roche y el EIA de Abbott pues son los de uso común en el laboratorio clínico y por el hecho de que son los únicos aprobados (junto con el RIA de Abbott, no evaluado en este texto) por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (U. S. Food and Drug Administration).

TABLA V. COMPARACION ENTRE RIA Y EIA

	RIA (Roche)	EIA (Abbott)
Suero o plasma	1.0 ml	0.5 ml
Extracción con	ácido perclórico	acetato de sodio y calor
Diálisis o cromatografía en columna.	+	-
Reactivo marcado	^{125}I -CEA	CEA:peroxidasa
Separación del complejo Antígeno-Anticuerpo.	+	-
Duración aproximada del ensayo.	24 horas	6 horas
CV intraensayo ⁺	5.5%	9.0%
CV interensayo	12.5%	9.2%
Sensibilidad	0.25 ng/ml	0.25 ng/ml.

+ CV = coeficiente de variación. Estos parámetros corresponden a las investigaciones de Maiolini y col. (62) y Fleisher y col. (25). El coeficiente de correlación entre ambos métodos es de 0.95 y al igual que el CV se conserva hasta una concentración de CEA de 1,000 ng/ml.

En lo concerniente al estudio de los dos métodos, Fleisher y col. (25) han encontrado que hay una buena concordancia entre estos dos métodos, por lo que no se puede afirmar que un método es mejor que otro. Se ha visto una buena concordancia que se refleja en los siguientes parámetros: coeficiente de correlación, $r = 0.95$; coeficiente de variación (CV) intraensayo de 5.5% (RIA) y 9% (EIA), lo cual nos habla de una leve variación (muy aceptable); finalmente, CV interensayo de 12.5% y 9.2% para RIA y EIA, respectivamente (25, 62).

Existen casos en que los resultados obtenidos por los dos métodos no concuerdan; específicamente, en los niveles de CEA obtenidos de pacientes con cánceres de colon y páncreas. Es importante aclarar que esta falta de concordancia resulta de comparar RIA vs. EIA y no nivel de CEA vs. estado del paciente, pues como se ha mencionado repetidamente, existe una excelente relación entre el nivel del CEA y el estado del paciente en los casos señalados (cáncer de colon y páncreas).

La discrepancia señalada es muy grande (21.3%) para considerarla error analítico. Una explicación razonable a estas diferencias entre los dos métodos es la heterogeneidad de las moléculas del CEA; este antígeno abarca una serie de glucoproteínas caracterizadas por varias relaciones carbohidrato/proteína, así como diferencias en la composición de aminoácidos, en los residuos de monosacáridos (particularmente contenido de ácido siálico), movilidad electroforética y reactividad cruzada (6, 8). Además, se ha reportado heterogeneidad del CEA en preparaciones aisladas de

tumores de diferente origen anatómico, así como de tumores del mismo tipo, e inclusive del mismo origen tisular. Hay evidencias también de que el uso de isótopos radioactivos pudiera afectar ciertas fracciones moleculares presentes en las preparaciones del CEA, lo cual pudiera alterar la reactividad cruzada del CEA.

Si bien hay diferencias entre ambos métodos, éstas desaparecen al emplear solamente uno de los métodos, pues la principal discrepancia parece radicar en la identidad del antígeno usado en cada método, y ya ambos han sido comparados con un tercer antígeno, el Estándar Internacional de Referencia 73/601 (60), demostrando una excelente correlación (25, 62,88).

4. VALORES DE REFERENCIA.

La interpretación de los resultados obtenidos en el análisis de alguno de los componentes de una muestra biológica puede indicar un cambio, una falta de cambio, o un potencial cambio en el estado de salud de un paciente. Para que esta interpretación tenga validez, es necesario comparar los resultados con algún intervalo de valores. Este intervalo será referido como "intervalo de referencia".

En el medio clínico un intervalo de referencia generalmente se construye para incluir el rango de valores encontrados en el 95% de una población de personas sanas. Desafortunadamente en ocasiones este intervalo se interpreta considerando solamente los límites inferior y superior

entre los cuales los valores del paciente deberán caer, asumiendo que él presenta un cierto estado de salud.

Anteriormente el término "valores normales" fué usado en la mayoría de los casos para caracterizar los valores encontrados en personas sanas. La palabra "normal" ha sido confundida en la química clínica, pues se ha asumido que representa a la persona (sana) normal y a la distribución (Gaussiana) normal.

En la década pasada se cambiaron sustancialmente los conceptos sobre rango normal, así como de las bases matemáticas para la aplicación de los valores normales (15, 28, 43-48, 89, 112). Grasbeck⁺ introdujo el concepto de "valores de referencia" y recomendó que fuera eliminado el término "valores normales".

Los valores de referencia pueden ser definidos como una serie de valores de concentración de un cierto analito⁺⁺ obtenibles de un solo individuo o un grupo de individuos correspondientes a una descripción establecida. Esta descripción debe ser explicada en detalle. Para cada tipo de analito será necesaria una serie de grupos de referencia tomando en consideración la edad, sexo, raza, dieta previa, etc..

+ Grasbeck, Cit por, Galen, R. S (28).

++ Sustancia o componente en una muestra para la cual se efectúa el análisis; habitualmente el término "analito" es aplicado a un componente de una muestra biológica de un paciente.

El proceso para la obtención y caracterización de los valores de referencia incluye los siguientes puntos: (1) definición de la población de sujetos, (2) selección de sujetos, (3) obtención, procesamiento y análisis de la muestra, y (4) análisis estadístico de los datos obtenidos.

4.1 DEFINICION DE LA POBLACION.

La comparación entre un valor observado y los valores de referencia obtenidos de individuos de referencia es válida solamente si el individuo observado se asemeja suficientemente a los individuos de referencia en todos los aspectos. Esta condición es generalmente imposible de cumplir completamente en la práctica clínica. Sin embargo, la compatibilidad puede ser asegurada considerando todos los factores demográficos fácilmente reconocibles como sexo, edad, raza, etc., así como factores geográficos de la población estudiada.

Otro aspecto importante en la definición de la población es el nivel de salud. Este deberá ser especificado claramente para determinar posteriormente qué individuos podrán ser valorados clínicamente de acuerdo a los valores de referencia obtenidos.

4.2 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS.

Una muestra de población de valores puede ser caracterizada estadísticamente por medio del promedio, la mediana, la moda, varios P-porcen

tiles, varianza, desviación estándar, número de distribución, número acumulativo de distribución, y fracción del número acumulativo de distribución. Una muestra de población de valores puede ser empleada para hacer inferencias acerca de la distribución y los parámetros de la población total de valores de la cual fué tomada.

Además de la adecuada selección de la muestra de población, el punto más importante para la obtención de los valores de referencia es el de determinar la forma de distribución de los valores obtenidos. La construcción de un histograma ayuda en esta determinación. Para algunos datos el histograma tiene una forma parecida a una curva plana simétrica que es aproximadamente Gaussiana (ver Fig. II-A). Para otros datos la curva del histograma puede exhibir un sesgo positivo o negativo (desviación de la curva hacia la derecha o hacia la izquierda, respectivamente), o bien tener un pico (curtosis) diferente del que caracteriza una distribución Gaussiana. Tales datos deberán ser tratados en forma diferente a aquéllos que tienen o se aproximan a una distribución Gaussiana.

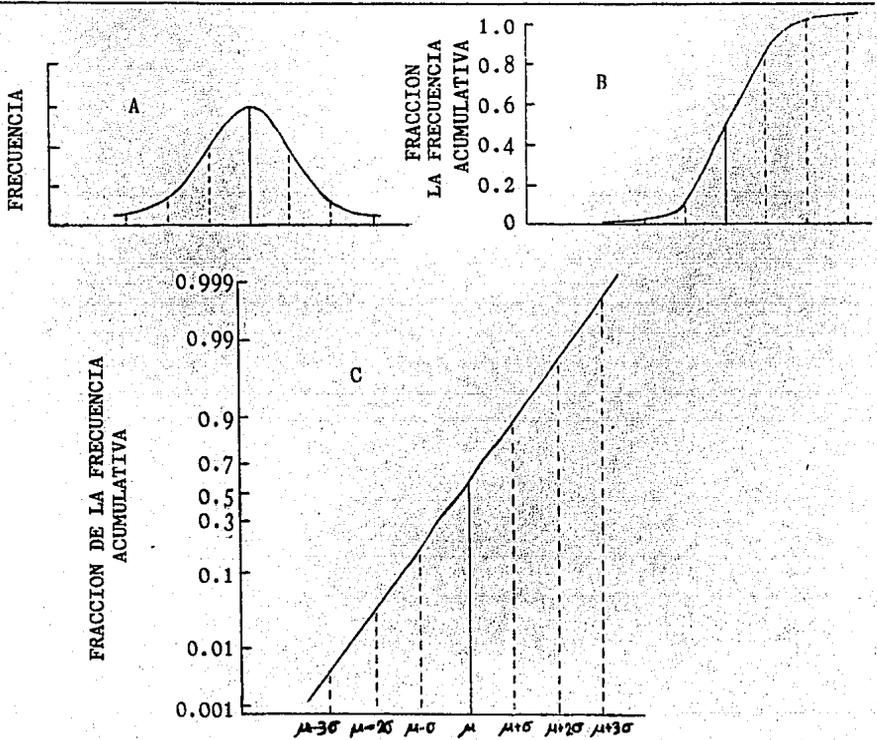
TABLA VI. TERMINOS Y SIMBOLOS EMPLEADOS EN ESTADISTICA PARA CARACTERIZAR LOS VALORES OBTENIDOS.

TERMINOS Y SIMBOLOS	POBLACION	MUESTRA DE POBLACION
Número de observac.	N	n
Promedio de valores	$\mu = \sum_{i=1}^N x_i$	$\bar{x} = \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{i=1}^n x_i$
Varianza	$\sigma^2 = \left(\frac{1}{N}\right) \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2$	$S^2 = \left(\frac{1}{n-1}\right) \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$
Desviación estándar	$ \sqrt{\sigma^2} $ ó σ	$ \sqrt{S^2} $ ó S

La distribución Gaussiana se refiere a un mecanismo probabilístico hipotético que es aplicable solamente para poblaciones de un número infinito de observaciones, para observaciones que son continuas, y para las que teóricamente pueden ser infinitamente grandes o infinitamente pequeñas. En la práctica, el modelo Gaussiano puede ser muy útil en la mayoría de los casos en que la población es grande y finita, y la distribución del número acumulativo de valores se aproxima a la distribución Gaussiana. Este método no debe ser aplicado ciegamente para todas las poblaciones de valores de todos los análisis, sino que cada caso debe ser examinado individualmente para demostrar que se apega razonablemente al modelo. Deberá recordarse que la integral (suma) de la densidad de probabilidad sobre todos los posibles valores (esto es, de menos infinito a más infinito) es igual a uno. Así, el área total bajo la curva en la figura I-A es igual a 1.000, y el área delimitada por el eje-X, la curva y dos líneas verticales cualesquiera, es igual a la probabilidad de que un valor X caiga en dicha zona. El área comprendida entre las líneas verticales perpendiculares a los valores $(\mu - \sigma, \mu + \sigma)$ es 0.6826, esto es, la probabilidad de que el valor X caiga en el rango del promedio \pm una desviación estándar; para $(\mu - 2\sigma, \mu + 2\sigma)$, la probabilidad es de 0.9554; y para $(\mu - 3\sigma, \mu + 3\sigma)$, es de 0.9974.

Cuando los datos tienen una distribución Gaussiana (normal), la distribución del número acumulativo de valores deberá mostrar solamente desviaciones muy pequeñas de las curvas mencionadas como ideales.

FIGURA II. FORMAS DIFERENTES EN QUE PUEDE REPRESENTARSE GRAFICAMENTE LA DISTRIBUCION GAUSSIANA (NORMAL).



Todas las curvas muestran la distribución según el modelo Gaussiano. La abscisa corresponde a unidades de concentración.

La primera curva (A) representa la distribución de probabilidad en función de la frecuencia de valores. La curva de enmedio (B) describe la distribución acumulativa de probabilidad en papel gráfico convencional. - La última gráfica (C) presenta la distribución acumulativa de probabilidad, graficada en papel de probabilidad.

Si los datos no siguen una distribución Gaussiana pueden ser transformados empleando alguna de las siguientes relaciones: $1/x$, \sqrt{x} , $\log x$, $-\log(x + C)$, donde C es una constante a determinar según los datos (44, -45). Una vez transformados los datos, éstos son examinados para determinar si siguen una distribución Gaussiana.

Para muchas de las pruebas estadísticas resulta necesario suponer que la población tiene distribución normal. Si es normal, puede estimarse el error que se comete al hacer deducciones o inferencias acerca de la población, fundándose en datos muestrales. A las pruebas estadísticas aplicadas en el caso anterior se les llama pruebas paramétricas. Si la distribución no es normal, el error puede ser grande y no cabe estimarlo; en consecuencia, es útil conocer algunas pruebas en las cuales no suele necesitarse una suposición acerca de la distribución de la población; se llaman pruebas no-paramétricas. En éstas se aplica un requisito menos estricto que la normalidad a la distribución de la población; en la actualidad, las pruebas no-paramétricas incluyen cualquier prueba en el que se utilizan datos categóricos u ordenados por rangos, siendo la estimación de los P-porcentiles una de las más recomendadas en la estadística clínica. Un estudio estadístico más detallado está lejos del alcance de esta tesis, por lo que se remite al lector a la bibliografía especializada (3, 9, 15, 17, 28, 32, 43-48, 89, 94, 112).

CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODO.

1. MATERIAL.

A continuación se enlista el material empleado en la determinación del CEA. La primera lista corresponde al equipo y reactivos que normalmente encontramos en un laboratorio y la segunda, al equipo y reactivos comerciales con los que se efectúa el inmunoensayo enzimático.

1.1 EQUIPO NORMAL.

a)	Pipetas automáticas de 0.2, 0.3, 0.5 y 1.0 ml	Clinicon
b)	Baño de agua a temperatura controlada (+ 1°C)	Riosa
c)	Agitador de tubos vortex	Clay Adams
d)	Bomba de vacío	Gast (MFG - Corp.)
e)	Bomba de agua	Gorman-Rupp
f)	Refrigerador	IEM
g)	Parafilm "M"	American Can Co.
h)	Centrífuga clínica	Solbat
i)	Tubos de vidrio de 13 x 100	Pyrex
j)	Jeringas desechables de 10 ml	Plastipak
k)	Puntas para pipeta automática	Clinicon

1) Pipetas volumétricas de 2 y 5 ml

Pyrex

1.2 EQUIPO, REACTIVOS Y CARACTERISTICAS.

a) Espectrofotómetro "Quantum II". Este aparato es un analizador que mide las Absorciones (Extinciones) de muestras líquidas y convierte esas lecturas en valores analíticos. Utiliza un microprocesador que automáticamente lleva a cabo los cálculos requeridos.

Cuando una celda que contiene una muestra determinada se coloca en el Quantum II, un rayo de luz pasa a través de ella y se llevan a cabo varias lecturas a dos longitudes de onda, una principal a 492 nm y otra secundaria a 600 nm. La principal está localizada en la Absorción máxima del cromóforo; la secundaria está fuera del rango cromóforo y se emplea para cancelar variaciones experimentales como imperfecciones en la celda.

El procesador de datos del Quantum II comprende dos unidades funcionales: una Microcomputadora puesta permanentemente en el instrumento y un Módulo de Memoria preprograma e intercambiable por otro. El "software" operacional para el control del instrumento y la conversión de las lecturas del espectrofotómetro en diferencias de Absorción se localiza en el instrumento Quantum II. El Módulo de Memoria es el que tiene la capacidad de efectuar la completa reducción de datos para los diferentes análisis.

b) Tubos desechables de plástico de 10 x 75 mm. La característi-

ca de estos tubos es que se usan como celdas, una para cada muestra analizada.

c) "Pentawash". Este es un instrumento pequeño que se usa para lavar cinco esferas a la vez; arroja agua a presión por unos orificios -- (uno para cada esfera) y al mismo tiempo hace vacío por otro. El pentawash se emplea conjuntamente con una bomba de vacío y una bomba de agua.

d) Charolas de reacción con 20 pozos. Estas charolas son de plástico, de 10 x 12 cm (y a manera de comparación, son parecidas a las charolas empleadas en pruebas de hemaglutinación).

e) Acido clorhídrico 1.0 N.

f) Esferas recubiertas con anticuerpos anti-CEA (cobayo) conservadas en amortiguador TRIS con azida de sodio (0.1%). Las esferas son pelotas pequeñas de plástico (poliestireno) de aproximadamente 7 mm de diáme-tro y que han sido tratadas para adsorber anticuerpos en su superficie.

g) Conjugado de anti-CEA de cabra, y peroxidasa de rábano (abre -viado como conjugado anti-CEA: peroxidasa). La concentración mínima de -anticuerpo es de 0.05 microgramos/ml en amortiguador TRIS con estabiliza-dor de proteínas y timerosal como conservador. Este conjugado es un com-puesto formado por dos entidades, un anticuerpo (anti-CEA) y una enzima - (peroxidasa), unidas por medio de un enlace covalente.

h) Control positivo con concentraciones de 10 a 20 ng de CEA (humano)/ml en suero de ternera; timerosal como conservador.

i) Patrones de CEA (humano): 0.0, 1.5, 3.0, 10.0 y 20.0 ng/ml en amortiguador de acetato, y timerosal como conservador. El CEA de estos patrones se obtiene de cultivos de una línea celular clonada de un adenocarcinoma de colon humano.

j) Amortiguador de extracción para CEA. Acetato de sodio 0.2 mol/l; timerosal como conservador.

k) Tabletas de clorhidrato de O-feniléndiamina (OPD). Las tabletas se disuelven en un amortiguador de citrato y fosfato que contiene -- 0.02% de peróxido de hidrógeno. La concentración final de OPD es de 2.56 mg/ml. Esta solución de peróxido de hidrógeno y OPD corresponde a la solución sustrato de la enzima.

2. METODO.

2.1 POBLACION Y SELECCION DE SUJETOS.

Las muestras de población fueron tomadas de personal que labora en el Hospital "Dr. Juan Graham Casassus", sito en la Ciudad de Villahermosa, capital del Estado de Tabasco.

TABLA VII. CONDICIONES CLIMATOLOGICAS DE LAS CIUDADES DE VILLAHERMOSA-Y MEXICO.

CARACTERISTICAS	VILLAHERMOSA	DISTRITO FEDERAL.
CLIMA	Caluroso húmedo con intensas lluvias en verano + -	Templado húmedo con lluvias en verano ⁺⁺
Localización	91°8'N, 18°W	19°26'N, 99°7'W
Precipitación total anual (mm)	3200	800
Humedad relativa (%)	80	60
Oscilación Media anual de temperatura (°C)	de 22 a 28	de 12 a 18
Temperatura media anual (°C)	25	15
Temperatura mínima extrema (°C)	+10	-10
Temperatura máxima extrema (°C)	45	30

+ Clima Am, según García (29).

++ Clima Cw, según García (29).

Para caracterizar el sitio que ocupa la población de Villahermosa es menester describir las condiciones climáticas, aspecto muy importante al establecer valores de referencia. En la tabla VII se resumen estas condiciones climáticas y, para darle mayor sentido, se comparan con las de la Ciudad de México, D. F.

Para la selección de sujetos se procedió como sigue: inicialmente se hizo una lista de todo el personal del Hospital, constando de 495 elementos. Esta lista se redujo posteriormente a 235, pues sólo fueron incluidas las personas que reunieron los siguientes requisitos:

- a) Ser oriundo del Estado de Tabasco y tener 4 años como mínimo de radicar en la Ciudad de Villahermosa.
- b) Tener edad entre 20 y 50 años.
- c) No ser fumador.
- d) Estar clínicamente sano. Para satisfacer este requisito bastó con constar que a la persona se le había practicado su exámen médico semestral (este exámen es obligatorio por parte del Hospital y se realiza dos veces por año), y en el momento del estudio, no padecer enfermedad alguna.
- e) No estar tomando medicamentos.

Con estos requisitos se definen dos caracteres demográficos, así como el estado de salud de las personas seleccionadas. La caracterización completa de nuestra población de estudio está dada por los requisitos señalados, así como por las condiciones climáticas descritas previamente en la tabla VII.

MUESTREO. El que se empleó fue muestreo aleatorio (simple) sin reemplazo. De la lista del personal seleccionado, numerados del 1 al 235, se ecogic-

ron las 44 personas para el estudio, con la ayuda de una tabla de números aleatorios.

2.2 OBTENCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LA MUESTRA.

2.2.1 COLECCION Y PREPARACION DE MUESTRAS.

Las cuarenta y cuatro muestras utilizadas para el análisis corresponden a personal del Hospital aparentemente sanos, no fumadores, de edades entre 20 y 50 años y, en el momento de la toma de muestras, estar en ayunas. En todos los casos fueron colectados 7.0 ml de sangre en tubos de 13 x 100 y se separó el suero. Cuando el estudio fue realizado antes de que transcurrieran 24 horas, la muestra se conservó en el refrigerador entre 2 y 8°C; en los casos en que el análisis se realizó después de un lapso mayor, a las muestras (sueros) se les dió el tratamiento con calor en amortiguador de extracción (como se describe a continuación) y el sobrenadante se congeló hasta el día del análisis, en tubos de plástico tapados con parafilm.

La extracción del CEA se realizó mezclando una parte del suero con dos partes (v/v) de amortiguador de extracción, seguida de una agitación vigorosa en vortex. La mezcla se colocó en baño de agua a $70 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos \pm 1 minuto. Después de este tiempo se separó el precipitado por medio de centrifugación a 1,200 g durante 20 min.. El sobrenadante se utilizó en la determinación.

2.2.2 SECUENCIA EN EL ANALISIS DE LAS MUESTRAS.

El análisis de las 44 muestras empleadas para el presente estudio se realizó en tres etapas:

1a. Etapa: se analizó la serie A de sueros (10 muestras), obtenidas el mismo día del ensayo. Los sobrenadantes fueron guardados en congelación.

2a. Etapa: catorce días después se volvieron a analizar los sobrenadantes de la serie A de sueros (diez), así como una nueva serie B (diez). Los sueros de esta serie B fueron colectados en un lapso de 0 a 14 días y tratados como se describió previamente. Se empleó el mismo equipo de reactivos para estas dos primeras etapas.

3a. Etapa: con un equipo nuevo de reactivos se analizó la serie C de sueros (veinticuatro), mismos que fueron colectados con 0 a 14 días de anticipación.

2.2.3 ANALISIS DE LAS MUESTRAS (INMUNOENSAYO ENZIMATICO).

2.2.3.1 FUNDAMENTO DEL METODO.

El sistema de inmunoensayo enzimático del antígeno carcinoembrionario (CEA-EIA) es un análisis de una fase sólida (esferas de plástico), basado en el principio del "emparedado". Esferas recubiertas con anti-CEA-

de cobayo son incubadas con sobrenadantes de las muestras (suero o plasma, p. ej.) tratadas con acetato de sodio y calor, así como con controles y estándares apropiados. Durante esta incubación el CEA presente en la muestra se une a la fase sólida. El material restante es removido por aspiración del fluido y lavado de las esferas. Suero de ternera anti-CEA conjugado con peroxidasa de rábano es incubado con las esferas. El conjugado no unido es removido por aspiración y las perlas son lavadas. Enseguida las perlas (esferas) son incubadas con la solución-sustrato de la enzima (peróxido de hidrógeno y orto-feniléndiamina·2HC1) para desarrollar un color el cual es una medida de la cantidad del conjugado unido a dichas esferas. La reacción enzimática es detenida por la adición de ácido clorhídrico 1N y la intensidad del color desarrollado es leída usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm. La intensidad del color formado por la reacción enzimática es proporcional a la concentración del CEA en la muestra, dentro del rango de trabajo del ensayo. Graficando la concentración de los estándares contra la Absorción (Extinción) se obtiene una curva estándar, a partir de la cual se pueden obtener las concentraciones de las muestras problema interpolando sus Extinciones (20, 65, 79).

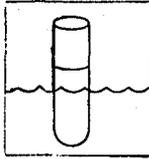
2.2.3.2 DESARROLLO TECNICO.

Para el análisis se utilizaron charolas con 20 pozos, en cada uno de los cuales se colocaron 0.2 ml de los diferentes patrones, problemas y un control, cada muestra por duplicado. Se les colocó una esfera recu -

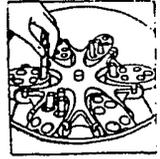
FIGURA III. INMUNOENSAYO ENZIMATICO. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO PARA CEA.

PREPARAR MUESTRAS Y AMORTIGUADOR.

INCUBAR EN BAÑO DE AGUA 15 MINUTOS A 70°C.

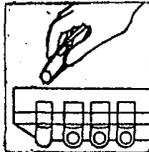


CENTRIFUGAR 10 MINUTOS A 1200 G.



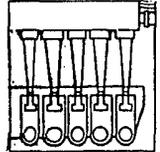
EN CADA POZO DE LAS CHAROLAS DE REACCION:

+ pipetear muestras o estándares.
+ colocar una esfera recubierta con Anti-CEA.



INCUBAR EN BAÑO DE AGUA 2 horas a 45°C.

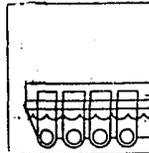
LAVAR LAS ESFERAS usando Pentawash o equivalente.



AGREGAR CONJUGADO anti-CEA: peroxidasa.

INCUBAR EN BAÑO DE AGUA 2 horas a 45°C

LAVAR LAS ESFERAS.

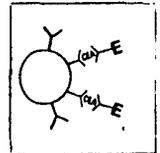


TRANSFERIR LAS ESFERAS a tubos de ensayo.



DESARROLLO DE COLOR:

+ agregar solución sustrato de OPH-H₂O₂
+ incubar 30 minutos a temperatura ambiente y al resguardo de la luz.
+ detener la reacción con HCl.
LEER EN EL QUANTUM II. Los resultados son calculados automáticamente.



bierta con anti-CEA y se incubó durante 120 minutos a una temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$; durante la incubación los pozos fueron sellados para evitar la evaporación.

Al terminar la incubación anterior se aspiró el líquido de los pozos y las esferas fueron lavadas con agua destilada. Este paso se realizó con un equipo ("pentawash") que arroja agua a presión por unos orificios y al mismo tiempo hace vacío por otros.

Una vez lavadas las esferas, se les adicionaron 0.2 ml de un conjunto de anti-CEA: peroxidasa y las muestras se incubaron nuevamente a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 120 minutos.

Cuando hubo terminada la segunda incubación, se extrajo el líquido residual y las esferas fueron lavadas nuevamente con el "pentawash".

Cada esfera se transfirió a un tubo de plástico y se le adicionó a cada una 0.3 ml de clorhidrato de O-feniléndiamina solución recién preparada, para su posterior incubación a temperatura ambiente y al resguardo de la luz durante 30 minutos.

Después de la tercera incubación se le adicionó a cada tubo 2.0 ml de ácido clorhídrico 1N y se midió la Absorción(Extinción) en el espectrofotómetro Quantum II, antes de 2 horas.

Al mismo tiempo que se analizaron las muestras problema se analizó un suero control positivo que proporciona la misma casa comercial del -- equipo de reactivos. Este análisis sirvió como parte del Control de Cali dad; la otra parte la constituyó el control que tiene el Quantum II sobre los datos obtenidos (ver enseguida).

2.2.3.3 PROCESAMIENTO DE DATOS.

El procesado de datos lo realiza integralmente la memoria del aparato Quantum II. De esta forma y siguiendo el protocolo de trabajo (figura IV, pág. 71) se obtienen las Absorciones (Extinciones) y los parámetros -- siguientes: 1) curva estándar ajustada por regresión lineal; 2) obten -- ción de las concentraciones de CEA por interpolación de las absorciones -- de nuestros problemas en la curva estándar; 3) delta de Absorción (ΔA) a las dos longitudes de onda que "lee" el Quantum II, 492 y 600 nanóme -- tros; y 4) coeficiente de variación.

Para que los datos anteriores los imprima el aparato, nuestro ensa yo debe cumplir con el protocolo de trabajo, y la curva estándar tener -- una linealidad aceptable.

2.3 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS.

Los valores de concentración de CEA son tratados mediante la prue -- ba "t" de Students, asumiendo que dichos valores presentan una distribu -- ción nomal o casi normal. El nivel de confianza para dicho intérvalo es del 95%.

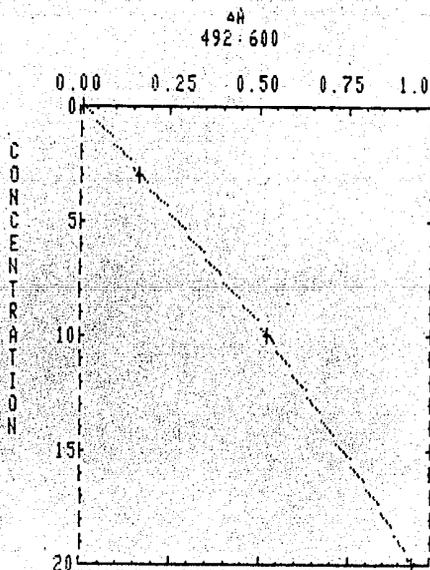
FIGURA IV. PROTOCOLO DE TRABAJO PARA LA DETERMINACION DE CEA POR EIA.*

MODE 1.1 CEA-EIA PROTOCGL		SAMP NO.	WA 492:600	CONC HG/HL
		BLANK	0.00	
INSTRUMENT PARAMETERS		1	STD#1	0.013
1:	UNITS = 1	2	STD#1	0.013
2:	FILTERS = 492:600	3	STD#2	0.166
3:	PATH LENGTH = 1.11	4	STD#2	0.167
STANDARDS		5	STD#3	0.526
4:	NUMBER = 4	6	STD#3	0.525
5:	REPLICATIONS = 2	7	STD#4	0.947
		8	STD#4	0.945
STANDARD CONCENTRATIONS				
6:	STD 1 = 0.00			
7:	STD 2 = 3.00			
8:	STD 3 = 10.00			
9:	STD 4 = 20.00			

MEAN ABSORBANCE
16: STD # = 4
17: MINIMUM = 0.800
18: MAXIMUM = 2.000

CONTROLS
27: NUMBER = 1
28: REPLICATIONS = 2
29: DILUTION FACTOR = 3.0

UNKNOWN
37: REPLICATIONS = 2
38: DILUTION FACTOR = 3.0



* Los casos del 1 al 38 son requisitos que hay que cumplir al efectuar el análisis. En la segunda columna se muestran las lecturas de los estándares (obtenidas en uno de los análisis), y la respectiva curva estándar.

CAPÍTULO V. RESULTADOS.

1. CONCENTRACIONES OBTENIDAS DE CEA.

En la tabla VIII se presentan todos los datos de concentraciones - de CEA, así como dos de los caracteres demográficos de nuestra muestra de población, la edad y el sexo. En la última columna de la tabla se ha incluido un análisis estadístico, el coeficiente de variación, mismo que se rá tratado más adelante (punto 3); su inclusión en esta tabla obedece tan solo a fines prácticos.

Para el cálculo del intervalo de referencia se trabajó solamente - con 41 de los 44 datos, esto es, se eliminaron 3 datos. Uno de éstos corresponde a un valor muy elevado (muestra No. 4) y los otros sencillamente corresponden a los valores más bajo y más alto de los 43 datos restantes- (muestras No. 18 y 33).

En la tabla IX se presentan los datos ordenados de acuerdo a la frecuencia con que se presentan en cada uno de los seis intervalos de mag nitud de 1 ng/ml cada uno.

2. SENSIBILIDAD.

En la figura IV (pág. 71) se muestra el protocolo de trabajo para

TABLA VII. CONCENTRACION DE CEA OBTENIDA
Y VARIACION INTRAENSAYO.

NUMERO DE MUESTRA	EDAD (AÑOS)	SEXO*	CONC. DE CEA (ng/ml) EN ANALISIS POR DUPLICADO		CEA PROMEDIO (ng/ml.)	VARIACION INTRAENSAYO (% CV)
			ANALISIS 1	ANALISIS 2		
1	28	F	1.38	1.30	1.34	4.22
2	25	F	3.33	3.77	3.55	8.76
3	25	M	4.41	4.91	4.66	7.59
4	26	F	9.78	9.10	9.44	5.09
5	41	F	0.81	0.87	0.84	5.05
6	27	M	1.87	1.83	1.85	1.53
7	25	F	1.29	1.31	1.30	1.09
8	25	M	1.54	1.52	1.53	0.92
9	30	M	0.14	0.16	0.15	9.43
10	22	M	1.84	1.86	1.85	0.76
11	47	F	1.63	1.71	1.67	3.39
12	23	F	0.89	0.87	0.88	1.61
13	34	F	1.03	1.19	1.11	10.19
14	44	F	1.74	1.68	1.71	2.48
15	26	M	0.59	0.63	0.61	4.64
16	40	M	4.10	4.76	4.43	10.54
17	38	F	2.19	1.97	2.08	7.50
18	35	F	6.08	5.80	5.94	3.33
19	24	F	0.90	0.96	0.93	4.42
20	28	F	5.88	6.00	5.94	1.43
21	25	F	1.50	1.42	1.46	3.87
22	25	M	3.49	3.37	3.43	3.47
23	25	F	0.78	0.69	0.73	8.84
24	29	F	0.32	0.32	0.32	0.00
25	23	M	2.60	2.70	2.65	2.44

(continúa).

TABLA VIII. CONCENTRACION DE CEA OBTENIDA
(Conclusión) Y VARIACION INTRAENSAYO.

NUMERO DE MUESTRA	EDAD (AÑOS)	SEXO ⁺	CONC. DE CEA (ng/ml) EN ANALISIS POR DUPLICADO		CEA PROMEDIO (ng/ml)	VARIACION INTRAENSAYO (% CV)
			ANALISIS 1	ANALISIS 2		
26	44	M	2.15	2.06	2.10	3.07
27	30	F	1.51	1.78	1.64	11.79
28	45	F	0.00	0.00	0.00	0.00
29	45	F	1,32	1.42	1.37	4.71
30	21	F	0.32	0.23	0.27	23.57
31	40	M	0.59	0.50	0.55	11.79
32	27	F	0.87	0.96	0.91	7.07
33	37	F	0.00	0.00	0.00	0.00
34	25	M	4.61	4.61	4.61	0.00
35	49	M	0.78	0.69	0.73	8.84
36	25	M	0.50	0.78	0.64	30.30
37	26	M	1.14	1.14	1.14	0.00
38	26	M	2.42	2.33	2.38	2.72
39	21	F	0.50	0.59	0.55	11.79
40	28	F	1.23	2.42	1.83	45.96
41	28	F	1.78	1.78	1.78	0.00
42	28	F	5.35	5.35	5.35	0.00
43	36	F	2.15	2.06	2.10	3.07
44	36	F	0.87	0.96	0.91	7.07

+ M = masculino; F = femenino

Edad promedio = 30.8 años.

% CV promedio = 6.5 %

TABLA IX. DISTRIBUCION DE LAS CONCENTRACIONES DE CEA
EN UNA POBLACION APARENTEMENTE SANA.

INTERVALO (ng/ml)	FRECUENCIA	FRECUENCIA RELATIVA (%)	CONCENTRACION DE CEA OBTENIDA (ng/ml)
0 - 1	15	36.1	0.00, 0.15, 0.27, 0.32, 0.55, 0.55, 0.61, 0.64, 0.73, 0.73, 0.84, 0.88, 0.91, 0.91, 0.93
1 - 2	14	34.1	1.11, 1.14, 1.30, 1.34, 1.37, 1.46, 1.53, 1.64, 1.67, 1.71, 1.78, 1.83, 1.85, 1.85.
2 - 3	5	12.2	2.08, 2.10, 2.10, 2.38, 2.65
3 - 4	2	4.9	3.43, 3.55
4 - 5	3	7.3	4.43, 4.61, 4.66
5 - 6	2	4.9	5.35, 5.94
TOTAL	41	100.0	

Promedio = 1.80 ng/ml; Desviación estándar = 1.45 ng/ml

la determinación de CEA por el método Inmunoensayo Enzimático (EIA), así como una curva estándar típica. La sensibilidad del ensayo, definida como la mínima concentración detectable que puede distinguirse del estándar cero es de 0.15 ng/ml; la concentración máxima aceptada por el Quantum II es de 60 ng/ml. Es necesario indicar que en realidad se detectan valores menores ya que las muestras están diluidas 1:3 durante el proceso de extracción.

3. REPRODUCIBILIDAD.

La reproducibilidad del ensayo está medida en función de las variaciones intra- e interensayo. Estas variaciones son expresadas como coefi

TABLA X. VARIACION INTERENSAYO
EN EL ANALISIS DEL CEA

NUMERO DE MUESTRA	PRIMER ANALISIS (ng/ml).	SEGUNDO ANALISIS ⁺ (ng/ml).	VARIACION INTERENSAYO (% CV) ⁺⁺
1	1.31	1.34	1.60
2	3.64	3.55	1.77
3	4.37	4.66	4.54
4	9.46	9.44	0.15
5	0.80	0.84	3.55
6	1.86	1.85	0.38
7	1.40	1.30	5.24
8	1.58	1.53	2.28
9	0.16	0.15	4.56

+ El segundo análisis se efectuó 14 días después del primero; las muestras son las mismas.

++ % CV promedio = 2.6

cientes de variación (CV) y se muestran en las últimas columnas de las tablas VIII (CV intraensayo) y en la X (CV interensayo).

En este estudio los coeficientes de variación fueron computados por el Quantum II ($CV = \frac{S}{\bar{X}}$), obteniéndose los siguientes resultados: CV intraensayo = 6.5 % (valor promedio obtenido de los datos de la tabla VIII). Al comparar los resultados obtenidos en determinaciones realizadas con catorce días de diferencia con las mismas primeras diez muestras (tabla X), el CV interensayo = 2.6% (valor promedio).

4. RETENCION DE ACTIVIDAD DE CEA EN EXTRACTOS DE SUEROS.

En la tabla X se describen los valores obtenidos para las mismas muestras en determinaciones realizadas con catorce días de diferencia.

La muestra con CV mayor es la No. 7, cuya diferencia en concentración de CEA es 0.1 ng/ml, de tal manera que la variación durante el tiempo es

$$\frac{0.1}{1.4} \times 100 = 7.1\%/14 \text{ días, o bien, } 0.51\%/día$$

Como se puede observar, 0.51% de CEA es la variación (disminución) máxima obtenida por cada día de almacenamiento del extracto de suero.

5. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS.

Antes de empezar la exposición estadística y para hacerla más - -

transparente, deberá notarse que el orden a seguir es el presentado en el punto 4.2 del capítulo de generalidades, esto es: (a) tener los datos necesarios para poder efectuar las gráficas como en la figura II; (b) graficar las tres diferentes curvas y analizar su distribución; (c) calcular el intervalo de confianza y las respectivas medidas de dispersión necesarias para tal fin.

Como se verá más adelante en las gráficas, los valores de concentración de CEA de nuestra muestra de población no tienen una distribución normal (Gaussiana). Ante esto, se efectuaron una serie de transformaciones de datos, $1/X$, $\log(X + C)$ y \sqrt{X} , donde X es igual a la concentración de CEA. Sólo los datos transformados mediante el logaritmo y raíz cuadrada se apegaron adecuadamente al modelo Gaussiano, como se observa en las figuras V, VI y VII. Se escogió solamente la transformación logarítmica-pues es la más apegada a la distribución normal. De aquí en adelante nos referiremos a dicha distribución como "log-normal".

En la tabla XI se presentan los datos de concentración de CEA y -- los datos transformados, así como las frecuencias. Estos elementos son -- los empleados para elaborar las gráficas VI y VII. Para las gráficas V-A y V-B se emplean los datos de las tablas IX y XII, respectivamente.

La tabla XII contiene los elementos necesarios para elaborar una -- nueva gráfica de distribución de frecuencias. Se construyeron seis intérvalos, al igual que como se hizo con los valores originales, partiendo de los datos de la tabla XI.

TABLA XI. DISTRIBUCION DE LAS FRACCIONES ACUMULATIVAS DE DATOS DE CEA Y DATOS LOG-TRANSFORMADOS. +

CONCENTRACION DE CEA (ng/ml) ⁺⁺	FRECUENCIA	FRECUENCIA ACUMULATIVA	FRACCION DE LA FRECUENCIA ACUMULATIVA	DATOS TRANSFORMADOS $\log(x + C)$ ⁺⁺⁺
0.00	1	1	0.024	0.04
0.15	1	2	0.049	0.10
0.27	1	3	0.073	0.14
0.32	1	4	0.098	0.15
0.55	2	6	0.146	0.22
0.61	1	7	0.171	0.23
0.64	1	8	0.195	0.24
0.73	2	10	0.244	0.26
0.84	1	11	0.268	0.29
0.88	1	12	0.293	0.30
0.91	2	14	0.341	0.30
0.93	1	15	0.366	0.31
1.11	1	16	0.390	0.34
1.14	1	17	0.415	0.35
1.30	1	18	0.439	0.38
1.34	1	19	0.463	0.39
1.37	1	20	0.488	0.39
1.46	1	21	0.512	0.41
1.53	1	22	0.537	0.42
1.64	1	23	0.561	0.44
1.67	1	24	0.585	0.44
1.71	1	25	0.610	0.45
1.78	1	26	0.634	0.46
1.83	1	27	0.658	0.47
1.85	2	29	0.707	0.47
2.08	1	30	0.732	0.50
2.10	2	32	0.780	0.51
2.38	1	33	0.805	0.54

(continúa)

TABLA XI. DISTRIBUCION DE LAS FRACCIONES ACUMULATIVAS
(conclusión) DE DATOS DE CEA Y DATOS LOG-TRANSFORMADOS+

CONCENTRACION DE CEA (ng/ml) ⁺⁺	FRECUENCIA	FRECUENCIA ACUMULATIVA.	FRACCION DE LA FRECUENCIA ACUMULATIVA	DATOS TRANSFORMADOS log (x + C) ⁺⁺⁺
2.65	1	34	0.829	0.57
3.43	1	35	0.854	0.66
3.55	1	36	0.878	0.67
4.43	1	37	0.902	0.74
4.61	1	38	0.927	0.76
4.66	1	39	0.951	0.76
5.35	1	40	0.975	0.81
5.94	1	41	1.000	0.85

+ X = concentración de CEA en ng/ml; C = constante = 1.1

++ Promedio de los valores de x = 1.80; desviación estándar, s = 1.45

+++ Promedio de los valores log (x + 1.1) = 0.42; desviación estándar,
s = 0.20

La constante C = 1.1 equivale aproximadamente al valor mínimo utilizable para obtener un dato positivo después de la transformación.

TABLA XII. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE
VALORES DE CEA LOG-TRANSFORMADOS

INTERVALO+	FRECUENCIA	FRECUENCIA RELATIVA (%)
0.00 - 0.15	4	9.76
0.15 - 0.30	10	24.39
0.30 - 0.45	11	26.83
0.45 - 0.60	9	21.54
0.60 - 0.75	3	7.34
0.75 - 0.90	4	9.76

+ Intervalos elaborados a partir de los datos de la tabla XI.

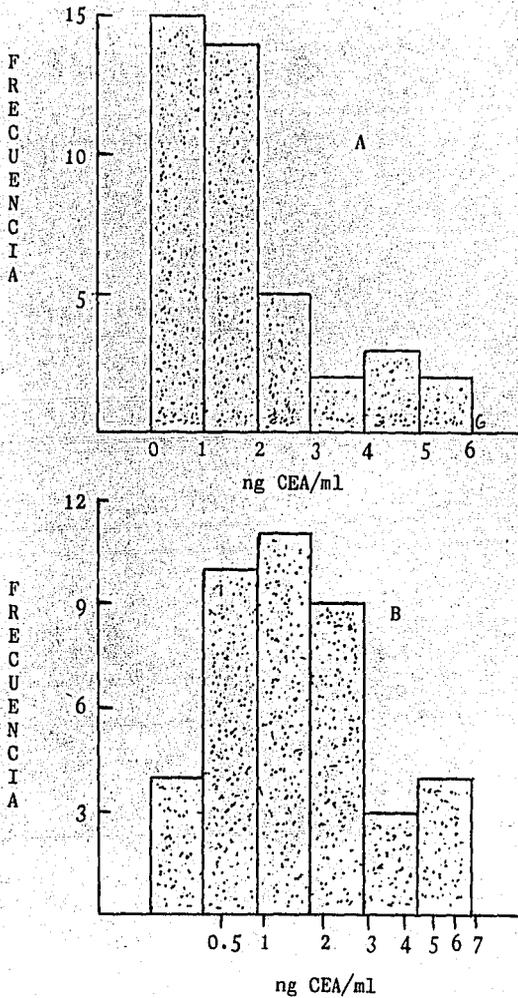


FIGURA V. Esta figura representa los datos de las tablas IX y XII. Las gráficas A y B muestran la distribución de frecuencias (esto es, el número de personas que tienen el valor establecido) de los 41 valores de CEA. En la abscisa de la segunda curva (B) se tienen los valores de CEA log-transformados. Nótese como (A) se desvía considerablemente del modelo Gaussiano, en tanto que (B) está muy próxima a dicho modelo.

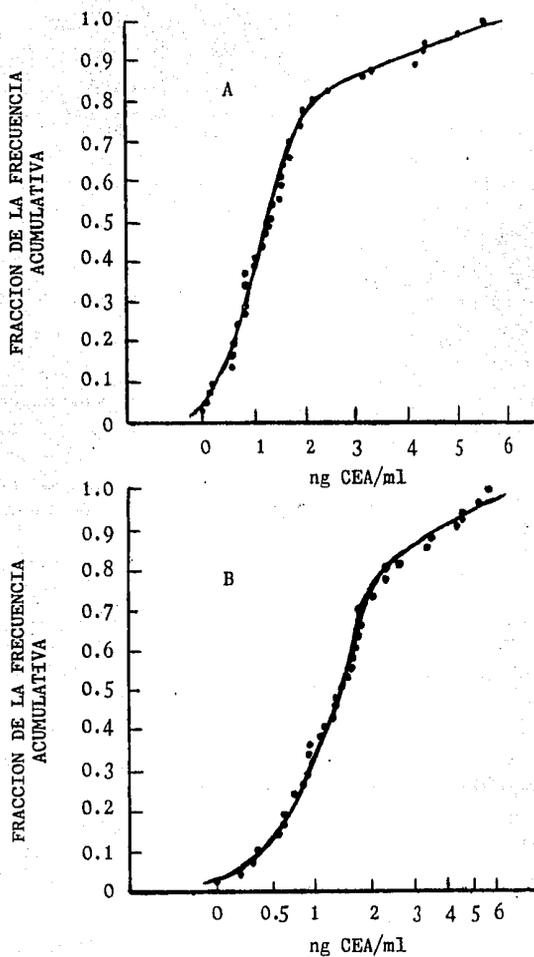


FIGURA VI. Esta figura representa los resultados mostrados en la tabla - IX. Ambas curvas muestran la correspondiente distribución de la fracción de la frecuencia acumulativa. En la abscisa de la segunda curva (B) se tienen los valores de CEA log-transformados. Nótese como (B) está muy próxima al modelo Gaussia no (comparar con figura II).

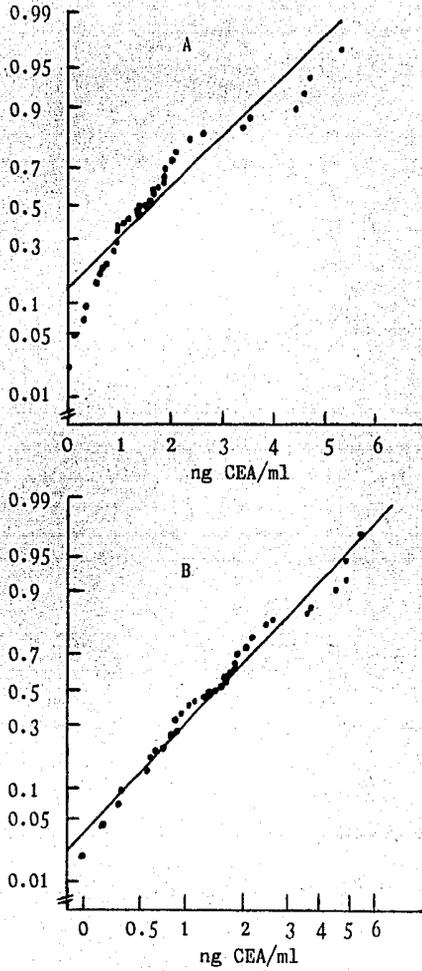


FIGURA VII. En papel gráfico de probabilidad se describe la distribución de la fracción de la frecuencia acumulativa de -- valores. La línea recta describe la distribución de -- probabilidad acumulativa (Gaussiana). En la abscisa de la curva (B) se tienen los valores de CEA log-transformados. Note como en (A) muchos de los valores se desvían de la distribución normal, en tanto que en (B) la distribución es prácticamente normal.

5.1 COEFICIENTE DE CORRELACION.

El coeficiente de correlación r nos da una medida del grado en que cada punto (x, y) de una gráfica cae exactamente en una línea recta. Cuando el coeficiente es de 1.0 significa que todos los puntos en la gráfica caen exactamente en ella. La relación para calcular r es

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

Para la curva de la figura VII-A el coeficiente de correlación r es igual a

$$r = \frac{(35)(1772.14) - (61.8)(1798.6)}{\sqrt{[(35)(172.7) - (61.8)^2][(35)(98802.99) - (1798.6)^2]}}$$

$$r = 0.9366$$

y para la curva de la figura VII-B es

$$r = \frac{(35)(834.67) - (14.51)(1798.6)}{\sqrt{[(35)(7.28) - (14.51)^2][(35)(98802.99) - (1798.6)^2]}}$$

$$r = 0.9914$$

5.2 DESVIACION ESTANDAR.

La desviación estándar para una muestra de población está definida como

$$S = \sqrt{\left(\frac{1}{n-1}\right) \left(x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right)}$$

Para los valores de concentración de CEA (tabla XI), S es igual a

$$S = \sqrt{\left(\frac{1}{41-1}\right) \left(217.48 - \frac{(73.88)^2}{41}\right)}$$

S = 1.452 , con promedio $\bar{x} = 1.802$

y para los valores de CEA log-transformados, S igual a

$$S = \sqrt{\left(\frac{1}{41-1}\right) \left(8.69 - \frac{(17.12)^2}{41}\right)}$$

S = 0.197 , con promedio $\bar{x} = 0.418$

5.3 INTERVALO DE REFERENCIA.

Teniendo como antecedentes los resultados previos, el intervalo de confianza es el calculado a partir de los datos log-transformados y mediante una distribución t. La relación para este cálculo es $\bar{x} \pm ts$, donde t es la puntuación de la distribución t correspondiente. Para un nivel de confianza del 95% y $n = 41$, $t = 2.0211$. El intervalo calculado es:

$$0.42 \pm (2.0211)(0.197)$$

$$0.42 \pm 0.398$$

Pasando estos datos log-transformados a las unidades originales, el intervalo queda así:

$$\text{de } 0 \text{ a } 5.48 \text{ ng/ml}$$

Por último, en la tabla XIII se presentan los parámetros estadísticos finales que resultaron de nuestro estudio.

TABLA XIII. ESTUDIO DE LOS VALORES DE REFERENCIA PARA CEA EN UNA POBLACION APARENTEMENTE SANA.

Número de muestras	41
Promedio (ng/ml)	1.53
Desviación estándar (ng/ml)	1.95
Valores de referencia (ng/ml)	0 a 5.5
CV intraensayo (%)	6.5
CV interensayo (%)	2.6

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.

El CEA es el marcador más ampliamente usado, pues se ha comprobado su utilidad. Sin embargo, muchas de las veces el análisis del CEA es solicitado inapropiadamente: en casos donde es de poca utilidad su determinación (detección de cáncer), en situaciones donde no se da una buena concordancia CEA-enfermedad (sobre todo en tumores diferentes de los del tracto GI, genitourinario y respiratorio). Además, en el transcurso de un proceso canceroso a menudo ya no se solicita este análisis. Evidentemente este último hecho está tan equivocado como el de considerar el estudio del CEA como prueba de escrutinio para detectar cáncer: como ya se detectó cáncer en el enfermo, se piensa (erróneamente) que ya no es necesaria la determinación del CEA.

Una vez hechas las consideraciones anteriores, es necesario señalar los casos en los que la determinación del CEA es muy útil: en detección de la recurrencia (reincidencia) y progresión del tumor, y en la respuesta a la terapia. En cuanto al primer, caso existen muchísimas evidencias que nos indican que aquéllos pueden ser detectados aún antes de que se manifiesten clínicamente; de aquí el valor del análisis del CEA. Para que las variaciones en el nivel del CEA puedan valorarse objetivamente, es necesario analizar la pendiente de la curva que resulta de graficar --

concentración de CEA vs. tiempo de tratamiento del adenocarcinoma (ver texto y figura II). El análisis de esta curva es también de gran utilidad para evaluar la respuesta a la terapia, pues como hemos visto, la terapia puede ser cambiada o ser más agresiva dependiendo de la concentración de CEA encontrada, pues este marcador tumoral nos puede dar bastante información acerca del tumor: si disminuye o aumenta su masa, si se está diseminando (metástasis), o si hay recurrencia aun después de una resección. Ciertamente, esta clase de datos a veces no son claros, pero en la mayoría de los casos las variaciones en la concentración de CEA, acompañadas de resultados de otros estudios, tienden a darnos dicha información.

De lo anterior y de lo expuesto previamente en otro capítulo se desprende lo siguiente, con respecto a la evaluación del estado tumoral: (a) el análisis del CEA es muy útil en muchos casos, y lo es tanto (y a veces superior) al mayor de los otros métodos; (b) los costos de monitoreo del CEA son baratos comparativamente, o bien tan caros como los de los métodos más baratos. Es por estas razones que definitivamente ha de tomarse muy seriamente el manejo de este marcador tumoral, para lo cual los investigadores consideran necesario realizar un protocolo de trabajo para cada paciente, mismo que incluirá análisis seriados de CEA (tantos como necesarios, aun cuando fuera por años) y análisis de la curva que resulta de graficar concentración de CEA vs. tiempo. Cada variable del protocolo dependerá del estado del paciente, naturaleza y estadio del tumor.

En cuanto a resultados prácticos se refiere, el primer punto a tratar es, indiscutiblemente, el tipo de distribución de los datos obtenidos; es algo primordial pues de aquélla depende el intervalo de referencia.

Las curvas (B) de las figuras V, VI y VII nos muestran que existe una distribución normal (Gaussiana) o casi normal cuando transformamos -- los datos mediante la relación $\log(x + C)$. Esta normalidad se aprecia -- más claramente en las figuras V-B y VII-B. La primera de ellas es el tipo de distribución más ampliamente usado; es un histograma en el que se -- aprecia un sesgo ligeramente positivo, pero que definitivamente puede en -- cuadrarse como una distribución normal. En el histograma realizado con -- los datos originales se observa claramente que la curva V-A tiene una dis -- tribución no-normal, pues tiene un sesgo bastante positivo (curva desvia -- da hacia la derecha). Con respecto a la curva VIII-B, ésta es práctica -- mente una recta: el coeficiente de correlación r es de 0.991. Este es -- el otro punto por el que puede afirmarse que los datos log-transformados -- tienen una distribución normal (o casi normal), por lo que dichos datos -- pueden emplearse para calcular el intervalo de referencia por medio de mé -- todos paramétricos (Gaussianos). Seguramente, si n fuera mucho más gran -- de, la distribución sería normal, aunque este es un punto a tratar en -- otra investigación.

El método empleado para calcular el intervalo de referencia es por medio de una distribución t , pues en nuestro caso existe una distribución normal o casi normal y n es pequeña.

Una vez que se confirmó la normalidad de los datos log-transformados, el intervalo de confianza del 95% comprende de 0.0 hasta 5.5 ng CEA /ml. Este es un intervalo con rango acorde a otros reportados previamente, como se puede apreciar en la tabla XIV.

Otro de los puntos a tratar en este trabajo es evaluar el inmunoensayo enzimático empleado. Demostramos la utilidad de este equipo, CEA-EIA, como una prueba que reúne las características adecuadas para ser utilizado con confianza.

A diferencia de otros métodos, el protocolo de trabajo seguido correctamente, permite obtener los resultados sin necesidad de cálculos -- adicionales. Aun cuando se tiene la desventaja de que el espectrofotómetro utilizado (Quantum II), al computar las Absorciones (Extinciones) de estándares y muestras podría rechazar el estudio cuando no se cumplen los requisitos de calidad adecuados, un desarrollo de la prueba, limpio, así como material en buenas condiciones, conduce a un éxito seguro.

Fué necesario valorar algunos parámetros adicionales que indicaran reproducibilidad en las condiciones de trabajo disponibles en el sitio de desarrollo del estudio: debido a que la determinación del CEA no es un -- estudio que se realiza con frecuencia, es necesario almacenar las mues -- tras durante varios días, por lo cual es necesario demostrar que no se altera el valor de CEA con el tiempo. El estudio comparativo de 10 muestras

TABLA XIV. VALORES DE REFERENCIA PARA CEA
EN DIFERENTES POBLACIONES.

REFE- REN- CIA	POBLACION	NUMERO DE MUESTRAS	CEA PROMEDIO (ng/ml)	VALORES DE RE- FERENCIA. (ng/ml)
49	Nancy, Francia	1020	1.53	0 a 3.8
62	Nancy, Francia	1020	1.26	0 a 4.1
25	N.Y., EUA	53	2.50	0 a 4.6
		222 ⁺	1.94	0 a 5.0
74	México, D. F.	96 ⁺	8.06	0 a 12.0 ⁺⁺⁺
--	Villahermosa, Tab. ⁺⁺	41	1.53	0 a 5.5

+ Muestras analizadas por RIA^o todas las demás por EIA.

++ La población incluye sólo no-fumadores; las demás incluyen fuma-
dores y no-fumadores.

+++ En el momento de obtener los datos aún no se terminaba por com-
pleto el análisis de los mismos, por lo que este intervalo no -
es definitivo, pero sí muy aproximado.

(tabla X) indica que no existe una variación considerable, ya que tan so-
lo existe una variación de 0.51%/día de almacenamiento, resultado acorde-
a lo encontrado por Maiolini y col. (62).

La reproducibilidad (o precisión) del ensayo es buena. Está medi-
da como CV, siendo 6.5% y 2.6% los CV intra- e interensayo, respectivamen-
te. Estos resultados son más que aceptable y lo que se quiere decir con
ellos es que si se analiza una muestra dos o más veces (el mismo día o --
unos días después) los resultados serán parecidos.

Otro de los parámetros obtenidos es la sensibilidad. Esta es dependiente del equipo utilizado para el procesamiento de datos. Otros autores han reportado sensibilidades hasta de 0.1 ng/ml (25, 62); en nuestro caso, el Quantum II "reporta" una sensibilidad de 0.15 ng/ml, que para fines de diagnóstico es adecuado.

La limitación básica de este estudio es evidente: se trabajó con pocas muestras. Sin embargo, los resultados obtenidos son parecidos a los reportados previamente por otros investigadores.

Como se aprecia en el título de esta tesis, la investigación realizada ha de servir como una introducción al estudio del CEA: aquí se establecieron los valores de referencia para CEA, pero sólo para una población aparentemente sana, no-fumadora. Estudios posteriores deberán incluir a la población fumadora y aún más, la correlación existente entre CEA y diversos tumores, sobre todo en los del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. Estos son sólo algunos ejemplos de lo que puede estudiarse, enfocando todo, desde luego, a estudiar (y mediatamente eliminar) el cáncer.

Ya para finalizar y refiriéndonos al método de análisis del CEA, las perspectivas para mejorarlo son buenas. Es posible que la especificidad del análisis pudiera ser mayor mediante el uso de anticuerpos monoclonales⁺ contra subpoblaciones de CEA, pues éstas aparentemente existen (6,

+ Desde fines del año pasado está disponible en el mercado nacional el equipo CEA-MEIA, el cual dispone de anticuerpos monoclonales. No se empleó este equipo pues ya se había iniciado el estudio con el equipo convencional CEA-EIA, el cual emplea anticuerpos policlonales.

8, 11). Otro posible mejoramiento consistiría en el desarrollo del inmu-noensayo enzimático con dos anticuerpos monoclonales, como lo propone Buchegger y col. (8).

En adición a lo mencionado anteriormente, el equipo CEA-EIA tiene las siguientes ventajas: (a) fácil y flexible en su uso. Cada ensayo necesita sólo el mínimo de manejo; en particular, los pasos de lavado semi-automatizados permiten realizar decenas de pruebas en un día. Sin embargo, uno debe poner mucha atención para evitar errores en identificar las muestras cuando éstas se transfieren a las esferas de piliestireno. También es muy importante sellar las charolas de reacción para evitar evaporación, especialmente del conjugado, la cual pudiera iniciar una absorción inespecífica en las superficies de las esferas y subsecuentemente incrementar las lecturas; (b) Rapidez. La prueba completa puede ser realizada en seis horas.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN.

Cualquier interpretación sobre la validez de la determinación del CEA debe hacerse, en primer lugar, entendiendo el contexto en que se da este análisis: el CEA es un marcador tumoral, es más empleado, pero hay otros más; hay pruebas que son realizadas fuera del laboratorio clínico - que también son empleadas en el estudio del cáncer. Una buena evaluación del paciente será llevada a cabo cuando sean estudiadas en su conjunto to dos los resultados de las diferentes pruebas, así como de la evaluación clínica.

En el diagnóstico del cáncer el uso del CEA es limitado, por lo que no debe emplearse como prueba de escrutinio para tal fin; sin embargo, la determinación del CEA resulta muy útil durante el tratamiento de la enfermedad: el CEA nos da mucha información acerca del comportamiento del tumor y del estadio tumoral.

Hay escepticismo en algunos investigadores sobre la importancia de la determinación del CEA; escepticismo que está en función de contar con un análisis que realmente evalúe por sí solo un estado tumoral. Sin embargo, cabe preguntarse ¿qué análisis de laboratorio o fuera de él tiene tal característica? La respuesta es directa: ninguna. Por esta razón y

en base a lo descrito a lo largo de esta tesis, en antígeno carcinoembriónico constituye una excelente aportación al conjunto total de análisis -- efectuados en personas que padecen cáncer, e incluso hay algunos casos en que la sola determinación del CEA pudiera hacer variar la terapia o efectuar una cirugía.

El haber establecido el valor de referencia para el CEA en la población estudiada ha de permitir una mejor interpretación de las variaciones de los niveles del CEA que pudieran presentarse en las personas con cáncer.

Por último, se ha demostrado que el Inmunoensayo Enzimático que se empleó en la presente tesis reúne las características necesarias que lo califican como un muy buen método de análisis.

CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abeyaunis CJ, Wilhelm SA, Rittenhouse KW, Milgrom F. Is Carcinoembryonic Antigen an Autoantigen? *Transplant. Proc.*, 16/2: 489, 1984.
2. Abuharfeil N, Grunert F, von Kleist S. Non-Specific Crossreacting Antigen (NCA) does not Contain Methionine. *Tumor Biol.*, 5/6: 339,-1984.
3. Bermes EW, Erviti V, and Forman DT. Statistics, Normal Values and Quality Control. En (Tietz NW, editor): *Fundamentals of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Co., 2nd edition: 60, 1976.
4. Bishop JM. Oncogenes. *Scientific American*, 246/3: 57, 1982.
5. Blaszczyk M, Koon YP, Herlyn M, et al. Characterization of Gastrointestinal Tumor-Associated Carcinoembryonic Antigen Related Antigens Defined by Monoclonal Antibodies. *Cancer Res.*, 44/1: 245, 1984
6. Bosslet K, Luben G, Schwarz A, Hundt E, et al. Immunohistochemical-Localization and Molecular Characteristics of Three Monoclonal Antibody-Defined Epitopes Detectable on Carcinoembryonic Antigen (CEA). *Int. J. Cancer*, 36/1: 75, 1985.

7. Bretscher MS. The Molecules of the Cell Membrane. Scientific American, 253/4: 86, 1985.
8. Buchegger F, Mai P, Rivier D, Carrel S, Accolla R, et al. Monoclonal Antibodies Against Carcinoembryonic Antigen (CEA) Used in a Solid-Phase Enzyme Immunoassay. First Clinical Results. J. of Immunological Methods, 49: 129, 1982.
9. Buncher CP, Weiner D. Reference Values. En (Kaplan SD, editor): Clinical Chemistry, Theory, Analysis and Correlation. C.V. Mosby Co.: 301, 1984.
10. Busnardo B, Girelli ME, Simioni N, et al. Nonparallel Patterns of Calcitonin and Carcinoembryonic Antigen Levels in the Follow-up of Medullary Thyroid Carcinoma. Cancer, 53/2: 278, 1984.
11. Byrn RA, Medrek P, Thomas P, Jeanios RW, Zamcheck N, Effect of Heterogeneity of Carcinoembryonic Antigen on Liver Cell Membrane Binding and its Kinetics of Removal From Circulation. Cancer Res., 45/7: 3137, 1985.
12. Chu TM and Reynoso G. Evaluation of a New Radioimmunoassay Method for Carcinoembryonic Antigen in Plasma With Use of Zirconil-Phosphate Gel. Clin. Chem., 18/918, 1972.

13. Coffey JW, Vandevoorde JP, Savenzopf ER, and Hansen HJ. Use of Zirconyl Phosphate Gel for the Separation of Antigens from Antigen-Antibody Complexes in Radioimmunoassays: Assays for Carcinoembryonic Antigen, -Fetoprotein, and Insulin. *Methods in Enzymology*, 70:229,-1980.
14. Concannon JP, Dalbow MH, Hodgson SE, Headings JJ, et al. Prognostic Value of Preoperative Carcinoembryonic Antigen (CEA) Plasma Levels in Patients With Bronchogenic Carcinoma. *Cancer*, 42: 1477, 1978.
15. Cotlove E, Harris E, and Williams GZ. Biological and Analytical Components of Variation in Long Term Studies of Serum Constituents in Normal Subjects. III: Physiological and Medical Implications. *Clin. Chem.*, 16/12: 1028, 1970.
16. Croce CM, Klein G. Chromosome Translocations and Human Cancer. *Scientific American*, 252/3: 54, 1985.
17. Daniel WW. *Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud.* Editorial Limusa, México, 2a. reimpresión: 32, 1980.
18. Drewinko B, and Ying YL. Observations on the Synthesis of Carcinoembryonic Antigen by an Established Human Colonic Carcinoma Cell Line. *Oncology*, 37: 336, 1980.
19. Dykes PW, and Bradwell AR. Carcinoembryonic Antigen Radioimmuno-detection. *Gastroenterology*, 84/3: 651, 1983.

20. Engvall E. Enzyme Immunoassay. ELISA and EMIT. *Methods in Enzymology*, 70: 419, 1980.
21. Faravelli B, Amore E, Nosenzo M, et al. Carcinoembryonic Antigen - in Pleural Effusions. Diagnostic Value in Malignant Mesothelioma. - *Cancer*, 53/5: 1194, 1984.
22. Fass L, Herberman RB, and Ziegler J. Delayed Cutaneous Hypersensitivity Reactions to Autologous Burkitt Lymphoma Cells. *N. Engl. J.M.*, - 282: 776, 1970.
23. Fidler IJ, and White RJ editors. *Design of Models for Testing Cancer Therapeutic Agents*. Van Nostrand R. Co., USA: 51, 1982.
24. Flanagan D, Hayes BP, Morrison P, editors. *Oncogenes in vivo*. *Scientific American*, 250/2: 53, 1984.
25. Fleisher M, Nisselbaum JS, Loftin L, et al. Roche RIA and Abbott EIA Carcinoembryonic Antigen Assay Compared. *Clin Chem*, 30/2: 200, 1984
26. Forrester PI and Hancock RL Theoretical Mechanisms for Synthesis of - Carcinogen-Induced Embryonic Proteins: Alpha-Fetoproteina Induction bu Ethionin. *Medical Hypotheses*, 4: 31, 1978.
27. Fritsche HA. Tumor Marker Test in Patients Monitoring. *Laboratory - Medicine*, 13/9: 528, 1982.

28. Galen RS. The Normal Range. Arch. Pathol. Lab. Med., 101: 561, 1977.
29. García E. Modificaciones al Sistema de Clasificación de Keoppen. - Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, 2a. Edición: 45, 1973.
30. Geider K, Hoffmann BH. Proteins Controlling The Helical Structure - of DNA. Ann. Rev. Biochem, 50: 233, 1981.
31. Ghazizadeh M, Kagawa S, Izumi K, et al. Immunochemical Detection of Carcinoembryonic Antigen in Benign Hyperplasia and Adenocarcinoma - of the Prostate With Monoclonal Antibody. J. Urol., 131/3: 501, 1984
32. Gilbert N. Estadística. Nueva Editorial Interamericana, México, D.F. 1a. edición en español: 96, 1980.
33. Gilchrist KW, Kalish L, Gould VE, Hirschl S, et al. Immunostaining - for Carcinoembryonic Antigen does not Discriminate for Early Recu - rrence in Breast Cancer. The ECOG Experience. Cancer, 56/2: 231, - 1985.
34. Go. VLW, Ammon HV, Holtermuller KH, Krag E, Phillips S. Quantifica - tion of Carcinoembryonic Antigen Like Activities in Normal Human -- Gastrointestinal Secretions. Cancer, 36/6: 2316, 1975.
35. Gold P, and Freedman SO. Demonstration of Tumor-Specific Antigens - in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absor - tion Thechniques. J. Exp. Med., 121: 439, 1965.

36. Grop C, Lehman FG, Bauer HW, Haveman K. Carcinoembryonic Antigen, - Alpha-Fetoprotein, Ferritin, and Alpha₂-Pregnancy Associated Glycoproteins in the Serum of Lung Cancer Patients and its Demonstration in Lung Tumor Tissues. *Oncology*, 34: 267, 1977.
37. Hakomori S. Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis. *Ann. Rev. Biochem*, 50: 733, 1981.
38. Hakomori S. Glycosphingolipids. *Scientific American*, 254/5: 32, -- 1986.
39. Hancock RL. Theoretical Mechanisms for Synthesis of Carcinogen-Indu - ced Embryonic Proteins. VIII: Transcriptional Theory. *Medical Hypotheses*, 9: 229, 1982.
40. Hancock RL. Theoretical Mechanisms for Synthesis of Carcinogen-Undu - ced Embryonic Proteins. II: Pertubations of Post-Translational Nu - clear Protein Modification. *Medical Hypotheses*, 4: 290, 1978.
41. Hancock RL, McDuffie NG, Sinclair DB. Theoretical Mechanisms for Synthesis of Carcinogen-Induced Embryonic Proteins. IV: The Viruses. - *Medical Hypotheses*, 5: 383, 1979.
42. Hanghton G, Whitmane AC. Genetics. The Immune Response and Oncoge - nes. *Transplant Rev.*, 28: 75, 1976.

43. Harris EK, Kanofsky P, Shakarji G, and Cotlove E. Biological and Analytic Components of Variation in Long Term Studies of Serum Constituents in Normal Subjects. II: Estimating Biological Components of Variation. Clin. Chem., 16/12: 1022, 1970.
44. Harris EK, and DeMets DL. Effects of Intra- and Inter-individual Variation on Distributions of Single Measurements. Clin. Chem., 18/3: 244, 1972.
45. Harris EK and DeMets DL. Estimation of Normal Ranges and Cumulative Proportions by Transforming Observed Distributions to Gaussian Form Clin. Chem, 18/7: 605, 1972.
46. Harris EK. Some Theory of Reference Values. I: Stratified (Categorized) Normal Ranges and a Method for Following and Individual's Clinical Laboratory Values. Clin. Chem, 21/10: 1457, 1975.
47. Harris EK. Effects of Intra- and Inter-Individual Variation on the Appropriate Use of Normal Ranges. Clin. Chem., 20/12: 1535, 1974.
48. Harris EK. Some Theory of Reference Values. II: Comparison of Some Statistical Models of Intraindividual Variations in Blood Constituents. Clin. Chem., 22/8: 1343, 1976.
49. Herbeth B, Bagrel A. A Study of Factors Influencing Plasma CEA Levels in an Unselected Population. Oncodev. Biol. Med., 1/4-5: 191,- 1980. Abstracts.

50. Hesdorffer C., Derman DP, Bezwoda WR. The Value of Pleural Fluids - Carcinoembryonic Antigen Estimation in the Diagnosis of Malignant - Tumors of the Pleural Cavity. South Afr. Med. J., 66/2: 54, 1984.
51. Horie Y, Gomyoda M, Kishimoto Y, et al. Plasma Carcinoembryonic Antigen and Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas. Cancer, 53/5, 1137, 1984.
52. Hudson L, and Hay FC. Practical Immunology. Blackwell Scientific - Pub.: 299, 1980.
53. Hunter T. The Proteins of Oncogenes. Scientific American, 250/6: 60, 1984.
54. Imai K, Moriya Y, Fujita H, et al. Immunologic Characterization - and Molecular Profile of Carcinoembryonic Antigen Detected by Monoclonal Antibodies. J. Immunology, 132/6: 2992, 1984.
55. Inpijn LA. Alpha- Foetoprotein During Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma in Rats. Tropical and Geographical Med., 30/2: 227, 1978.
56. Kojima O, Ikeda E, Uehara Y, et al. Correlation Between Carcinoembryonic Antigen in Gastric Cancer Tissue and Survival of Patients - With Gastric Cancer. Japanese J. of Cancer Res. (GANN), 75/3: 230,- 1984.

57. Krush MS, Zamcheck N, Litch HT. CEA and Genetics: Gardner's Syndrome. *Dis. Col. and Rect.*, 26/6: 404, 1983.
58. Kuroki M, Ichiki S, and Matsvoka R. Identification and Partial Characterization of the Unglycosylated Peptide of Carcinoembryonic Antigen Synthesized by Human Tumor Cell Lines in the Presence of Tunicamycin. *Mol. Immunol.*, 21/8: 743, 1984.
59. Laferté S, and Krantz MJ. Purification and Characterization of a - 50,000 Mol Wt. Glucoprotein Antigen, and Localization of Determinant Involved in Cross-Reactivity With Carcinoembryonic Antigen. *Mol. Immunol.*, 20/4: 421, 1983.
60. Laurence DJR, Tuberville C, Anderson SG, and Neville A. First British Standard for Carcinoembryonic Antigen. *Br. J. Cancer*, 32: 295, 1975.
61. Lawrence HS. Transfer Factor in Cellular Immune Deficiency Disease. *N. Engl. J. M.*, 283: 411, 1970.
62. Maiolini R, Bagret A, Chavance M, Krebs B, et al. Study of an Enzyme Immunoassay Kit for Carcinoembryonic Antigen. *Clin. Che.*, 26/12: 1718, 1980.
63. Marck J. Chromosomal Abnormalities and Their Specificity in Human Neoplasms: An Assessment of Recent Observations by Banding Techniques. *Adv. Cancer Res.*, 24: 165, 1977.

64. Martin EW, Cooperman M, King G, Rinker L, Carey LC, et al. A Retrospective and Prospective Study of Serial CEA Determinations in the - Early Detection of Recurrent Colon Cancer. *Am. J. Surgery*, 137: 167, 1979.
65. M.E.D. Communications (developed by): Solid Phase Immunoassays for - CEA: Clinical and Laboratory Experience. Abbott Laboratories, Chicago, USA: 1, 1981.
66. Medoff JR, Jegasothy BV, Roche JK. Carcinoembryonic Antigen-Induced Release of a Suppressor Factor from Normal Human Lymphocytes in vi-
tro. *Cancer Research*, 44: 5822, 1984.
67. Mitchel MS, editor. First in a Series CEA: Clinical Applicatios in Breast Cancer. Excerpts from a State of the Art. Round Table Discuss
sion. Abbott Laboratories, Chicago, USA: 1, 1983.
68. Mughal AW, Hortobagyi GN, Fritsche HA, Buzdar AU, et al. Serial -- Plasma Carcinoembryonic Antigen Measurements During Treatmen of Me-
tastasic Breast Cancer. *J. Am. Med. Association (JAMA)*, 249/14:1881,
1983.
69. Nichols EJ, Kannagi R, Hakomori SI, Krants MJ, et al. Carbohydrate-
Determinants Associated With Carcinoembryonic Antigen (CEA). *J. Im-*
munology, 135/3: 1911, 1985.

70. Nicholson LG, and Poste G. The Cancer Cell: Dynamic Aspects and Modifications in Cell-Surface Organization. First of Two Parts. N. Engl. J. Med., 295: 197, 1976.
71. Nicolson LG, and Poste G. The cancer Cell: Dynamic Aspects and Modifications in Cell-Surface Organization. Second of Two Parts. N. Engl. J. Med., 295: 253, 1976.
72. Oji M, Furue M, Tamaki K. Serum Carcinoembryonic Antigen Level in Paget's Disease. Br. J. Dermatol., 110/2: 211, 1984.
73. Old LJ. Cancer Immunology. Scientific American, 236/5: 62, 1977.
74. Pérez Vega E. Comunicación Personal. Departamento de Oncología del - Centro Médico Nacional, México, D.F., 1985.
75. Pérez Tamayo R. La Célula Neoplásica. En: Patología Molecular, Subcelular y Celular. La Prensa Médica Mexicana: 555, 1975.
76. Perzin KH, Peterson N, Castiglioni CL, et al. Intramucosal Carcinoma of Small Intestine Arising in Regional Enteritis (Crohn's Disease): Report of a Case Studied for Carcinoembryonic Antigen and Review of the Literature. Cancer, 54/1: 151, 1984.
77. Ponka A, Forslund T. Cardiac Failure, Hepatic Congestion and Increased Level of Serum Carcinoembryonic Antigen. Postgrad. Med. J., 60/699: 56, 1984.

78. Prehn RT. Tumor Progression and Homeostasis. *Adv. Cancer Res.*, 23: 203, 1976.
79. Procedimiento para la Determinación de CEA (EIA). Abbott Laboratories, Chicago, USA: 1, 1984.
80. Purnell DM, Heatfield BM, Trump BF. Immunocytochemical Evaluation of Human Prostatic Carcinomas for Carcinoembryonic Antigen, Nonspecific Cross-Reacting Antigen, Beta-Chorionic Gonadotrophin, and Prostate-Specific Antigen. *Cancer Res.*, 44/1: 285, 1984.
81. Rasmuson T, Bjork GR, Damber L, et al. Tumor Markers in Colorectal Carcinoma. An Evaluation of Carcinoembryonic Antigen, Tissue Polypeptide Antigen, Placental Alkaline Phosphatase and Pseudouridine. *Acta Radiologic Oncology*, 23/1: 27, 1984.
82. Revista de Estadística y Geografía. Secretaría de Programación y Presupuesto, Coordinación General de los Servicios Nacionales de Estadística, Geografía e Informática, México: 2/7: 36, 1982.
83. Rosenthal KL, Tompkins WAF, and Rawls WE, Factor Affecting the Expression of Carcinoembryonic Antigen at the Surface of Cultured Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Res.*, 40: 4744, 1980.
84. Saad MF, Fritsche HA Jr., and Samaan NA. Diagnostic and Prognostic Values of Carcinoembryonic Antigen in Medullary Carcinoma of the Thyroid. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 58/5: 889, 1984.

85. Salmon MA. Development Defects and Syndromes. MM +M Publishers, England: 72, 1978.
86. Sandler RS, Freund DA, Herbst CA Jr., Sandler DP. Cost Effectiveness of Postoperative Carcinoembryonic Antigen Monitoring in Colorectal Cancer. *Cancer*, 53/1: 193, 1984.
87. Satake K, Kanasawa G, Kho I, Chung Y, Umeyama K. Evaluation of Serum Pancreatic Enzymes, Carbohydrate Antigen 19-9 (CA 19-9) and Carcinoembryonic Antigen in Various Pancreatic Diseases. *Am J. Gastroenterology*, 80/8: 630, 1985.
88. Schandl MM, Schandl EK. CEA Testing Methods: Abbott and Roche. *Clin. Chem.* 28: 1584, 1982.
89. Siest G, Schiele F, Galteau MM, Panek E, et al. Aspartate Amino -- transferase and Alanine Aminotransferase Activities in Plasma: Statistical Distributions, Individual Variation, and Reference Values. *Clin. Chem.* 21/8: 1077, 1975.
90. Skarin AT, Delwiche R, Zamcheck N, Lokich JJ, and Frei E. Carcinoembryonic Antigen: Clinical Correlation With Chemotherapy for Metastatic Gastrointestinal Cancer. *Cancer*, 33: 1239, 1974.
91. Smith HG, Chretien PB, Henson DE, Silverman NA, Alexander JC, Viral Specific Humoral Immunity to Herpes Simplex-Induced Antigens in Patients With Squamous Carcinoma of the Head and Neck. *The Am. J. of Surgery*, 132: 541, 1976.

92. Sonnendecker WEE, De Souza JJJ, Herman AAB. Screening for Liver Metastases from Ovarian Cancer With Serum Carcinoembryonic Antigen -- and Radionuclide Hepatic Scintiphography. *Br. J. Obstet. Gynaecology*, 91/2: 187, 1984.
93. Spiegel BE. *Estadística*. McGraw-Hill, México: 188, 1982.
94. Statland BE, Winkel P. Reference Values. En (Todd-Sanford-Davidsohn) *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* W. B. Saunders Co., 16 th edition: 29, 1979.
95. Statland BE, Winkel P. Neoplasia. En (Kaplan SD editor): *Clinical - Chemistry, Theory, Analysis and Correlation*. C.V. Mosby Co.: 882,- 1984.
96. Steffens J, Friedman W, Lobeck H. Immunohistochemical Demonstration of Tumor-Associated Antigens With the Aid Monoclonal and Polyclonal Antisera in Carcinoma of the Bladder. *Urol. Res.*, 13/2: 55, 1985.
97. Stein GS, Stein JL, and Thompson JA. Chromosomal Proteins in Transformed and Neoplastic Cell: A Review. *Cancer Res.*, 38: 1181, 1978.
98. Stent GS. Cellular Communication. En: *Communication*. *Scientific American*: 16, 1972.
99. Sun N, Ediginton T, Carpentier C, et al: Immunochemical Localization of Carcinoembryonic Antigen (CEA), CEA-S, and Nonspecific Cross-Reacting Antigen (NCA) in Carcinomas of Lung. *Cancer*, 52: 1632, 1983.

100. Takeda A, Matzuyama M, Kuzuya K, et al. Mixed Mesodermal Tumor Ovary With Carcinoembryonic Antigen and Alkaline Phosphatase Production. Histochemical, Autoradiographic, and Electron Microscopic Studies - of Heterotransplanted Tumors in Athymic Nude Mice. *Cancer*, 53/1: -- 103, 1984.
101. Thompson DMP, Kuprey J, Freedman SO. The Radioimmunoassay of Circulating Carcinoembryonic Antigen of the Human Digestive System. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 64: 161, 1969.
102. Toki T, Oikawa N, Tase T, Wada Y, Yajima A, Suzuki M. Immunohistochemical Localization of Carcinoembryonic Antigen in Adenocarcinoma of the Endocervix and Endometrium. *J. Exp. Med.*, 146/1: 27, 1985.
103. Tsukatani K, Kobayashi K, Murase N, Sumitomo S, et al. Characterization of Cells in Salivary Gland Lesions by Immunohistochemical - - Identification of Carcinoembryonic Antigen. *Oral Surg. Med. Pathol.*, 59/6: 595, 1985.
104. Unwin N, and Anderson R. The Structure of Proteins in Biological -- Membranes. *Scientific American*, 250/2: 56, 1984.
105. Valdes R.Jr., Stein K. Comparison of RIA and IRMA Methods for Measurement of Carcinoembryonic Antigen (CEA). *Clin. Biochem.*, 15: 241, 1982.

106. Vest SL, and Roche JK. Carcinoembryonic Antigen: Physician Attitudes, Patterns of Use, and Impact Upon Patient Care. *Digestive Disease and Sciences*, 27/4: 289, 1982.
107. Wanebo HJ, Rao B, Carl MP, Hoffman RG, et al. Preoperative Carcinoembryonic Antigen Level as a Prognostic Indicator in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. M.* 299: 488, 1978.
108. Waring MJ. DNA Modification and Cancer. *Annual Review of Biochem.*, 50: 159, 1981.
109. Weber K, Osborn M, *The Molecules of the Cell Matrix*. *Scientific American*, 253/4: 92, 1985.
110. Weinberg RA. A Molecular Basis of Cancer. *Scientific American*, 249/5: 102, 1983.
111. Wiley E, Mendelshon E, and Eggleston JC. Distribution of Carcinoembryonic Antigen and Blood Group Substances in Adenocarcinoma of the Colon. *Laboratory Investigation*, 44/6: 507, 1981.
112. Williams GZ, Young DS, Stein MR, and Cotlove E. Biological and Analytic Components of Variation in Long Term Studies of Serum Constituents in Normal Subjects. I: Objectives, Subject Selection, Laboratory Procedures, and Estimation of Analytic Deviation. *Clin. Chem.* 16/12: 1016, 1970.

113. Wilson AC. The Molecular Basis of Evolution. Scientific American, -- 253|4: 148, 1985.
114. Wolmark N, Fisher B, Wieand HS, et al. The Prognostic Significance of Preoperative Carcinoembryonic Antigen Levels in Colorectal Cancer. Results from NSABP Clinical Trials. Ann. Surg., 199/4: 375, - 1984.
115. Yachi A, Imai K, Fujita H, et al. Immunochemical Distribution of the Antigen Determinants Detected by Monoclonal Antibodies to Carcinoembryonic Antigen. J. Immunol., 132/6: 2998, 1984.
116. Yamaguchi N, Okabe T, Kawai K. Establishment of a Human Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Producing Cell Line in a Protein Free Chemically Defined Medium. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 110/1: 42, 1985.
117. Yuan R. Structure and Mechanism of Multifunctional Restriction Endonucleases. Ann. Rev. Biochem., 50: 285, 1981.
118. Zamcheck N. Carcinoembryonic Antigen: Quantitative Variations in Circulating Levels in Benign and Malignant Digestive Tract Disease. Adv. Intern. Med., 19: 413, 1974.