

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**COMPORTAMIENTO DE LA GLUCOPROTEINA ASOCIADA  
A TUMORES (TAG-72) DEFINIDA POR EL ANTICUERPO  
MONOCLONAL B72.3 EN NEOPLASIAS DE ORIGEN  
DIGESTIVO**

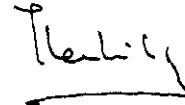
**Autor: Ana González Fernández**  
**Director: Prof. Dr. José L. Balibrea Cantero**

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La Tesis Doctoral "Comportamiento de la Glucoproteína asociada a Tumores (TAG-72) definida por el Anticuerpo Monoclonal B 72.3 en Neoplasias de origen digestivo", reúne las condiciones de contenido y forma necesarias para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

V.º B.º  
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis



Fdo.: \_\_\_\_\_  
(fecha y firma)

Fdo.: Prof. J.L. Balibrea  
(fecha y firma)

D.N.I.:

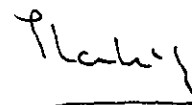
D.N.I.: 2.011.048

## INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral "Comportamiento de la Glucoproteína asociada a Tumores (TAG-72) definida por el Anticuerpo Monoclonal B 72.3 en Neoplasias de origen digestivo", ha sido considerada por el Consejo del Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión  
Consejo Departamento  
13 de Junio 1.994

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. J.L. Balibrea  
(fecha y firma)

30 Junio 1.994

***A mis padres y a  
mi hermana Sara***

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Profesor Doctor José Luis Balibrea Cantero** director de esta Tesis Doctoral, que me ha ayudado y apoyado en todo momento dándome ánimos para terminar este trabajo.

**Al Doctor Alvaro Ruibal Morell**, Jefe del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Central de Asturias por la orientación, aportación de material de laboratorio, ayuda técnica, apoyo y amistad.

**A mi amigo, el Doctor Francisco Vizoso Piñeiro**, por su asistencia en los problemas informáticos y elaboración de gráficos, por la "paciencia" que ha tenido en la corrección, por su valiosa colaboración científica y el apoyo que en todo momento y desinteresadamente me ha brindado, sin el cual no habría podido concluir este trabajo.

A todo el **Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Central de Asturias** por su trabajo, comprensión y amistad.

**A mi cuñado, el Doctor Juan Mascareñas Perez-Iñigo** por su colaboración informática y apoyo desinteresado.

**A mis padres y mi hermana Sara** que han colaborado siempre conmigo, aguantándome y animándome en los momentos de decaimiento y desilusión.

# INDICE

## I. INTRODUCCION

- BIOLOGIA TUMORAL .....	7
--------------------------	---

## 1. MARCADORES TUMORALES. ASPECTOS GENERALES..... 8

1.1. Definición de Marcador Tumoral .....	9
1.2. Concepto actual de marcador tumoral .....	12
1.3. Clasificación de los Marcadores Tumoraes.....	20
1.4. Utilidad de los Marcadores Tumoraes.....	22

## 2. ANTICUERPOS MONOCLONALES..... 27

2.1. Obtención de Anticuerpos Monoclonales.....	28
2.2. Aplicaciones clínicas potenciales de los Anticuerpos Monoclonales.....	35

## 3. EL ANTICUERPO MONOCLONAL B72.3 COMO MARCADOR TUMORAL..... 45

3.1. Glucoproteína Asociada a Tumores TAG-72.....	46
3.2. El Anticuerpo Monoclonal B72.3.....	50
3.3. Anticuerpos Monoclonales frente a la TAG-72 de primera y segunda generación.....	57

## 4. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....61

<b>5. PACIENTES Y METODOS.....</b>	<b>64</b>
5.1. Pacientes.....	65
5.2. Método.....	69
5.2.1. Método Analítico.....	69
5.2.2. Método Estadístico.....	73
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
6.1. Controles .....	75
6.2. Patologías benignas.....	77
6.3. Cáncer de estómago .....	87
6.4. Cáncer de colon .....	105
6.5. Cáncer de esófago .....	127
6.6. Cáncer de pancreas .....	132
<b>7. DISCUSION .....</b>	<b>137</b>
7.1. Controles .....	138
7.2. Patologías benignas .....	140
7.3. Cáncer Gástrico .....	142
7.3.1. El B72.3 como parámetro diagnóstico .....	144
7.3.2. B72.3 y seguimiento .....	146
7.3.3. B72.3 como factor pronóstico .....	147
7.3.4. B72.3 y CEA en el Cáncer gástrico .....	148
7.4. Cáncer Colorrectal .....	151
7.4.1. El B72.3 como parámetro diagnóstico .....	153
7.4.2. B72.3 y seguimiento .....	155
7.4.3. B72.3 como factor pronóstico .....	155

7.4.4. B72.3 y CEA en cáncer colorrectal .....	156
7.5. Cáncer de Esófago .....	161
7.6. Cáncer de Páncreas.....	164
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>168</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>173</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>197</b>

## **INTRODUCCION**

## **A.- BIOLOGIA TUMORAL**

Uno de los retos de la Medicina en nuestro tiempo es conseguir la curación del cáncer. Es indudable que, en las últimas décadas, se han obtenido notables avances, fundamentalmente en el terreno de la Biología Molecular, Inmunología e Ingeniería Genética. Todo ello, nos ha proporcionado un mayor entendimiento de la biología tumoral y un acercamiento a los mecanismos que rigen la carcinogénesis.

Sabemos que el cáncer es un fenómeno clonal. Parte de una célula que se transforma en maligna y comienza a multiplicarse de una forma desordenada. Para poder precisar cuál es el factor determinante del desarrollo de un tumor maligno, debemos conocer qué alteraciones ha sufrido la célula funda-

dora. En estas últimas décadas han empezado a esbozarse algunas respuestas<sup>(1)</sup>.

El descubrimiento de los oncogenes ha abierto nuevas perspectivas al facilitar el posible desarrollo de técnicas y estrategias innovadoras, con eventuales repercusiones sobre el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

En los cromosomas de las células tumorales se han descubierto genes implicados en el desarrollo canceroso. Estos genes, denominados ONCOGENES, parecen ser la fuerza motriz determinante del crecimiento incontrolado de muchas células cancerosas. Los genes *transformantes* en su estado no maligno (proto-oncogenes), son componentes constituyentes del genoma de todos los organismos eucariotas, y se han conservado en alto grado durante la evolución. Así pues, la activación maligna de un oncogén se encuentra íntimamente ligada al desarrollo de un tumor maligno. La confirmación de esta realidad supone una auténtica revolución en el campo de la oncología. Sin embargo, sólo a partir de los años 70, desde el desarrollo de la Tecnología del DNA recombinante, han dispuesto los investigadores de los instrumentos adecuados para desmontar la delicada maquinaria molecular existente en el interior de la célula y, así, tratar de clarificar las causas y origen del proceso cancerígeno<sup>(2,3,4)</sup>.

Aunque investigaciones anteriores habían dejado claro que el DNA estaba implicado en algún nivel básico del proceso tumoral, fue necesario el desarrollo de Técnicas de Ingeniería Genética para poder demostrar de una forma exacta en qué difiere el DNA de una célula cancerosa y el procedente de una célula normal. En este sentido, SHIH, Ch. en 1978<sup>(5)</sup> y WEIMBERG, R. en 1979<sup>(6)</sup>, consiguieron transformar fibroblastos de ratón en un cultivo celular con fragmentos de DNA procedentes de otros fibroblastos previamente transformados por medio de un carcinógeno químico, el metilcolantreno. Trabajos posteriores de los mismos grupos de investigación, sugerían que el *principio transformante* residía en pocos segmentos del DNA<sup>(7,8)</sup>.

Las técnicas actuales de manipulación genética han permitido extraer el DNA de las células y obtener segmentos del genoma celular mediante enzimas nucleares de restricción, y cada una de las cadenas de DNA puede, a su vez, ser cortada en miles de fragmentos. Empleando otras enzimas, las ligasas,

cada uno de los segmentos del DNA puede ser recombinado con el material genético de un bacteriófago, que va a actuar como vector, creando un genoma híbrido. El problema que se planteaba entonces era cómo seleccionar los clones que pudieran contener los fragmentos de DNA responsables de los cambios cancerosos<sup>(8)</sup>.

Los grupos de WEIMBERG, WIGLER y BARBACID<sup>(9)</sup>, con metodologías diferentes y en distintos laboratorios, lograron aislar con éxito el DNA transformante. En todos los casos, esta actividad radicaba en segmentos pequeños de DNA con un único gen de estructura definida. La actividad transformante, que inicialmente se había atribuido de una manera global al DNA de la célula tumoral podía asignarse a un sólo gen, un oncogén celular. A partir de estos oncogenes se crearon sondas que permiten localizarlos en el genoma de células normales <sup>(10,11)</sup>.

Con anterioridad a estos trabajos, se había llegado también al conocimiento de los oncogenes por otra vía: los retrovirus, que contienen un genoma de RNA. Algunos, contienen oncogenes capaces de producir tumores en animales. Este RNA se retrotranscribe a DNA cuando el virus infecta a una célula. BISHOP y COLS <sup>(12)</sup> demostraron que estos oncogenes no eran realmente víricos, sino que tenían un origen celular. Se trataba de proto-oncogenes *capturados* y trasducidos por los retrovirus, de forma que se activan y se convierten en oncogenes una vez que son incorporados al genoma retroviral <sup>(13,14,15)</sup>.

Desde el momento en que se comenzaron a caracterizar los proto-oncogenes, se planteó cómo se producía su activación, la cual conllevaría cambios críticos en su estructura, su función o en sus productos proteicos. El mecanismo de activación de un proto-oncogén parece depender, en muchos casos, de una mutación instada por algún tipo de agresión ambiental a su DNA. A esta conclusión llegaron BARBACID M. y cols.<sup>(16)</sup> tras aislar el oncogén del cáncer de vejiga a partir de una línea celular cancerosa denominada EJ o T24. Por medio de procedimientos de clonaje e hibridación, consiguieron localizar con precisión una lesión genética capaz de conducir al desarrollo de un tumor. Se trataba de una mutación puntual, es decir, un cambio en una sola base de la secuencia de DNA en un gen normal que, de esta forma, se convertía en un oncogén<sup>(17,18)</sup>.

Aunque el primer oncogén humano se identificó en un cáncer de vejiga, se sabe que, aproximadamente un 20% de los tumores humanos llevan oncogenes en su DNA. La mayoría de estos onco-genes son miembros de la familia de genes *ras*, que son genes eucariotas bien conservados en la evolución<sup>(19)</sup>. SCOLNICH y cols.<sup>(20)</sup>, consiguieron analizar la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes *ras*, denominadas p21. Dichas proteínas, se encuentran tanto en las células normales como en las transformadas, siendo una mutación puntual la responsable de la adquisición de la actividad transformante. WIGLER y cols.<sup>(21)</sup> relacionaron un oncogen humano con la familia *ras*. Este nuevo oncogén denominado N-*ras*, se encuentra en el DNA de varios tipos de leucemia, linfoma, neuroblastoma, cáncer de colon y diversos sarcomas. La presencia de oncogenes *ras* en una amplia gama de tumores indica que la activación de un proto-oncogén celular concreto, no está específicamente limitada a un tejido particular. Es decir, el mismo gen puede activarse en varios tejidos, originando en cada caso un tipo diferente de tumor<sup>(22,23,24)</sup>.

Se han descrito otras formas de activar un proto-oncogén<sup>(25,26,27)</sup>:

- \* Por *Multiplicación o Amplificación génica*.
- \* Por *Redistribución Cromosómica*. En este caso, la región determinante de la proteína codificada por un proto-oncogen se recombina, en el curso de reorganizaciones cromosómicas, con la región reguladora de un gen de inmunoglobulinas, haciendo que la información genética del proto-oncogén se exprese a un nivel desacostumbrado.

Todos estos hechos, nos llevan a plantearnos numerosos interrogantes: ¿por qué se mantienen en el genoma humano genes que, con ligeras alteraciones, pueden convertirse en agentes capaces de transformar células normales en cancerosas?. No se conocen todas las respuestas, aunque un aspecto parece obvio: si los proto-oncogenes no desempeñaran un papel vital en el metabolismo celular, no se habrían conservado en el genoma. Probablemente, se trate de factores de crecimiento y diferenciación imprescindibles para la propia evolución.

Aunque queda mucho camino por recorrer, la búsqueda de los mecanismos responsables del proceso canceroso ha progresado bastante como lo demuestra la transición ocurrida desde que se asignaba la responsabilidad a unos oscuros *factores genéticos* hasta adjudicársela a moléculas de DNA y, finalmente a genes concretos dentro de esas moléculas. El papel desempeñado por los oncogenes en la carcinomatosis no está del todo aclarado. La evidencia ha demostrado que juegan un importante papel en el desarrollo normal de los tejidos en fases tempranas de la vida, justamente cuando se necesita para el crecimiento una rápida división celular.

Así, en el núcleo mismo del proceso canceroso, deben estar implicados elementos celulares tales como las proteínas codificadas por los oncogenes. No se conoce con certeza cuál es la función de las mismas, aunque podrían intervenir en la regulación del crecimiento celular. En este sentido, al ser proteínas alteradas, ocasionan una profunda distorsión del metabolismo celular, e inducen el crecimiento tumoral. Es probable que este defecto no sea el único, ya que la carcinogénesis parece ser un proceso multifactorial. Una mutación puntual, que origina una proteína defectuosa, constituye sólo un paso que afecta a un único gen. Posiblemente, la activación de un oncogén es una de las etapas en la formación de un tumor. El oncogén sería necesario, pero difícilmente suficiente. En principio, son genes normales que se supone juegan un papel vital en el estadio inicial del crecimiento celular durante el desarrollo embrionario. Más tarde, deben desactivarse. Sin embargo, cuando el oncogén se activa tardíamente, probablemente tras la exposición a ciertos agentes promotores del proceso tumoral, induciría a la célula a que detenga su diferenciación y comience a multiplicarse de forma continua dando lugar a la aparición de un tumor maligno. Recientes investigaciones con combinaciones de oncogenes sustentan la teoría propuesta hace tiempo de que el cáncer es un proceso que cursa en varias etapas. Es posible que para que se produzca un tumor sea necesaria al menos la combinación de dos oncogenes<sup>(28)</sup>.

Particular importancia ha tenido el hallazgo de los denominados ANTIONCOGENES o genes supresores, considerado como uno de los avances más espectaculares de la biología molecular. Se ha podido establecer que, al igual que los oncogenes causan la enfermedad al mutarse, los antioncogenes pueden también provocarla al dejar de expresarse<sup>(29,30)</sup>.

A pesar de los grandes progresos conseguidos, estamos lejos de comprender las redes de transmisión de señales que se alteran en las células tumorales. Desconocemos, igualmente, los mecanismos moleculares de un proceso crítico como son las metástasis. Las funciones normales de los productos proteicos de los oncogenes están aún pobremente caracterizadas. Algunos de estos productos tienen actividad kinasa específica para forforilar residuos de tirosina en proteínas celulares específicas. Sin embargo, este tipo de actividad la poseen también algunas hormonas y factores de crecimiento, e incluso está presente en células humanas normales en su etapa de diferenciación terminal<sup>(31,32)</sup>.

Los mecanismos que regulan la actividad o inactividad de los oncogenes no están completamente aclarados. En general, la actividad se asocia a hipometilación de la secuencia de nucleótidos correspondientes al DNA del oncogén, mientras que la hipermetilación de las mismas secuencias, se asocia a silencio transcripcional. Sin embargo, no todos los tumores, ni siquiera los que pertenecen al mismo tipo, presentan hiperactividad oncogénica<sup>(33)</sup>.

Por otra parte, se están realizando numerosas investigaciones destinadas a lograr un mayor conocimiento del comportamiento de las células cancerosas, que se caracteriza por muchos rasgos específicos. El crecimiento incontrolado es el más evidente. Estas células no respetan las reglas territoriales que confinan a las células normales en tejidos concretos. De particular interés es la existencia en su membrana externa de unos antígenos tumorales denominados **Antígenos Asociados a Tumores (TAA)**<sup>(34)</sup>. Aunque, en un principio se pensó que marcaban a una determinada célula tumoral, pueden encontrarse también en otros tipos de células cancerosas, en células fetales, e incluso en células de tejidos adultos normales<sup>(35)</sup>.

Recientemente, por medio de técnicas de hibridación, se han obtenido **Anticuerpos Monoclonales (AM)**, capaces de reaccionar con los antígenos presentes en los tumores<sup>(36)</sup>. El hecho de que estos antígenos se hayan detectado también en células normales constituye uno de los mayores obstáculos con que nos encontramos para la aplicación diagnóstica o terapéutica de un AM dirigido contra un antígeno tumoral. En este contexto, surge el concepto de **Marcador Tumoral (MT)** que supone un método

complementario de diagnóstico eficaz, e incluye algunos antígenos de superficie celular o proteínas intracelulares asociadas a los tumores.

La utilidad clínica de los MT, especialmente tras la obtención de sustancias químicamente homogéneas, gracias a la utilización de AM, no se limita al diagnóstico, sino que comprende aspectos relacionados con la patogenia tumoral, e incluso con la realización de intentos terapéuticos. El principal inconveniente de los MT es, en la mayoría de los casos, su poca especificidad. Por ello, su interpretación es compleja y requiere un profundo conocimiento de sus limitaciones, especialmente en los procesos benignos que pueden condicionar la aparición de falsos positivos.

## **1.- MARCADORES TUMORALES. ASPECTOS GENERALES**

### **1.1.- DEFINICION DE MARCADOR TUMORAL**

Se entiende por Marcadores Tumorales aquellas sustancias presentes en la sangre o en los fluidos orgánicos de los pacientes con cáncer, que son producidas por la propia neoplasia o por la respuesta del organismo ante la invasión tumoral, y liberadas a la circulación general<sup>(37,38)</sup>.

Diversas sustancias pueden ser consideradas como MT, incluyendo enzimas, hormonas, proteínas y antígenos de superficie celular. Recientemente, se ha propuesto que las alteraciones en los oncogenes y las proteínas del citoesqueleto celular, puedan tener también valor como marcadores<sup>(39,40)</sup>.

Se pueden determinar por diversos métodos bioquímicos e inmunológicos como el Radioinmunoanálisis (RIA), Análisis por Inmunosorción Enzimática (ELISA), Fijación del Complemento, Inmunodifusión y Hemagluti-

nación. Los métodos más sensibles son el RIA y ELISA y el más empleado actualmente, el RIA<sup>(40)</sup>.

Varias características definen al MT ideal<sup>(41,42)</sup>:

1. Debe ser producido únicamente por la célula tumoral y ser fácilmente detectable en los fluidos corporales.
2. **Ser específico:** No debe estar presente en sujetos sanos ni en pacientes con enfermedades no tumorales, y si lo está, los niveles deben ser distintivamente inferiores a los de los pacientes con neoplasias. El MT puede ser específico de la neoplasia permitiendo distinguir entre proliferación maligna y no maligna (ausencia de falsos positivos), o específico de un órgano facilitando la localización del tumor primitivo o de sus metástasis.

La especificidad se expresa por el porcentaje (que debe ser el mayor posible) de sujetos que presentan un resultado negativo del marcador en una población indemne de cáncer puede expresarse del siguiente modo:  $VN \div (VN + FP) \times 100$ , siendo VN = verdaderos negativos, y FP = falsos positivos.

Idealmente, sólo una patología maligna debería producir una elevación de los niveles del marcador. En la práctica, la noción de especificidad está unida a la de FP<sup>(42)</sup>.

- 3.- **Ser sensible:** debe estar presente con la suficiente frecuencia y precocidad en el desarrollo de la neoplasia para que sea útil en el "screening" de la misma.

La sensibilidad de un marcador para una neoplasia dada se expresa por el porcentaje de sujetos que han presentado resultados positivos dentro de la población portadora del tumor objeto de estudio.

Se expresa como  $VP \div (VP + FN) \times 100$ , siendo VP = verdaderos positivos y FN = falsos negativos.

En la práctica, la noción de sensibilidad se confunde a veces con la de falsos negativos.

- 4.- La cantidad del marcador debe reflejar directamente el volumen tumoral, y ser detectable incluso cuando no exista evidencia clínica de tumor.
- 5.- El nivel del MT ideal debe correlacionarse con los resultados del tratamiento antineoplásico<sup>(43)</sup>.

Ninguno de los MT descritos hasta la fecha cumple todos estos criterios. Sin embargo, es indudable que constituyen un método complementario de diagnóstico eficaz, aunque con limitaciones derivadas fundamentalmente de su poca especificidad.

Existen diversos factores que influyen en la presencia y niveles de un marcador. Entre ellos, cabe citar los siguientes<sup>(38)</sup>:

- El número de células tumorales existente.
- La proporción de células malignas que sintetizan el marcador, y el índice celular de síntesis.
- La localización del marcador en la célula tumoral, y los mecanismos de liberación y el paso a la circulación general.
- La vida media del marcador en la circulación, que depende del tamaño y de la naturaleza de la sustancia.

Por otra parte, existen factores fisiológicos como la edad, sexo, embarazo, lactancia, y otros como el tabaquismo, adicción al alcohol, que tienen repercusión sobre los niveles plasmáticos de algunos marcadores tumorales, lo que hace que debamos ser especialmente cautos a la hora de valorar los datos.

## 1.2.- CONCEPTO ACTUAL DE MARCADOR TUMORAL

El concepto actual de MT cristaliza a principios de los años 60 con el descubrimiento de la Alfafetoproteína en 1964 por Tatarinov<sup>(44)</sup> en pacientes con hepatocarcinoma, y del Antígeno Carcinoembrionario (CEA) en 1965 por Gold y Freedman<sup>(45)</sup>, asociando su presencia sérica a carcinoma colorectal.

Se trata de sustancias de muy bajo peso molecular, con o sin actividad biológica, que se originan en cualquier parte de la célula y que reflejan los cambios producidos en la misma cuando se transforma.

Desde entonces, se han propuesto numerosas sustancias para su utilización como MT. Sin embargo solamente unas pocas han demostrado tener un papel definido en la oncología clínica, a causa de una tasa inaceptablemente elevada de falsos positivos, baja correlación con la extensión y estadio de la neoplasia, o pronóstico poco fiable de las recurrencias tumorales<sup>(41)</sup>.

Actualmente, el concepto de MT ha experimentado variaciones a raíz de los avances logrados en inmunología, bioquímica y biología molecular. En

este sentido, ya no se consideran solamente como MT a los clásicos productos de secreción celular, sino a todas las estructuras de la célula tumoral en las diversas fases por las que atraviesa a lo largo de su evolución natural hasta la metastatización. Así, elementos como las proteínas de membrana, factores de crecimiento, mitógenos autocrinos, estroma conectivo y macrófagos, se han convertido en una nueva fuente de MT. Por otra parte, se empiezan a conocer las funciones biológicas de algunos marcadores, y su correlación con los mecanismos que controlan el crecimiento, diferenciación e invasión tumoral.

En la enfermedad tumoral, pueden observarse distintas manifestaciones. En primer lugar, las originadas localmente por el propio tumor. En segundo lugar, las manifestaciones a distancia que, a su vez, pueden subdividirse en dos tipos: las manifestaciones que ocurren tras la colonización tumoral (serían las metástasis clásicas), y las producidas por la acción de los productos químicos elaborados por el tumor, que son los responsables del síndrome paraneoplásico. Finalmente, las respuestas producidas por la interacción entre el tumor y el huésped<sup>(37)</sup>. En este sentido, los Anticuerpos Monoclonales (AM), que permiten la detección del epítoto específico de un antígeno, han facilitado el hallazgo de muchas de estas sustancias que acompañan, de una u otra forma, a los distintos tumores<sup>(36)</sup>.

La transformación celular neoplásica trae consigo una serie de consecuencias bioquímicas como:

- \* Variaciones en el tipo o proporción de isoenzimas.
- \* Tendencia a disminuir la síntesis de enzimas relacionadas con las funciones especializadas y diferenciadas de la célula, debido a la inhibición, represión o pérdida de los correspondientes genes estructurales. Una de las consecuencias de este fenómeno es la producción de células indiferenciadas<sup>(40)</sup>.
- \* La producción de sustancias ectópicas.

Son sintetizadas por los tejidos neoplásicos, aunque no lo sean por el tejido en el cual se originan. Muchos de los productos ectópicos son del tipo de las hormonas polipeptídicas, así como

productos placentarios. Se pueden reconocer por valoración bioquímica, efectos celulares y, algunos, por su comportamiento experimental como antígenos. La producción de hormonas ectópicas puede tener lugar, según el origen histológico del tumor, por los siguientes mecanismos: a) amplificación génica, b) derrepresión génica y c) actividad de células del sistema APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation).

Teniendo en cuenta que los cambios producidos en la célula afectan tanto al núcleo como al citoesqueleto y la membrana celular, podemos considerar diversas facetas en la concepción actual de los MT:

## **1.- NUCLEO CELULAR**

Se han identificado diferentes tipos de genes que intervienen en la carcinogénesis<sup>(46)</sup>: oncogenes, genes que afectan de forma indirecta a la génesis tumoral y antioncogenes o genes oncosupresores.

### **A. ONCOGENES**

Los mecanismos de crecimiento y diferenciación celular, están regulados en condiciones normales por unos genes, denominados protooncogenes, a través de la producción de diversas proteínas. Cuando estos genes, bajo determinados estímulos alteran su estructura, y por lo tanto su función, se denominan oncogenes. Esta disregulación perturba profundamente la división celular e induce la transformación neoplásica.

La determinación de estos oncogenes tiene valor pronóstico y de clasificación histológica. Aunque en algunos casos el oncogén está relacionado con las características del tumor, lo habitual es que sean varios los que definan sus propiedades<sup>(47,48)</sup>.

### **B. ANTIONCOGENES**

Estos genes parecen controlar el crecimiento celular, determinando la transformación neoplásica cuando dejan de expresarse. Su estudio detallado puede facilitar el conocimiento de los mecanismos íntimos que regu-

lan el crecimiento y la diferenciación celular. En este sentido, se ha relacionado la inactivación del cromosoma 1p con la génesis de los carcinomas ductales de mama<sup>(46)</sup>.

### C. ESTUDIO DEL RNA CELULAR

El interés del estudio del RNA celular se basa en el dintel crítico que experimenta la célula antes de entrar en la fase de síntesis.

### D. ESTUDIO DEL DNA CELULAR

Merecen especial atención:

\* **Grado de aneuploidía:** Se relaciona con un peor pronóstico de la enfermedad, menor intervalo libre y mayor tendencia a las recidivas y mortalidad en la mayoría de los tumores. En este sentido, se ha demostrado que, en los pólipos colorrectales, el porcentaje de células aneuploides se correlaciona con el grado de displasia y el tamaño del pólipo. En los tumores colorectales, está ligado a la presencia de invasión de la serosa, afectación ganglionar, indiferenciación, recidivas, menor intervalo libre de enfermedad, considerándose como un parámetro pronóstico independiente que permite predecir la aparición de recidivas<sup>(48)</sup>.

\* **Fase S:** Es la fase del ciclo celular donde se produce la proliferación celular. Su estudio permite conocer los mecanismos que controlan dicha proliferación y conseguir parámetros de utilidad clínica e indicadores de la proliferación celular. Se le ha concedido cierto valor pronóstico en neoplasias de mama con ganglios negativos.

\* **Índice de DNA:** Es mayor en los tumores aneuploides. Se considera como un indicador de recidiva en tumores ováricos.

## 2.- CITOESQUELETO

Está constituido por microfilamentos, microtúbulos, filamentos intermedios y retículo microtubular. Su interés clínico radica en la importancia de

sus funciones biológicas, ya que participa en la síntesis proteica, diferenciación celular y en el control del crecimiento.

Su alteración incide de forma negativa en la síntesis de DNA inducida por factores de crecimiento. La unión de dichos factores a sus receptores, determina cambios estructurales del citoesqueleto que desempeñan un importante papel en la capacidad metastásica de los tumores.

Su principal interés clínico radica en la capacidad de precisar el origen de ciertos tumores<sup>(50)</sup>, así como en su relación con la proliferación, invasión y características hormonales de ciertas neoplasias. Además, una proteína del citoesqueleto denominada trombospondina y el factor de Von Willebrand, permiten distinguir lesiones premalignas de algunos tipos de tumores.

### **3.- LA MEMBRANA CELULAR**

Los antígenos tumorales que dan origen a los marcadores, están en íntima relación con la membrana celular, la cual, a su vez, está estrechamente vinculada a los cambios que experimenta la célula en su transformación neoplásica. Así, las modificaciones que sufren los glicolípidos en la célula tumoral, dan lugar a la aparición de Antígenos Asociados a Tumores (AAT) y contribuyen al crecimiento autónomo de la célula transformada<sup>(51)</sup>.

Por otra parte, dentro de la superficie celular existe un tipo de proteínas, íntimamente relacionadas con uno de los mecanismos de transducción de la señal de crecimiento, denominadas glicosilfosfatidilinositol. Su interés radica en la facilidad con que son liberadas, por lo que pueden constituir la base para la obtención de nuevos MT (un ejemplo sería el CEA). Se han estudiado también los lactoaminoglicanos tipo I y II. El primero, se eleva con mayor frecuencia en el suero de pacientes portadores de neoplasias. El tipo II prácticamente no se incrementa en patologías no tumorales, lo que le confiere gran importancia de cara a lograr antígenos tumorales más específicos<sup>(52)</sup>.

La transformación neoplásica da lugar a la aparición de antígenos oncoasociados y oncoespecíficos. Algunos de ellos son inmunogénicos, y están asociados a los mecanismos de rechazo tumoral. Se denominan oncoasociados, cuando son típicos del tumor, pero no exclusivos del mismo, por lo que

pueden encontrarse en otras circunstancias, como sucede con los antígenos embriofetales que existen en el embrión, el feto y, algunos, en pequeña cantidad, en los tejidos adultos normales, y con los antígenos viroinformados y viroinducidos.

Por el contrario, los antígenos oncoespecíficos son exclusivos de la célula cancerosa y no se encuentran en los tejidos normales o patológicos no tumorales. Estos antígenos, pueden originarse por distintos mecanismos:

- Transposición de fragmentos de DNA con transcripción de nuevas moléculas de mRNA y biosíntesis de nuevas proteínas (neoantígenos).
- Derrepresión de aloantígenos de isoenzimas.
- Derrepresión de aloantígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).
- Derrepresión de aloantígenos del Complejo Menor de Histocompatibilidad (mHC).
- Mutación o modificación epigenética de antígenos del MHC.
- Transposición y traducción de antígenos informados por los genes víricos (antígenos viroinformados), o resultantes de la modificación de genes celulares por la información codificada por el genoma vírico (antígenos viroinducidos).

Igualmente, se ha estudiado la aparición de antígenos oncoembrionarios y oncofetales, que son elaborados normalmente en diferentes etapas del desarrollo ontogenético, y desaparecen o quedan reducidos a trazas prácticamente indetectables en el adulto, pero que son nuevamente producidos por los tumores. Según el origen histológico de la neoplasia, estos antígenos se pueden producir de dos maneras: a) por amplificación de la expresión de genes embriofetales manifestados muy débilmente en los tejidos adultos correspondientes, y b) por derrepresión de genes embriofetales no funcionantes tras la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario y fetal. Es más frecuente el mecanismo de amplificación.

Algunos tumores muy indiferenciados y anaplásicos, pueden expresar antígenos oncoembrionarios de tipo primitivo, los cuales no se encuentran nunca en células normales en proliferación activa.

En el momento actual, se están estudiando numerosos antígenos de membrana, unos relacionados con la metastatización (gp 580), otros con el tratamiento antineoplásico (H34), visualización de metástasis en médula ósea (DF3,EMA,HMFG2), realización de inmunogammagrafía (CA 125, CA 19.9, B 72.3, CEA).

#### **4.- MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DE CRECIMIENTO**

Los Sistemas de internalización de la señal de crecimiento constituyen un aspecto fundamental dentro de la fisiopatología tumoral. Se pueden considerar dos mecanismos fundamentales de transducción de la señal de crecimiento:

- a) Un mecanismo que implica la unión de los factores de crecimiento a receptores relacionados con las proteínas G, que son elementos fundamentales de control de las diversas vías de transducción de la señal de crecimiento, así como de la diferenciación y regulación de los protooncogenes<sup>(53)</sup>.

Las vías principales de transducción de la señal son las del AMPc y la del DG-IP, y una tercera complementaria o relacionada con la del DG-IP, que es la de la fosfatidilcolina.

Especial interés revisten la fosfolipasa C y la proteinquinasa C. En este sentido, la alteración del genoma que codifica la fosfolipasa C podría ser el primer eslabón en la transformación tumoral<sup>(54)</sup>.

La estimulación de la proteinquinasa C por los glicerolípidos, parece jugar un papel importante en la progresión tumoral<sup>(55)</sup>.

b) Un mecanismo relacionado con la unión del factor de crecimiento a receptores con actividad tirosinquinasa específica. Dentro de estos receptores merecen especial mención:

- El Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EFG).
- El Receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF) tipo I (se correlaciona con la proliferación y el desarrollo mamario maligno) y tipo II (se correlaciona con la actividad proliferativa).
- Receptor de la prolactina , relacionado con los tumores mamaros.
- Receptor de Laminina, cuya presencia celular es índice de mayor agresividad y capacidad invasiva tumoral.
- Receptores estrogénicos (RE) y de progesterona (RP), cuya valoración cuantitativa es un factor pronóstico independiente. Su expresión es indicativa de la diferenciación celular en tumores de mama.
- Receptor de la Gastrina. Se correlaciona con el crecimiento, proliferación y supervivencia de los tumores colorectales.
- Receptor de la plasmina, ligado a la invasión tumoral.

## **5.- MATRIZ EXTRACELULAR**

Es una estructura compleja y dinámica que actúa como soporte tridimensional, aislando los compartimentos tisulares, y como filtro selectivo para determinadas sustancias. Interviene además en la citodiferenciación, mitogénesis y morfogénesis. En su composición destacan por su importancia<sup>(56,57)</sup>:

- \* La Laminina que está relacionada con la diferenciación, crecimiento, adhesión, invasión y fagocitosis.
- \* Los proteinglicanos.
- \* El Colágeno IV.

- \* La Fibronectina.
- \* La Trombospondina, implicada en el proceso de metastatización, así como en la transformación de algunas lesiones premalignas a malignas.
- \* Proteasas secretadas por la célula tumoral, de acción mitógena y degradante de la matriz extracelular.
- \* Enzimas como las colagenasas y catepsinas.

### **1.3.- CLASIFICACION DE LOS MARCADORES TUMORALES**

Se han propuesto numerosas clasificaciones de los MT, más o menos amplias, agrupándolos según su utilidad, procedencia, etc. Exponemos a continuación los dos tipos de clasificación que por su simplicidad, se emplean con mayor frecuencia<sup>(40,41,43)</sup>.

#### **CLASIFICACION DE LOS MARCADORES TUMORALES**

##### **1.- ANTIGENOS ONCOFETALES**

- CEA
- ALFA-FETOPROTEINA

##### **2.- HORMONAS PEPTIDICAS**

Son normalmente secretadas en el sujeto sano. Sólo el aumento de su secreción es patológico.

- big-ACTH (prohormona) ..... en Oat-Cell
- HORMONA ANTIDIURETICA (ADH).
- PARATHORMONA (PTH) ..... en Ca Hepatocelular
- CALCITONINA
- HORMONA DEL CRECIMIENTO ..... en Oat-Cell
- HORMONA ADENOCORTICOTROPICA (ACTH)
- VASOPRESINA
- NEUROFISINA
- OCITOCINA ..... en Ca de Timo

### **3.- PROTEINAS PLACENTARIAS**

#### **\* HORMONALES**

- GONADOTROFINA CORIONICA (HCG)
- LACTOGENO PLACENTARIO HUMANO (HPL)

#### **\* NO HORMONALES**

- ISOENZIMA REGAN (Isoenzima de la fosfatasa alcalina).

### **4.- ENZIMAS**

- FOSFATASA ACIDA PROSTATICA
- LACTICODESHIDROGENASA
- ENOLASA
- GAMMAGLUTARILTRANSFERASA
- SIALILTRANSFERASAS

### **5.- PROTEINAS SERICAS**

- INMUNOGLOBULINAS

### **6.- ANTIGENOS RELACIONADOS CON LOS GRUPOS SANGUINEOS**

- CA 19.9
- CA 50
- CA 72

### **7.- MISCELANEA**

- POLIAMINAS (espermidina, espermina)
- FERRITINA
- HIDROXIPROLINA

- METABOLITOS DE CATECOLAMINAS
- DIAMINAS (putrescina, cadaverina)

Esta clasificación es bastante arbitraria, ya que la HCG puede ser considerada como una hormona o como una proteína placentaria. Por otra parte, la Alfa-fetoproteína, se conoce como un antígeno oncofetal ya que, de forma semejante al CEA, está producida normalmente por el feto, y se pensó, inicialmente que podría estar presente en etapas posteriores de la vida solamente en pacientes con enfermedades malignas. En el feto, es una proteína sérica<sup>(41)</sup>.

La identidad estructural de estas moléculas en el sujeto sano y en el portador de una neoplasia, es cuestionada por la demostración de la existencia de variantes tumorales, presentando modificaciones a nivel de las cadenas glucídicas, glucoproteínas o de mutaciones puntuales de uno de sus aminoácidos.

Otra clasificación más global incluye:

- 1.- MT específicos *per se*
- 2.- MT que adquieren especificidad merced a su valoración.
- 3.- MT orientadores.
- 4.- MT de transformación, ya sean generales o específicos.

#### **1.4.- UTILIDAD DE LOS MARCADORES TUMORALES**

El enfoque multidisciplinario de que son objeto las neoplasias en el momento actual, ha facilitado el desarrollo de diversas líneas de investigación a partir, sobre todo, del descubrimiento de los AM, que han permitido

obtener marcadores más específicos, así como el desarrollo de técnicas de fácil estandarización como el RIA. La utilidad de los MT no se limita solamente al terreno diagnóstico, sino que comprende también aspectos relacionados con la patogenia tumoral, valoración de la evolución de la enfermedad, despistaje de sujetos de riesgo, e incluso, ensayos terapéuticos.

De una manera escueta, la utilidad clínica de los MT abarca los siguientes aspectos:

**\* DIAGNOSTICO**

- PRECOZ (Grupos de riesgo)
- DE CONFIRMACION
- DE EXTENSION DE LA LESION

**\* SEGUIMIENTO**

- DETECCION DE TUMOR RESIDUAL
- DETECCION DE RECIDIVAS
- CONTROL DEL TRATAMIENTO QUIMIO Y  
RADIOTERAPICO

**\* PRONOSTICO**

**\* COMPRESION DE LA PATOGENIA TUMORAL**

**\* TERAPEUTICA**

No obstante, aunque es indudable que la determinación de MT circulantes tiene importantes implicaciones clínicas, hay que considerar de una forma crítica los nuevos marcadores que se van obteniendo, y evaluar aquellas situaciones en las cuales podamos encontrar marcadores que puedan ser estandarizados en la práctica clínica. Otro aspecto a tener en cuenta es que para permitir la localización in vivo de un tumor por medio de un AM, el antígeno debería estar fijamente unido a la célula tumoral. En cambio, solamente aquellos antígenos que son liberados o secretados a la circulación pueden ser considerados como MT en sentido estricto<sup>(41)</sup>.

Al valorar un determinado MT, hay que tener en cuenta unas consideraciones fundamentales. En primer lugar, la discusión de la historia y biología de un marcador incluye la evaluación del método empleado para medirlo<sup>(62)</sup>. En este sentido, cabe preguntarse: cuál es la sensibilidad y especificidad del análisis; cuándo una sustancia con reacción cruzada confiere resultados falsos positivos; si la molécula que se determina es tan heterogénea que el análisis puede dar resultados falsos negativos; y, finalmente, cuál es el límite inferior de detección del análisis.

La segunda cuestión radica en determinar si la incidencia de la elevación de un marcador, determina su sensibilidad en una neoplasia dada. Teniendo en cuenta que el valor predictivo de cualquier test se relaciona directamente con su sensibilidad, un marcador que se encuentre en un pequeño porcentaje de pacientes con cáncer, es poco probable que sea clínicamente útil. Por el contrario, un marcador que está elevado prácticamente en todos los casos, como ocurre con la HCG en neoplasias trofoblásticas, puede resultar enormemente valioso<sup>(41)</sup>. En condiciones ideales, se considera que puede detectarse clínicamente un tumor que contenga  $10^9$  células, es decir, 1 gramo de peso y aproximadamente 1 cm de diámetro. A este nivel de detección ya ha comenzado la diseminación metastásica. La cuestión fundamental que se plantea entonces, es la relación que pueda existir entre la masa tumoral y la concentración plasmática de un marcador.

Su utilidad en el *screening* del cáncer está vinculada a la sensibilidad del marcador. En este sentido, el marcador ideal, que se eleva en estadios precoces de la enfermedad, podría emplearse en el *screening* de grandes poblaciones. Sin embargo, con mayor frecuencia los marcadores se elevan raramente en las fases iniciales de la enfermedad tumoral, y no pueden emplearse con esta finalidad.

La especificidad de un marcador tumoral dado, reviste también gran importancia. Así, la elevación de un MT específico para una determinada neoplasia, tiene valor diagnóstico solamente en unos grupos clínicos estrechamente definidos<sup>(42)</sup>.

El objetivo es disponer de técnicas más sensibles de forma que desciendan los límites de sensibilidad a  $10^5$  células, o incluso a  $10^3$ . Este hecho

reviste gran importancia, ya que sabemos que aproximadamente en el 90% de los enfermos el crecimiento tumoral es exponencial.

La utilidad diagnóstica de los MT sólo es real cuando están presentes en elevada concentración en el suero, la masa tumoral es aún pequeña, y los signos clínicos no son aparentes. Esta eventualidad se aplica en el caso de la beta-HCG para el coriocarcinoma placentario (detección de  $10^7$  células, aproximadamente 10 mg de tumor), la Alfa-fetoproteína en el caso del hepatocarcinoma, la calcitonina en el carcinoma medular de tiroides y las catecolaminas para los neuroblastomas y feocromocitomas.

Otra consideración de interés es determinar si el nivel del marcador se correlaciona con el estadio o pronóstico del proceso tumoral. Los MT habitualmente utilizados, están elevados con mayor frecuencia en estadios avanzados de la enfermedad. Así, por ejemplo, en tumores testiculares de células germinales no seminomatosos, la presencia de un nivel sérico elevado del marcador, sugiere que el paciente tiene enfermedad fuera del testículo. Por el contrario, si el marcador se emplea como un instrumento de screening en estadios precoces, su incremento deberá conducir a una búsqueda cuidadosa de enfermedad metastásica. De mayor valor sería un marcador detectable en todos los pacientes portadores de una neoplasia dada, y en los que el nivel de elevación fuera reflejo de la masa tumoral existente. En la práctica, se trata más bien de asegurar una presunción diagnóstica que de llegar al diagnóstico a través de la dosificación de un marcador. Sin embargo, esta ayuda diagnóstica puede verse notablemente aumentada por la utilización de varios marcadores convenientemente seleccionados, permitiendo incrementar el índice de positividad<sup>(41)</sup>.

Por otra parte, si el pronóstico de la enfermedad se correlaciona con la elevación del marcador se debe, generalmente, a que existe una correlación con el volumen tumoral existente, y en cierta medida con el potencial maligno de la población de células tumorales que producen el marcador.

Finalmente, haremos referencia al empleo de los MT para la monitorización del tratamiento. En este sentido, el marcador permite, por ejemplo, valorar la amplitud de la exéresis quirúrgica de un tumor por la normalización de los niveles plasmáticos del mismo que tiene lugar, aproximadamente, en

un mes si la resección fue completa. En caso de exéresis incompleta, el marcador permanecerá elevado. Una disminución hasta la normalidad, seguida en un periodo de tiempo más o menos breve de una elevación de los niveles séricos del MT, señala una exéresis incompleta o una recidiva. La apreciación del efecto de la quimioterapia, a través de la dosificación de los MT reposa sobre el mismo principio general <sup>(62)</sup>.

No obstante, debido a que casi todos los MT descritos hasta el momento actual han dado resultados falsos negativos, no puede ser completamente valorable que la normalización del marcador indique la efectividad de la terapia. Aún en el caso de las neoplasias trofoblásticas, donde la HCG es un modelo de MT, la quimioterapia debe continuar algunos ciclos después de que se haya normalizado el marcador. Igualmente, la eficacia demostrada de un determinado tratamiento para un tumor específico, es también útil a la hora de establecer el valor de un MT tanto en lo referente a su especificidad como a su sensibilidad. En este sentido, si un tratamiento es totalmente inadecuado, no sirve de nada que el marcador sea o no capaz de demostrar la existencia de enfermedad oculta, aunque no se hayan registrado nunca falsos positivos<sup>(41)</sup>.

La situación actual de los MT permite el estudio de la agresividad y comportamiento de muchos tumores y, en numerosos casos, son instrumentos sumamente valiosos para establecer la extensión de la enfermedad, detectar precozmente la aparición de recurrencias, valorar la eficacia terapéutica, e incluso se están llevando a cabo prometedores intentos terapéuticos.

## **2. ANTICUERPOS MONOCLONALES**

## **2.1 .- OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

La verdadera limitación que ha existido para un uso generalizado de los anticuerpos en los ensayos inmunológicos ha sido, sin duda, la heterogeneidad de los resultados y lo incierto de la respuesta inmunológica. Los primeros intentos de dosificación inmunológica se basaron en el empleo de anticuerpos policlonales, constituidos por numerosas inmunoglobulinas dirigidas contra diferentes sitios antigénicos de la molécula que había sido utilizada para su producción. Los anticuerpos obtenidos, no reconocían el mismo determinante antigénico y no presentaban la misma especificidad para la molécula a dosificar. Además, sus características de reactividad no eran las mismas. Todo ello, planteaba problemas para la producción homogénea de inmunoreactivos<sup>(39)</sup>.

La técnica de los hibridomas, desarrollada por el grupo de KÖHLER y MILSTEIN<sup>(36)</sup>, ha logrado superar la mayoría de las objeciones prácticas y conceptuales para la aplicación de las técnicas inmunológicas a aspectos básicos y clínicos. En este sentido, los AM como producto de células híbridas, han despertado el mayor interés, al ser su número elevado y sus posibilidades de estudio realmente enormes.

Los anticuerpos han sido utilizados en las tres últimas décadas para la investigación de complejos sistemas biológicos y, para detectar, localizar y cuantificar mínimas proporciones de una sustancia en mezclas complejas. Como sabemos, en el sistema inmunitario humano, los anticuerpos identifican antígenos extraños al organismo. La alta especificidad de los anticuerpos monoclonales ha facilitado grandes avances, no sólo en el campo de la biología molecular, sino también en el de la biomedicina.

Hasta 1983, la única forma de fabricar anticuerpos era injertar los hibridomas en ratones por medio de la inyección intraperitoneal de los mismos. Los hibridomas crecían en el peritoneo del ratón y se producía líquido ascítico rico en anticuerpos (en concentraciones de 5-10 mg/ml). El problema de este procedimiento radica en que los ratones producen muy poca ascitis, y por lo tanto, se obtenían pocos anticuerpos.

Con la técnica de MILSTEIN<sup>(36)</sup>, este inconveniente queda solventado. Para ello, es preciso obtener primero híbridos de células productoras de anticuerpo y de células de mieloma (hibridomas). Las células productoras de anticuerpos procedían del bazo de ratones previamente inmunizados con células pequeñas. Una vez fusionadas las células productoras de anticuerpos con células de mieloma de ratón, se obtenían clones, a partir de los diversos híbridos individuales. Los anticuerpos producidos por unos 20.000 clones se ensayaban frente a dos líneas diferentes de células pequeñas cultivadas, y una línea de células linfoides no cancerígenas. Después de esta prueba, se obtuvieron 8 anticuerpos capaces de reaccionar con las células cancerosas, pero no con la línea celular normal. Tres de ellos, se sometieron a otra serie de pruebas frente a células tumorales y células normales. Una línea, reaccionaba sólo con células normales de riñón y con células de cáncer de mama, neuroblastoma y adenocarcinoma de pulmón. Las otras dos líneas solamente fueron probadas con células fetales<sup>(36)</sup>.

De esta forma, las células del mieloma híbrido resultante o hibridoma, procedentes de la fusión de cultivos celulares de mieloma con linfocitos inmunizados, expresaban tanto la propiedad del linfocito de producir anticuerpos específicos, como el carácter inmortal de las células mielomatosas. Estas células híbridas pueden manipularse mediante las técnicas aplicables a los cultivos permanentes de células animales. Cada célula híbrida puede clonarse, y cada clon produce grandes cantidades de un anticuerpo específico para un solo determinante antigénico (contra el que ha sido inmunizado el linfocito). A su vez, los clones pueden conservarse indefinidamente, y en cualquier momento pueden tomarse muestras de ellos para su cultivo o inyección en animales a fin de obtener AM a gran escala.

Teniendo una célula tan eficaz, sólo quedaba por resolver un problema: reunir muchas células en un volumen pequeño.

Posteriormente, surgieron otros procedimientos para la producción de AM, tratando de mejorar el método basado en sociedades de ratones previamente descrito. Comentaremos brevemente las otras tres técnicas disponibles:

- *Cultivos de células a gran escala* en grandes fermentadores. La fermentación a gran escala utiliza fermentadores de unos 1000 l. Las células se cultivan en suspensión y alcanzan densidades de aproximadamente 10 células/ml de cultivo. El inconveniente de este método es que el anticuerpo se encuentra en el mismo medio que las células y, además está en pequeña concentración (unos 10 microg/ml).
- *Técnica de las fibras huecas*. Este procedimiento emplea una cámara cilíndrica con fibras huecas y membranas porosas, en cuyo exterior crecen las células. Los nutrientes penetran en las fibras permitiendo el crecimiento y división de las células, y los productos del metabolismo salen a través de las membranas porosas. La ventaja de este método es que las células alcanzan concentraciones superiores a los 100 mill/ml, con lo que se consigue poner muchas células en muy poco espacio. Pero, las cámaras son muy pequeñas y, en con-

secuencia, si se quieren fabricar muchos anticuerpos, se precisa un número elevado de cámaras.

- *Microencapsulación.* Este método comporta la inclusión de células de hibridoma en pequeñas microesferas huecas de 0.5 mm de diámetro. La superficie de la microesfera es en realidad una membrana semipermeable compuesta por un polímero sintético que permite el libre intercambio de nutrientes celulares y de otras moléculas con peso superior a los 100.000 daltons. Pero dentro, comprime a las células híbridas y a los anticuerpos monoclonales producidos. Las células microencapsuladas, cultivadas en fermentos, alcanzan densidades superiores a 100 mill cel./ml y concentraciones de anticuerpo de  $1^{10}$  microgr./ml. Al final del proceso, las microcápsulas se lavan para retirar impurezas de alto peso molecular del exterior, y se dializan las impurezas de bajo peso molecular del interior. Por último, las microcápsulas se rompen para liberar el anticuerpo flotante en ellas. Con esta técnica, se superan los problemas que presentaban los procedimientos anteriores, y se consigue un mayor rendimiento.

Otro aspecto a tener en cuenta, es la purificación de los anticuerpos, una vez obtenidos. Si se van a emplear con fines diagnósticos, no es necesario que tengan gran pureza, por lo que la técnica que utiliza sociedades de ratones es adecuada para esta aplicación. En cambio, desde el punto de vista terapéutico, es fundamental que el material sea de gran pureza. La purificación se lleva a cabo por cromatografía de intercambio iónico, obteniendo un producto final muy puro y activo. Cuando los anticuerpos se fabrican en un gran fermentador o en fibras huecas, se mezclan con las células y el medio, en el que hay otras proteínas. En estos casos, los métodos de purificación que se utilizan pueden ser nocivos para el anticuerpo, particularmente porque pueden alterar su estructura secundaria haciéndolo inactivo. Por ello, si se quieren utilizar cultivos convencionales a gran escala o fibras huecas, hay que tener un medio libre de suero para facilitar la purificación. Como no todas las células pueden crecer en un medio libre de suero, al emplear estas técnicas, es preciso trabajar con una línea celular que se desarrolle en estas condiciones. Con la microencapsulación, en cambio, no hay ninguna dificultad para purificar los anticuerpos en cualquiera de los dos medios.

El desarrollo y la caracterización de AM que ha hecho posible la identificación de Antígenos Asociados a Tumor (TAA), está siendo objeto de investigaciones activas. Existen algunos principios básicos comunes a la mayor parte de los TAA, cuya comprensión es de gran importancia para lograr un mejor conocimiento y utilización de los AM<sup>(58)</sup>:

- Un determinado TAA, se expresa usualmente en más de un tipo de tumor. Así, por ejemplo, un AM generado empleando como inmunógeno un extracto de cáncer de mama, puede reaccionar no sólo con este tipo de tumor, sino con neoplasias de otro origen como el cáncer de ovario, pulmón o colon.
- No todos los tumores de un determinado tipo histológico expresan un TAA dado. Por ejemplo, un AM puede ser reactivo solamente con el 80% de los carcinomas colorrectales.
- Muchos TAA son componentes estables de la membrana celular. Esto es completamente diferente de lo que ocurre con los antígenos linfoides, los cuales, cuando se unen a un anticuerpo son usualmente internalizados o cubiertos. En cambio, cuando los AM se ligan a algunos TAA, lo hacen en la superficie celular, pero no se produce la internalización de los mismos.
- Mención especial merece el fenómeno de la heterogenicidad y modulación antigénica dentro de poblaciones de células tumorales. Este hecho puede aplicarse a la mayoría de los TAA que han sido definidos por AM. Así, no todas las células dentro de una masa tumoral expresan un TAA particular.

Además, existe una modulación temporal de los antígenos tumorales. La heterogenicidad antigénica ya se había apreciado cuando se empleaban exclusivamente técnicas microscópicas para el examen de muestras de biopsia. En 1954, FOULDS<sup>(59)</sup> documentó la existencia de morfologías diferentes en distintas zonas de un mismo tumor de mama. Posteriormente, mediante el empleo de diversos métodos y antisueros policlonales, se demostró la heterogenicidad antigénica dentro de poblaciones de células cancerosas. Actualmen-

te, los AM han permitido, por una parte, definir la existencia de dicha heterogenicidad y modulación de los TAA específicos en cánceres humanos, así como dentro de una misma masa tumoral, y por otra parte, determinar algunos de los parámetros que miden la expresión de varios fenotipos antigénicos y desarrollar modelos para estudiar y, quizá, controlar este fenómeno<sup>(58)</sup>.

Las características en la expresión de la heterogenicidad tumoral pueden sintetizarse en: Diferencias en el cariotipo, antigenicidad e inmunogenicidad variables, diferentes propiedades bioquímicas, diferentes patrones de crecimiento, variable sensibilidad a los citostáticos y a las radiaciones y, finalmente, capacidad de metastatización.

Se ha descrito un amplio rango de fenotipos antigénicos en los tumores. La variación fenotípica se ha observado también en la expresión de los TAA dentro de una determinada masa tumoral. Uno de los patrones apreciados, a veces, es la presencia en una zona del tumor, de células con TAA reactivos con un determinado AM, mientras que las células de otras zonas no son reactivas con dicho anticuerpo. Un tipo más común de heterogenicidad antigénica es el denominado "patchwork" o parcheado. En este caso, se observan células que expresan un TAA específico, adyacentes a otras células negativas para el mismo antígeno. En otros casos, existen cambios en el patrón de reactividad con un AM específico dentro de la propia célula. Así, un antígeno detectado en el citoplasma celular en una determinada zona del tumor, se detecta en el borde luminal de estructuras diferenciadas en otra parte de ese mismo tumor<sup>(60)</sup>.

Diversos estudios, han puesto de manifiesto que también se producen cambios en el fenotipo antigénico al efectuar pasos repetidos de cultivos celulares. Este hecho justificaría, en parte, la falta de correlación observada cuando investigadores de distintos laboratorios emplean líneas celulares establecidas en sus trabajos<sup>(61)</sup>.

HORAND HAND y cols.<sup>(60)</sup>, definieron más ampliamente la capacidad de modulación antigénica en poblaciones celulares del carcinoma mamario clonado-MCF-7. En este caso, aunque alguno de los clones MCF-7 mantenía un fenotipo antigénico estable durante todo el periodo de observa-

ción, en otros se apreciaba un drástico cambio en el fenotipo. Empleando células activadas marcadas, se ha demostrado que un AM puede ser más activo, por ejemplo, con la superficie celular de clones MCF-7 durante la fase S del ciclo celular. Esta modulación, relativamente frecuente, de un TAA puede explicar, en parte, las observaciones detectadas con métodos inmunohistoquímicos al encontrar células TAA positivas, junto a otras negativas para un mismo AM en un tumor determinado. Este hecho, puede aplicarse también a las lesiones metastásicas de un tumor primario en un mismo paciente, expresando un TAA determinado en grado diferente unas lesiones de otras.

- Los TAA se han denominado "privados" cuando no se expresan o lo hacen débilmente en células adultas normales, y "públicos", cuando se expresan en casi todas las células de la mayor parte de los tumores de un determinado tipo histológico, aunque pueden ser también expresados por algunas poblaciones de células adultas normales<sup>(58)</sup>.
- El medio ambiental y la configuración tridimensional de las masas tumorales, parece desempeñar también un papel importante en la modulación de la expresión antigénica tumoral.
- La existencia de heterogeneidad celular añade una nueva dimensión a la cinética de las poblaciones celulares tumorales e introduce importantes implicaciones en la respuesta terapéutica. En la evolución natural de un tumor, la heterogeneidad celular manifiesta la existencia de diferentes subpoblaciones clonales, de las cuales una de ellas es la dominante. El rechazo y/o destrucción de la subpoblación dominante, permite la proliferación de otras subpoblaciones, convirtiéndose estas en dominantes. Si, como sucede habitualmente en la práctica clínica, no se consigue el objetivo terapéutico de erradicar totalmente la enfermedad tumoral, la evolución en la heterogeneidad celular, hace muy difícil la curación. Es por ello que la heterogeneidad celular intratumoral, con sus implicaciones biológicas y clínicas, debe introducir el diseño de tratamientos individualizados para cada paciente y tipo de tumor.

## **2.2.- APLICACIONES CLINICAS POTENCIALES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES**

La utilización clínica de los AM ha experimentado en los últimos años un considerable incremento. Desde un punto de vista teórico, sus posibilidades son ilimitadas.

En la práctica clínica habitual, constituyen la base de las nuevas formas de abordar el diagnóstico del cáncer. En este sentido, los AM ligados a un marcador radioactivo, pueden emplearse para la localización de tumores primarios o metastásicos. Con el fin de detectar precozmente nuevos tumores o recurrencias tumorales, se utilizan como reactivos inmunológicos para el análisis de muestras de sangre en busca de antígenos tumorales que hayan sido liberados a la circulación general en sujetos asintomáticos, y también para indicar la posible existencia de lesiones metastásicas ocultas en pacientes a los que se les ha extirpado el tumor primario. Igualmente, se están empleando para el análisis de otros líquidos orgánicos<sup>(41,63)</sup>.

## **APLICACIONES CLINICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES**

### **I .- DIAGNOSTICO**

A . *Screening* de líquidos corporales (suero, esputo, orina, LCR, derrames, ascitis) para detectar la presencia de TAA.

**B . Scanning nuclear con AM marcados radiactivamente:**

- 1 .- Detección de lesiones primarias o metastásicas (administración iv, sc, o im de los anticuerpos marcados).
- 2 .- Linfoescintigrafía para detectar la afectación de los ganglios linfáticos.

**C . Inmunopatología:**

- 1 .- Diagnóstico diferencial entre benignidad o malignidad.
- 2 .- Diagnóstico diferencial del tipo de tumor.
- 3 .-Subclasificación de tumor basada en la expresión de los TAA:
  - \* Potencial metastásico
  - \* Sitios específicos favorables a la localización de las metástasis.
  - \* Predecir la respuesta de los protocolos terapéuticos específicos.

**II .- MONITORIZACION DE LA PROGRESION DE LA ENFERMEDAD**

- A. Screening de líquidos corporales para detectar TAA.
- B. Scanning nuclear con AM marcados radiactivamente.
- C. Inmunopatología para detectar metástasis ocultas.
  - 1.- Citología por aspiración.
  - 2.- Biopsia de ganglios linfáticos o de médula osea.
  - 3.- Citología de líquidos orgánicos.

**III. TERAPIA**

- A. Citotoxicidad directa de AM
  - 1.- Mediada por el Complemento
  - 2.- Mediada por células

- B. Conjugación de drogas con AM
- C. Conjugación de toxinas con AM
- D. Conjugación de radionúclidos con AM
- E. Eliminación "ex vivo" del tumor desde productos de médula ósea
- F. Inhibición de receptores de factores de crecimiento
- G. Administración de AM anti-idiotipo para inducir inmunidad activa específica frente a antígenos tumorales.

Como hemos comentado anteriormente, la principal aplicación de los AM se basa en su capacidad para detectar TAA en el suero de pacientes portadores de una determinada neoplasia, generalmente por medio de RIA. Estas determinaciones suelen realizarse antes y después del tratamiento, valorando si se ha producido o no alguna modificación en los niveles de TAA séricos. En este sentido, pueden orientar al clínico sobre la efectividad de un tratamiento quimio o radioterápico mediante determinaciones periódicas de un determinado AM más o menos específico para una neoplasia dada<sup>(64)</sup>.

Por otra parte, el empleo de AM marcados con un elemento radiactivo, para detectar lesiones tumorales ocultas, es un área de investigación muy prometedora. El conocimiento de la localización exacta, tamaño y extensión de la lesión primaria antes de la cirugía, resulta una ventaja evidente para el cirujano. Además, su utilización sistemática en los 2-10 años siguientes a la extirpación quirúrgica del tumor primario, puede suponer un avance crucial en la detección de lesiones metastásicas, que no serían fácilmente identificables por los medios convencionales. Incluso, en los últimos cinco años, se están empleando, en algunos centros, para localizar lesiones metastásicas "in situ"<sup>(65,66,67)</sup>.

El correcto reconocimiento diagnóstico de células tumorales en derrames serosos por métodos histopatológicos, es una de las valoraciones más difíciles de realizar en la moderna medicina clínica. Esto se debe fundamentalmente a que las células cancerosas pueden confundirse con células mesoteliales reactivas, o pasar inadvertidas dentro de un magma inflamatorio benigno. En otros casos, aunque se reconozcan las células neoplásicas, puede ser difícil determinar el órgano de origen<sup>(58)</sup>. La vertiente práctica de estos

problemas, se encuentra diariamente en pacientes sin historia tumoral previa, o en sujetos con una neoplasia conocida, que en un momento dado desarrollan derrames pleurales, pericárdicos o ascitis, como una manifestación de enfermedad metastásica, infección o disturbio metabólico. En este sentido, el empleo de AM, mediante tinciones histoquímicas, es de gran utilidad para la valoración de preparaciones citológicas.

Además, también se pueden aplicar técnicas inmunocitológicas en las muestras obtenidas por Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF), donde las relaciones entre las células, así como los patrones arquitecturales están, a menudo, poco preservados, siendo difícil la distinción entre células benignas y malignas por citología convencional<sup>(68)</sup>.

Todo ello supone sólo el comienzo de futuros métodos de diagnóstico que pueden hacer posible la detección del cáncer en un estadio precoz, cuando la curación es aún posible.

Exponemos, a continuación, algunos de los principales factores que hay que tener en cuenta para la óptima utilización de un determinado AM como instrumento de radiolocalización y/o radioterapia de una determinada neoplasia<sup>(63)</sup>:

- Tamaño de la masa tumoral.
- Número de células que expresan el antígeno reactivo dentro del tumor.
- Número de moléculas de antígeno por superficie celular.
- Destino del Complejo Antígeno-Anticuerpo:
  - \* Estabilidad en la superficie celular.
  - \* Internalización.
  - \* Cubrimiento.
  - \* Desprendimiento.
  
- Grado de vascularización del tumor.
- Grado de infiltración y necrosis de la masa tumoral.
- Presencia y reactividad del antígeno circulante en sangre.
- Duración del anclaje del AM a la superficie celular.

- Isotipo de la Inmunoglobulina (subtipos Ig G o Ig M).
- Inmunoglobulina completa o fragmentos de la misma (Fab, Fab', F(ab)'<sub>2</sub>).
- Aclaramiento del AM de la sangre. Metabolización del AM:
  - . Excreción
  - . Sistema Retículoendotelial.
- Dosis empleada de AM.
- Via de inoculación: intravenosa, subcutánea, intra-arterial, intralinfática.

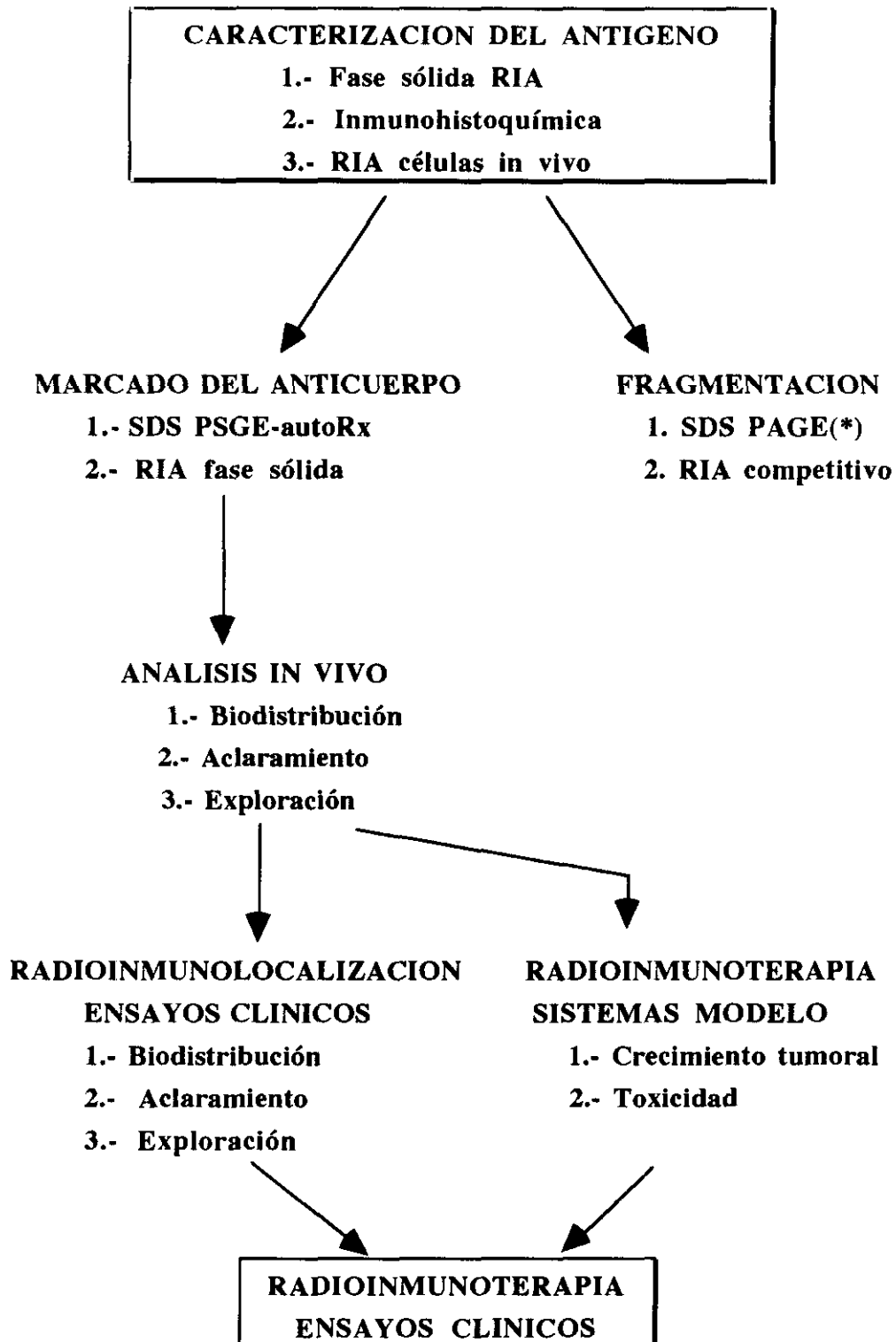
Cuando se emplean AM marcados radiactivamente, hay que considerar además:

- Afinidad del anticuerpo por un radionúclido específico.
- Elección del radionúclido.
- Actividad específica del AM marcado.
- Afinidad del AM marcado.
- Profundidad del tumor respecto a la superficie corporal (Radiolocalización).
- Método de anclaje del radionúclido al AM:
  - . Metabolismo del Complejo Radionúclido-AM.
  - . Catabolismo del Complejo Radionúclido-AM.

Muchos de estos factores están interrelacionados. Así, por ejemplo, si se cambia la vía de administración de un determinado AM de intravenosa a intraperitoneal, puede ser preferible entonces utilizar la Ig G completa, en lugar del fragmento F(ab)'<sub>2</sub>. Igualmente, puede modificarse la dosis de inmunoglobulina o el tipo de radionúclido <sup>(63)</sup>.

Se han realizado muchos ensayos clínicos previos que emplean AM marcados, en los cuales se utilizaba únicamente una gammacámara para determinar la precisión del anclaje del tumor con el AM. En muchos casos, ha sido necesario emplear un segundo AM marcado para computar en último término la sustracción.

Podemos considerar la evaluación de un AM para su utilización en ensayos clínicos de la siguiente forma:



(\*) SDS PAGE : Sodiodecil sulfato poliacetilamida gel electroforesis

Las perspectivas futuras en el tratamiento del cáncer utilizando AM, son ciertamente alentadoras. En la mayoría de los casos, el objetivo es encontrar el antígeno que hace que la célula cancerosa sea distinta de las demás. Si se consiguiese identificar este antígeno, el AM podría ser portador de un agente terapéutico selectivo para una célula tumoral. Además, los propios AM per se, pueden conducir a la muerte de las células tumorales al desencadenar un ataque inmunológico sobre ellas. En general, el tratamiento de los tumores malignos por medio de AM puede, teóricamente, estar mediado por células efectoras, complemento, conjugación con toxinas o drogas, y desarrollo de inmunoglobulinas anti-idiotipo<sup>(63)</sup>.

Existen dos grandes razones por las que la conjugación radionúclido-AM merece especial atención, cuando se emplea con fines terapéuticos. La primera, es la heterogenicidad antigénica que se observa en muchas masas tumorales al emplear AM. En este sentido, las células cancerosas de un tumor dado que no expresen el antígeno contra el que va dirigido el AM portador de una droga antineoplásica, no se verán afectadas. Lo mismo sucede cuando el mecanismo de acción está mediado por células inductoras. En cambio, dado que los isótopos destructores (emisores alfa o beta) pueden ejercer su acción a distancias superiores a 50 o más diámetros celulares, no es necesario que el complejo radionúclido - AM se ligue a todas las células tumorales para que el efecto terapéutico sea suficiente. Además, estos complejos no son internalizados en la célula diana. En segundo lugar, muchos TAA son componentes estables de la membrana celular. Como comentamos anteriormente, los complejos antígeno tumoral - AM anclados en la superficie celular, no están internalizados. Como los complejos droga o toxina - AM pueden ser internalizados por la acción de células destructoras, el tratamiento resultaría ineficaz en estos casos.

Por otra parte, los conjugados radionúclido - AM pueden emplearse para el diagnóstico de un tumor in situ, antes de ser utilizados como instrumento terapéutico. Teniendo en cuenta que un mismo AM ligado con dosis altas del mismo o de diferente radionúclido, se puede emplear en ambos casos, podría definirse un Índice de Radiolocalización (RI) para un AM dado,

en un determinado paciente con una masa tumoral. Para ello, se puede utilizar el análisis de muestras de biopsia (cpm/g) y/o la valoración gammagráfica, tras la administración del conjugado diagnóstico. El RI se puede trasladar por medio de cálculos dosimétricos para establecer un Índice Terapéutico (TI) para un determinado AM y un determinado paciente<sup>(58)</sup>.

Cualquier intento para la utilización terapéutica de los AM es, ciertamente, una tarea difícil. Aunque los ensayos clínicos realizados sugieren que los AM pueden ser utilizados para destruir células cancerosas, ponen también de relieve muchos problemas que deben resolverse. Uno de los principales obstáculos que encontramos en cualquier tentativa para el inmunodiagnóstico y/o inmunoterapia del cáncer, es el fenómeno de la heterogenicidad antigénica. Recientes estudios han demostrado que esta heterogenicidad podría deberse, en gran medida, al proceso dinámico de la modulación antigénica. Así, el viraje on-off en la expresión de los antígenos tumorales, estaría relacionado con ciertos factores como las fases del ciclo celular, el medio ambiental o la configuración espacial de las masas tumorales<sup>(63)</sup>. Una aproximación a la solución de este problema sería el empleo de modificadores de la respuesta biológica o drogas que estimulen la expresión de antígenos tumorales en la superficie de las células cancerosas.

GREINER y cols<sup>(69)</sup>, han señalado, recientemente, que el tratamiento del cáncer de mama o de colon con leucocitos humanos recombinantes IFN - alfaA, incrementa la expresión de TAA reconocidos por AM. Como consecuencia, la unión del AM a la superficie de las células tumorales aumenta de forma dosis dependiente. La capacidad del Interferón recombinante para aumentar la expresión de los TAA en células cancerosas humanas muestra una dependencia temporal, con una elevación óptima después de 16-24 horas. Esta capacidad podría explotarse designando protocolos para la detección in situ, y posterior tratamiento, de lesiones cancerosas por medio de AM, así como para definir el papel de los TAA en la expresión del fenotipo transformado. Obviamente, la búsqueda de otros modificadores de la respuesta biológica es un objetivo crucial en futuras investigaciones.

Un factor importante que podría limitar las aplicaciones terapéuticas de los AM es la presencia de los denominados "Factores bloqueantes". Se trata de antígenos tumorales que se unen al anticuerpo en la sangre del paciente, y

de esta forma, impiden el anclaje a las células tumorales. Además, la unión de ciertos anticuerpos a dichas células hace que el antígeno al que van dirigidos desaparezca de la superficie celular. Esta modulación antigénica podría disminuir la efectividad de repetidas dosis de anticuerpo<sup>(58)</sup>.

Uno de los aspectos prioritarios de las investigaciones en este campo es el descubrimiento de AM humanos frente a TAA, con objeto de reducir al mínimo la reacción inmunológica que se produciría en el organismo ante la repetida infusión de proteínas séricas extrañas al mismo.

Es indudable que en las próximas décadas vamos a ser testigos de avances espectaculares en el terreno de la biología y genética molecular en un intento de lograr un tratamiento efectivo para el cáncer. Actualmente, se están gestando nuevas aproximaciones terapéuticas potencialmente útiles como son : a) la combinación de varios AM para tratar de solventar el problema de la heterogenicidad y modulación antigénica y b) el empleo de anticuerpos anti-idiotipo que implica la utilización de un AM frente a un TAA como inmunógeno para generar nuevos AM dirigidos contra el antígeno o región idiotípica del primer AM. Los sitios de anclaje de estos nuevos anticuerpos anti-idiotipo no serían el reflejo de una "imagen interna" del antígeno original. Además, estos anticuerpos podrían ser potencialmente útiles para la inmunización de pacientes en un intento de encontrar una respuesta inmunitaria activa contra las células tumorales<sup>(70)</sup>.

Finalmente, haremos referencia al empleo de los AM para establecer una orientación pronóstica en un paciente portador de una neoplasia. Se ha planteado la hipótesis de que las células tumorales menos diferenciadas metastatizan con más facilidad. Actualmente, el grado de diferenciación de un tumor se determina en base a criterios morfológicos e histológicos. Incluso, para algunos tumores como el cáncer de mama, la presencia o no de receptores estrogénicos tiene valor pronóstico. Sin embargo, parecen existir muchos cambios que pasas desapercibidos, bien sea en los niveles de proteínas o en los determinantes glicoproteicos que pueden proporcionar criterios más precisos sobre el grado de diferenciación de una masa tumoral. En este sentido, los AM pueden aplicarse para lograr un conocimiento más profundo sobre los siguientes aspectos<sup>(58)</sup>:

- Antígenos Asociados a Tumores (TAA)
- Productos de oncogenes y proto-oncogenes.
- Diferenciación de antígenos.
- Proteínas asociadas con el proceso metastásico (laminina o colagenasa tipo IV).
- Proteínas celulares normales o glucoproteínas cuyos niveles aumentan o disminuyen durante el proceso de dediferenciación y progresión precoz de la enfermedad.

### **3. EL ANTICUERPO MONOCLONAL B72.3 COMO MARCADOR TUMORAL**

### **3. 1 GLUCOPROTEINA ASOCIADA A TUMORES (TAG) - 72**

Aunque muchos AM se han generado a partir de antígenos tumorales conocidos, algunos Antígenos Asociados a Tumor (TAA), se han identificado por medio de AM, empleando extractos tumorales como inmunógeno. Este es el caso del AM murino B 72.3, que se obtiene empleando como antígeno una fracción enriquecida de membrana de un tumor mamario metastásico humano<sup>(71)</sup>. Dicho AM reconoce una nueva Glucoproteína Asociada a Tumor (TAG), denominada TAG-72<sup>(71,72)</sup>.

El Antígeno Asociado a Tumores (TAA), TAG-72, es una glucoproteína compleja de tipo mucina, de elevado peso molecular, que contiene gran cantidad de residuos de ácido siálico y oligosacáridos unidos por enlaces O-

glicosídicos<sup>(74)</sup>. Se ha sugerido que estos marcadores altamente glicosilados pueden ser reflejo de una alteración genética que condicione una síntesis proteica alterada.

Las lesiones metastásicas de cáncer de mama empleadas como inmunógeno para generar el AM B 72.3<sup>(71)</sup> proporcionan una rica fuente de antígeno, pero su limitada disponibilidad hace necesaria la búsqueda de una fuente alternativa y reproducible para poder llevar a cabo su caracterización. Se ha observado que, aunque el AM B 72.3 reacciona con un alto porcentaje de células de cáncer de colon y mama, <sup>(72,75)</sup> reacciona sólo con 1 de 18 líneas celulares de cáncer de colon, y 1 de 25 líneas celulares de cáncer de mama<sup>(73)</sup>.

Se ha demostrado recientemente que la línea celular de cáncer de colon denominada LS 174T <sup>(76)</sup>, expresa bajos niveles de TAG-72 cuando crece en cultivo. En cambio, cuando las células LS 174T se desarrollan como un injerto en ratones atímicos, muestran niveles de expresión antigénica 100 veces superiores, comparables a los obtenidos a partir de las masas metastásicas de carcinoma mamario. Esto se debe a que la configuración espacial tridimensional de dicha línea celular influye notablemente en la expresión de la TAG-72<sup>(73)</sup>. El estudio inmunohistológico de los injertos LS 174T, identifican los tumores como adenocarcinomas bien diferenciados, siendo reactivos con el AM B72.3 tanto los antígenos intracitoplasmáticos como la mucina extracelular. Esta distribución antigénica es similar a la encontrada en adenocarcinomas mucinosos de colon humano<sup>(74)</sup>.

Johnson y cols.<sup>(74)</sup>, en 1986, han llevado a cabo la caracterización y purificación parcial de la TAG-72 empleando la línea celular LS 174T como fuente del antígeno.

En el proceso de purificación de la TAG-72 podemos distinguir los siguientes pasos:

- 1.- En primer lugar, el homogeneizado tumoral es fraccionado por medio de cromatografía CL-4B sefarosa y,

- 2.- Posteriormente, es sometido a dos pasos secuenciales a través de columnas con afinidad por el AM B 72.3. En cada paso, del procedimiento, la TAG-72 es cuantificada por RIA, y el grado de purificación obtenido, se expresa como Cantidad de Antígeno / Unidades de proteína total.
- 3.- En el tercer paso del proceso, se efectúa la purificación del antígeno, de forma que exista la mínima contaminación posible por otras proteínas. Esto, se consigue a través de Electroforesis Gel Poliacrilamina (SDS-PAGE), seguido de tinción con azul Coomassie o Reactivo de Schiff que permite visualizar las proteínas en los geles. La densidad de la TAG-72, una vez purificada, se establece por ultracentrifugación de gradiente con Cloruro de Cesio, y se cifra en 1,45 g/ml <sup>(74)</sup>.

Las secuencias específicas de oligosacáridos de la TAG-72 se detectan por medio de AM <sup>(77)</sup> específicos de oligosacáridos de los grupos sanguíneos, como el B 72.3 y el CA 19.9 empleando una doble determinación analítica. Los geles son teñidos para carbohidratos mediante el reactivo de PAS <sup>(78)</sup>.

El análisis de la TAG-72 por medio de digestión enzimática, se utiliza para determinar la naturaleza del epítopo reactivo con el anticuerpo B 72.3.

La TAG-72 identificada por técnicas Western blot a partir de injertos LS 174T muestra un peso molecular que oscila entre 200.000 y  $1 \times 10^6$  daltons, superior al encontrado cuando se emplea como inmunógeno metástasis de cáncer mamario. La variabilidad de datos reseñados en cuanto al peso molecular puede ser reflejo de una fragmentación de la molécula debido a la técnica de extracción inicial <sup>(71)</sup>. Los procedimientos de purificación, no parecen modificar el rango del peso molecular obtenido. La tinción con azul Coomassie, puede emplearse para evaluar la pureza de la TAG-72 obtenida, ya que los componentes que aparecen teñidos con este colorante, están prácticamente ausentes en la preparación de TAG-72 purificada.

Por su estructura básica, la purificación de las mucinas, en general, plantea problemas específicos. Uno de sus componentes principales es el resultado de un enlace disulfuro entre subunidades de mucina altamente glicosiladas, para formar una estructura polimérica tridimensional. Además, interacciones intermoleculares no covalentes producen una malla amorfa de tipo gel. Es preciso colapsar esta estructura heterogénea para conseguir una molécula homogénea y reducir así el atrapamiento de impurezas. En el esquema del proceso de purificación, se incluyen numerosos pasos dirigidos específicamente a romper la matriz de mucina y prevenir la reasociación con proteínas contaminantes <sup>(79,80)</sup>.

Los datos obtenidos, sugieren que la molécula de TAG-72 es una mucina ya que :

- Tiene un elevado peso molecular (superior a  $1 \times 10^6$  daltons), como se ha demostrado por su exclusión de una columna CL-4B Sefarosa.
- Su densidad (1,45 g/ml) determinada por ultracentrifugación de gradiente en cloruro de cesio, indica que se trata de una glucoproteína fuertemente glicosilada.
- Es resistente a la digestión por la condroitinasa, por lo que el epitope de la TAG-72 no se expresa en un proteoglicano condroitín sulfato.
- Los oligosacáridos existentes en los grupos sanguíneos, que se encuentran comunmente en las mucinas, están también presentes en la TAG-72 purificada.
- Se ha demostrado un cambio en la migración de la TAG-72 tras la digestión por la neuraminidasa, indicando que es una molécula fuertemente sialilada, con abundantes enlaces O-glicosídicos, característicos de las mucinas<sup>(81)</sup>.
- La quimotripsina, la papaina y la pronasa, afectan al antígeno impidiendo su unión con el anticuerpo B 72.3.

- Tiene gran facilidad para ser fraccionada en formas de menor peso molecular.
- Contiene aproximadamente un 80 % de carbohidratos y tiene propiedades biofísicas y bioquímicas similares a las que presentan las mucinas de la mucosa cólica, gástrica y de intestino delgado, y se piensa que es un producto de secreción de las células epiteliales.

Posteriormente, Sheer DG y cols.<sup>(82)</sup> lograron una purificación más efectiva y a gran escala del antígeno TAG-72, de forma que obtuvieron una cantidad suficiente de material para poder realizar el análisis de su composición, su deglicosilación y determinación de la secuencia de aminoácidos.

No se conoce con certeza el origen de la TAG-72, siendo preciso realizar estudios más detallados. Se han planteado varias posibilidades:

- a) Puede representar un único producto génico,
- b) Una familia de múltiples productos genéticos.
- c) Una familia de moléculas que representan un único gen productor, que ha sido glicosilado diferencialmente.

### **3.2. EL ANTICUERPO MONOCLONAL B72.3**

El desarrollo y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a TAA, proteínas asociadas con procesos metastásicos, y productos oncogénicos ha experimentado un notable auge en estos últimos años en un intento de detectar y controlar los procesos cancerosos.

El anticuerpo monoclonal B72.3 es una IgG1 murina generada utilizando como inmunógeno fracciones enriquecidas de membrana procedentes de lesiones metastásicas hepáticas de carcinoma mamario humano<sup>(71)</sup>.

Dicho AM reconoce un epítopo de la molécula TAG-72, denominado CA 72<sup>(83)</sup>. La naturaleza exacta del epítopo o zona reactiva de la TAG-72 no se conoce con precisión. Existen algunos datos que hacen suponer que la porción peptídica de la molécula forma parte del mismo, o por lo menos afecta su integridad conformacional<sup>(74)</sup>. Sabemos que la digestión por neuraminidasa reduce notablemente la unión del antígeno al anticuerpo, lo que evidencia que el ácido siálico está relacionado con el determinante antigénico. La oxidación por la peroxidasa, también disminuye la unión con el anticuerpo, implicando en este caso al componente hidrocarbonado de la TAG-72. La digestión por papaina y pronasa reduce en un 75% la unión antígeno-anticuerpo como se ha podido demostrar por RIA competitivo, mientras que la condroitinasa no tiene efecto sobre la TAG-72, lo que demuestra que la zona reactiva no está relacionada con un protoglicano condroitín sulfato. Lo que sí parece cierto, es que la fracción glicolípida de la molécula no forma parte del epítopo CA 72. Es necesario llevar a cabo estudios más detallados para conocer la naturaleza exacta del mismo.

Diversos autores han analizado la reactividad del AM B72.3 frente a un amplio espectro de neoplasias, lesiones benignas y tejidos adultos normales<sup>(72,75)</sup> empleando diversos procedimientos: RIA, métodos inmunohistoquímicos (Tinción ABC inmunoperoxidasa), y métodos inmunocitoquímicos. El material analizado varía según el procedimiento utilizado en el estudio. Así, puede tratarse de suero o plasma, muestras de biopsia fijadas en formol e incluidas en parafina, muestras obtenidas por PAAF y citología exfoliativa, líquidos orgánicos y tejidos congelados.

Se ha estudiado la expresión de la TAG-72 en numerosos tejidos adultos normales, no apreciando datos significativos, con excepción del endometrio en fase secretora<sup>(84)</sup>, lo que sugiere que las hormonas podrían estar implicadas en su expresión. Así mismo, se expresa debilmente en algunas lesiones benignas de colon como la colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, y de mama (metaplasia apocrina)<sup>(85)</sup>.

Por otra parte, se han detectado niveles elevados de TAG-72 en esófago, estómago y colon fetales, considerándose como un antígeno oncofetal. En este sentido, se está llevando a cabo una nueva caracterización de la expresión fetal de la TAG-72, en diferentes edades gestacionales, con el fin de proporcionar una mejor comprensión de la función del mismo en distintos estadios de la diferenciación celular <sup>(74)</sup>.

Mediante estudios inmunohistoquímicos, se ha demostrado que el AM B72.3 es reactivo con un 50 % de los carcinomas de mama <sup>(72,86)</sup> y un 85 % de carcinomas de colon <sup>(75)</sup>. Posteriormente, se ha apreciado que el antígeno TAG-72 se expresa en la mayoría de los tumores derivados del epitelio, incluyendo el 96 % de los carcinomas de pulmón de célula no pequeña, el 100% de los tumores epiteliales de ovario, así como la mayor parte de los cánceres gástricos, esofágicos y pancreáticos estudiados, mientras que no es reactivo con tumores de origen neural, sarcomas y tumores hematológicos. Por ello se ha considerado como un antígeno pancarcinoma <sup>(58,85)</sup>.

Thor y cols <sup>(85)</sup> han establecido las condiciones óptimas para determinar la expresión de la TAG-72 en neoplasias de diverso origen, así como en lesiones benignas y tejidos adultos normales empleando métodos inmunohistoquímicos (ABC-Inmunoperoxidasa). El AM B72.3 se hace reaccionar con los distintos tejidos empleando concentraciones de anticuerpo, tiempo de incubación y temperatura diferentes. Demostraron que con una incubación de 12-14 horas a 4°C se incrementa el porcentaje de reactividad celular sin que ello conlleve la aparición de reactividad en células normales adyacentes, vasos, estroma, etc. Como control negativo emplearon un isotipo idéntico de B72.3, el AM IgG1 murino denominado MOPC-21. No se utilizaron concentraciones de B72.3 superiores a 40 microg/ml, ya que el anticuerpo control a concentraciones iguales o superiores a 50 microg/ml reacciona de forma inespecífica con tinción de epitelio normal y de estroma.

En el caso concreto de los carcinomas de colon, el 94% mostraron reactividad con el AM B72.3, y de ellos el 41% presentaban al menos un 25% de células con expresión de TAG-72. No se observó correlación con el estadio de Dukes, afectación linfática o grado histológico. Los carcinomas mucinosos y en anillo de sello mostraron una reactividad equivalente. En

cuanto al carcinoma ductal invasivo primario de mama, el 86% expresaba el antígeno, aunque solamente un 27% contenía un porcentaje de células reactivas igual o superior al 25%. Tampoco se observó correlación con el grado histológico, afectación linfática o presencia de receptores estrogénicos. En ambos tipos de tumores, se encontró una notable heterogenicidad antigénica, tanto en las lesiones primarias como metastásicas.

Para evaluar la posibilidad de que el antígeno TAG-72 se desnaturalizara por la fijación con formol y procesado de los tejidos, se han estudiado secciones tisulares de 5 microm fijadas en acetona fría y, posteriormente, incubadas con B72.3 a una concentración de 40 microg/ml. No se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la reactividad, lo que evidencia que el *determinante antigénico no experimenta alteraciones durante el procesado habitual de los tejidos*<sup>(85)</sup>.

La falta de detección del antígeno TAG-72 en el suero de algunos pacientes con cáncer de colon y mama es un hecho observado con relativa frecuencia, mientras que el análisis inmunohistoquímico es positivo en dichos pacientes. Esta discordancia suero tejido ha sido reseñada recientemente por diversos autores<sup>(87)</sup> y podría estar relacionada con la sensibilidad del análisis empleado, ya que existen numerosos sistemas de RIA que se utilizan de forma habitual en el *screening* sérico de pacientes con cáncer<sup>(64)</sup>, o deberse a alguna característica peculiar de la célula tumoral<sup>(88)</sup>. Otros autores<sup>(89)</sup> plantean la posibilidad de que algunos antígenos puedan ser secretados por una células y retenidos por otras. También podría tratarse de una proteína asociada a membrana que se detecta por tinción inmunohistoquímica, pero que no es liberada a la circulación general.

Por otra parte, se ha observado la existencia de heterogenicidad antigénica en la expresión de la TAG-72 entre las células de un determinado tumor primario, así como entre lesiones metastásicas regionales y a distancia<sup>(60)</sup>. No se ha encontrado correlación entre la localización de las metástasis y el porcentaje de células que expresan el antígeno.

Además del análisis sérico por RIA y de los métodos inmunohistoquímicos, el AM B72.3 se ha utilizado como instrumento de diagnóstico inmunocitológico para detectar células tumorales en lavados peritoneales de pa-

cientes con carcinoma de ovario <sup>(90)</sup>, en preparaciones citológicas de líquidos orgánicos (derrames pleurales en cáncer de mama, ovario y pulmón, ascitis), así como en biopsias de masas tumorales por PAAF. Los resultados en lo referente a la inmunoreactividad de las células obtenidas por PAAF, son equivalentes a los señalados a partir de tejidos resecados quirúrgicamente <sup>(91,92,93)</sup>. Szpak y cols, señalan una reactividad del 92% para adenocarcinoma en derrames pleurales, sin reactividad asociada de células mesoteliales o inflamatorias<sup>(94)</sup>.

El papel de los lavados peritoneales en la valoración de las neoplasias ginecológicas es importante no sólo en los tumores ováricos, sino también en adenocarcinomas de endometrio, tumores mullerianos mixtos de útero y carcinoma escamoso de cervix, donde el hallazgo de células malignas en el líquido peritoneal tiene valor pronóstico.

Actualmente, se están llevando a cabo investigaciones sobre la utilidad de los lavados peritoneales en la detección precoz de metástasis de tumores del tracto gastrointestinal. Sin embargo, debido a que los lavados peritoneales no son muestras de fluidos acumulados, y no se asocian necesariamente a enfermedad metastásica diseminada, la celularidad es escasa. Además, puede contener células exfoliadas benignas, células inflamatorias o células mesoteliales reactivas que pueden inducir a errores de interpretación. Por otra parte, no se han establecido criterios citológicos válidos para la evaluación de células malignas en lavados peritoneales cuando el tumor primario es un tumor ovárico seroso o mucinoso de baja malignidad. La interpretación de todos los constituyentes celulares en estos lavados, depende de la historia clínica, hallazgos operatorios y del tipo histológico de la neoplasia.

La utilidad real del AM B72.3 como instrumento diagnóstico reside no sólo en su capacidad para reaccionar con la mayoría de los adenocarcinomas que metastatizan en la cavidad peritoneal, sino también para confirmar si se trata o no de un proceso benigno <sup>(91)</sup>. Szpak, señala una sensibilidad del 91% y una especificidad del 98% <sup>(94)</sup>. Así pues, la expresión de TAG-72 puede ser una característica útil del tumor, ya que la administración intraperitoneal del AM marcado con el radionúclido apropiado, podría servir para detectar implantes epiploicos tras cirugía tumoral reductora. No obstante, hay que tener en cuenta que focos de endometriosis o fragmentos de endometrio

en la cavidad peritoneal pueden reaccionar con el B72.3 y dar resultados falsos positivos.

Otro aspecto de gran interés, es el empleo del AM B72.3 en el diagnóstico diferencial de determinadas patologías malignas, que habitualmente plantean serios problemas diagnósticos en la práctica clínica habitual. Tal es el caso de los mesoteliomas malignos y adenocarcinomas de pulmón. Diversos autores, han estudiado la expresión del determinante antigénico TAG-72 en estos dos tipos de tumor, no encontrando prácticamente reactividad en los mesoteliomas, donde solamente un 1% de las células tumorales fueron inmunoreactivas frente al 10% del adenocarcinoma de pulmón. También es útil para el diagnóstico diferencial entre carcinoma de pulmón de célula pequeña y no pequeña <sup>(95)</sup>.

El AM B72.3 puede también tener utilidad en la radiolocalización y/o radioterapia de diferentes lesiones tumorales. En este sentido, la IgG1 ha sido purificada, y se ha demostrado que puede marcarse con  $I^{125}$  o  $I^{131}$  sin perder su reactividad frente a extractos tisulares tumorales. Se han llevado a cabo estudios experimentales que ponen de manifiesto la capacidad del AM B72.3 marcado con  $I^{131}$  para localizar injertos de carcinoma de colon en ratones atómicos <sup>(96)</sup>. Las imágenes obtenidas con una gammacámara confirman la capacidad de dicho AM para detectar lesiones de diámetro inferior a 0,5 cm. El complejo IgG B72.3- $I^{131}$  permanece ligado al tumor de forma estable durante días. A raíz de estos ensayos, se han iniciado estudios para definir la localización específica de un tumor por medio de la administración intravenosa de IgG B72.3- $I^{131}$  a pacientes con carcinoma colorrectal <sup>(97)</sup>. Los datos se obtienen directamente por análisis de muestras de biopsia (del tumor y de tejidos normales extirpados para el estudio) de pacientes con carcinoma colorrectal metastásico. Los índices de radiolocalización se determinan en función del cociente  $I^{131}$  cpm/g de tumor versus  $I^{131}$  cpm/g de tejido normal. Los resultados del *scan* deben perfeccionarse en estudios posteriores por varias razones. En primer lugar, el  $I^{131}$  es un mal agente gamma explorador, ya que las gammacámaras no fijan emisiones de  $I^{131}$ . Los radionúclidos  $In^{111}$ ,  $Tc^{99m}$  o  $I^{123}$  son más eficaces para este propósito. En segundo lugar, se emplea IgG no fraccionada, y no se utiliza un segundo anticuerpo como ayuda para sustracción de fondo. Este es un parámetro sumamente importante, ya que

durante el tiempo del *scanning*, entre un 10% y un 25% de la dosis total inyectada del AM marcado está aún en circulación y puede oscurecer la zona donde se localiza el tumor en regiones altamente vascularizadas <sup>(97)</sup>.

Algunos autores emplean AM B72.3 marcado como guía intraoperatoria para la localización de metástasis en pacientes con carcinoma colorectal<sup>(98)</sup>. Recientemente<sup>(99)</sup>, se está utilizando B72.3-I<sup>131</sup> administrado intraperitonealmente para la detección de metástasis intraabdominales de carcinoma colorectal y ovárico. Posteriormente, se ha empleado B72.3 doblemente marcado. Es decir, IgG-I<sup>131</sup> administrada por vía intraperitoneal simultáneamente con IgG-I<sup>125</sup> intravenosa. Las imágenes de scan de estos pacientes pueden poner de manifiesto lesiones que pasarían inadvertidas con Tomografía Computerizada (TAC) o radiología convencional en aproximadamente un 20-30% de los casos. Los índices de radiolocalización empleando B72.3 doblemente marcado, respecto a los tejidos normales son de 50:1 versus 5:1. Un estudio intraoperatorio con gammacámara efectuado tras la administración del AM marcado, ha demostrado su fijación en un 70-80% de las lesiones tumorales reflejando su capacidad para detectar un tumor oculto intraoperatoriamente <sup>(98)</sup> en aproximadamente un 20% de pacientes, que de otra forma serían indetectables.

Otra posible aplicación es la inmunoscintigrafía con B72.3 marcado en el seguimiento de pacientes intervenidos por carcinoma colorectal <sup>(100)</sup>.

Aunque se requiere una mayor experimentación para optimizar la utilización del AM B72.3 en este campo, los datos preliminares han demostrado claramente la capacidad de este AM para unirse selectivamente a tumores de colon in vivo, y abren una vía potencial para su empleo terapéutico. El anclaje de los AM a isótopos que decaen por transferencia de energía, con radiación de corto alcance, que puede conducir a la destrucción no sólo de las células tumorales que expresan el TAA, sino también de células tumorales vecinas que no lo expresan. Otra posibilidad, es la administración de agentes tales como el interferón alfa recombinante para estimular la expresión de los TAA antes de administrar el AM.

### **3.3. ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LA TAG-72 DE PRIMERA Y DE SEGUNDA GENERACION**

Como hemos comentado en capítulos anteriores, la TAG-72 es una glucoproteína tipo mucina de elevado peso molecular, que es reactiva con el AM B72.3. Numerosos estudios han demostrado que este antígeno pancarcinoma es diferente, tanto desde el punto de vista bioquímico e inmunológico, como en su expresión, del CEA y de otros TAA detectados por diferentes AM, tales como el CA 19.9, 17-1A, CA 125, DUPAN 2, DF3 y AM antiglobulinos grasos de la leche materna <sup>(85,101)</sup>.

Aunque el AM B72.3 es reactivo con la mayoría de las muestras de biopsia de carcinomas humanos, no lo es o débilmente con líneas celulares tumorales en cultivo. Los estudios de Friedman y cols <sup>(102)</sup>, han demostrado que las biopsias en fresco de cáncer de colon humano colocadas en cultivo

monoplaca, pueden comenzar a perder su unión con el anticuerpo al pasar el tiempo. Este hecho, en principio, no sería atribuible a un fenómeno de selección celular.

La línea celular de cáncer de colon LS 174T, es una de las dos líneas celulares, entre 40 estudiadas, que ha resultado positiva para valorar la reactividad frente al AM B72.3. Horan Hand y cols.<sup>(60,73)</sup> han puesto de manifiesto que la configuración espacial tridimensional de estas poblaciones celulares, tiene notable repercusión sobre la expresión de la TAG-72, bien ampliándola en células que ya expresaban el antígeno, o bien induciendo su aparición en una subpoblación de células tumorales antes negativas. La heterogenicidad y modulación antigénicas son factores permisivos, operativos tanto *in vitro* como *in vivo*, que pueden tener profundas implicaciones en la utilización clínica de los AM.

Debido a que la TAG-72 se localiza en la superficie celular, y puesto que su expresión está marcadamente estimulada por el contacto intercelular, se piensa que este antígeno podría desempeñar una función a nivel de la adhesión de las células tumorales entre ellas y/o con un sustrato. Factores tales como la vascularización, localización del tumor, y otros factores ambientales, pueden estar también implicados en la modulación antigénica. Así, se ha observado que cuando los cultivos celulares se colocan en agar o se desarrollan en forma de esferoides, la unión con el anticuerpo se incrementa. Igualmente, se ha señalado un aumento del doble en la expresión de la TAG-72 cuando las células LS-174T crecen en un gel adherente (colágeno tipo I). Si estas células se injertan en ratones atímicos, la unión al B72.3 es cien veces mayor.

Todas estas observaciones apoyan la idea de que una línea celular establecida no puede reflejar con exactitud las características antigénicas del tumor original o del tejido del cual deriva. Por ello, el material de biopsia sería más favorable que las líneas celulares como fuente de inmunógeno para la obtención de algunos AM.

Muraro y cols.<sup>(101)</sup>, han conseguido purificar la TAG.72 para emplearla luego como inmunógeno en la obtención de una segunda generación de AM. Debido a que la fuente para la obtención de la TAG-72 purificada es un

injerto de cáncer de colon humano, estos anticuerpos se designan con las letras CC.

El proceso de selección de los 2.567 hibridomas iniciales, se realiza en base a su reactividad con lesiones tumorales versus tejidos normales. De los 99 cultivos seleccionados por doble clonación, solamente 28 AM CC, todos ellos IgG, mostraron reactividad significativa frente a la TAG-72 purificada. Mediante RIA y técnicas inmunohistoquímicas, 9 AM CC fueron seleccionados en base a su reactividad frente a carcinomas/tejidos normales, y a su elevada constante de afinidad ( $K_a$ ). La determinación de las  $K_a$  de estos AM (AM CC 15, 29,30,40,49, 83 y 92) permite diferenciarlos entre si y del B72.3 cuya  $K_a$  es de  $2,54 \times 10^9 M^{-1}$ , muy inferior a la de los AM CC. Es probable que uno o más AM CC anti TAG-72 puedan tener mayor utilidad clínica que el B72.3, ya sea solos o en combinación con este último para estudiar poblaciones de células tumorales humanas. Actualmente, se están realizando diversos estudios con el fin de valorar el empleo de los AM CC para el diseño de mapas de epitopos de la TAG-72, y definir la naturaleza de los mismos.

Sagredo y cols.<sup>(103)</sup> utilizando un método inmunoradiométrico (IRMA) con dos AM (B72.3 y CC49), han analizado el comportamiento de la TAG-72 en el suero de pacientes portadores de patologías no tumorales. Las elevaciones antigénicas encontradas fueron escasas, y señalan una cifra de 6,5 U/ml que podría ser utilizada como umbral de actividad en la práctica clínica. En esta misma línea de investigación, otros autores<sup>(82)</sup> han seleccionado también el AM de segunda generación CC49 por tener una mayor  $K_a$  para la TAG-72 ( $16 \times 10^9 M^{-1}$ ). En este sentido, desarrollaron un procedimiento para producir la suficiente cantidad de antígeno purificado que permita analizar su composición y definir su secuencia de aminoácidos, que resulta ser similar a la de otras mucinas. Para ello, injertos de la línea celular LS-174T en ratones atímicos son solubilizados con diferentes agentes y tratados con ácido perclórico. El antígeno hidrosoluble se hace reaccionar con el AM CC49 por medio de cromatografía de intercambio iónico.

Recientemente, se están llevando a cabo nuevas líneas de investigación. Así, Colcher y cols.<sup>(104)</sup> han seleccionado seis AM CC para estudiar su anclaje in vivo a un injerto de carcinoma de colon humano. Todos estos AM

son distintos de B72.3 en cuanto al epitopo de la molécula TAG-72 al que se unen, como ha podido demostrarse tras complejos procedimientos de RIA de competición recíproca. El hecho de que los AM CC sean capaces de localizar estos injertos tumorales con mayor precisión que el B72.3 se ha atribuido a diversos factores como:

- Su mayor  $K_a$ ,
- La cantidad de epitopo reconocido por el tumor,
- La accesibilidad del epitopo en la superficie de la célula tumoral, que puede ser diferente de la que muestra el antígeno purificado a partir de un extracto tumoral.
- Otro factor que puede afectar a la biodistribución de un AM, dando lugar a diferencias en los RI o en el porcentaje de la dosis inyectada por gramo (ID) es la tasa de aclaramiento del AM del plasma. Los AM CC han demostrado tener algunas variaciones en sus patrones de aclaramiento. Así, el AM CC49 presenta un patrón único, mucho más rápido que el B72.3 y los otros 5 AM CC estudiados. Como consecuencia de ello, el índice tumor/sangre es mucho mayor para el CC49. Igualmente, los índices tumor/tejidos normales del CC49 son diferentes de los obtenidos con otros AM.
- Otra posible aplicación es que el AM CC49 reconoce un epitopo de la TAG-72 que es más accesible cuando el antígeno está circulante, y el complejo AM- TAG-72 resultante se deposita en órganos como el hígado y el bazo, disminuyendo el RI a este nivel, mientras que el AM es rápidamente aclarado de la sangre.

## **4. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS**

## JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Las neoplasias constituyen un problema diagnóstico de primer orden en el aparato digestivo con importantes repercusiones socioeconómicas. A pesar de los grandes progresos realizados en este sentido en las últimas décadas, no se ha conseguido mejorar de una forma evidente la supervivencia de las más frecuentes. Ello se debe, en gran medida, a que los procedimientos diagnósticos disponibles no resultan útiles o prácticos para la detección precoz de la lesión inicial o de su recidiva después de la extirpación quirúrgica, y los resultados son poco alentadores en términos de curación de la enfermedad.

Em empleo del hibridoma como técnica de generación de anticuerpos monoclonales ha facilitado la identificación de nuevos Antígenos Asociados a Tumores (TAA) abriendo una nueva era en la historia de los marcadores tumorales. Debido a su poca especificidad, los marcadores tumorales empleados hasta el momento actual en las neoplasias digestivas no son útiles como método de *screening* general, aunque pueden emplearse para la detección de recidivas o para el control del tratamiento. La búsqueda de marcadores que permitan detectar la neoplasia en una fase inicial de su desarrollo es una de las áreas de investigación de más interés en oncología.

En el momento de iniciar nuestro estudio en 1990, existían pocos datos acerca de la utilidad del anticuerpo monoclonal B72.3. En los primeros trabajos publicados sobre el comportamiento de la glucoproteína TAG-72 definida por el B72.3, se evidenció una elevada expresividad en neoplasias derivadas del epitelio. En base a estos prometedores resultados, nos propusimos valo-

rar la utilidad clínica de la determinación sérica del B72.3 en neoplasias de origen digestivo planteándonos los siguientes objetivos:

- 1.- Conocer el comportamiento de la TAG-72 en el suero de sujetos sanos, y la influencia de diversos factores como la edad, sexo y hábito tabáquico sobre sus concentraciones séricas y, al mismo tiempo, establecer nuestro Límite Superior de Normalidad (LSN).
- 2.- Determinar las concentraciones séricas del B72.3 en pacientes portadores de distintas patologías no tumorales para conocer si el marcador se eleva en alguna de ellas y lograr identificar un segundo Dintel de Actividad Clínica (DAC).
- 3.- Conocer el comportamiento del B72.3 sérico en pacientes con patologías tumorales digestivas y establecer su posible correlación con el estadio clínico, localización del tumor y grado de diferenciación.
- 4.- Estudiar la utilidad del B72.3 en el seguimiento postoperatorio de neoplasias digestivas mediante determinaciones séricas seriadas del marcador determinando así su valor para detectar precozmente recidivas tumorales.
- 5.- Comparar los resultados de B72.3 sérico con los del CEA en los diferentes tumores digestivos estudiados con el fin de concretar qué puede aportar aquel a la práctica clínica.
- 6.- Estudiar la significación pronóstica de la expresión sérica de la TAG-72 en las neoplasias digestivas más frecuentes, valorando la posible relación entre las concentraciones séricas preoperatorias del marcador con la Supervivencia Libre de Enfermedad (TLE) y la supervivencia total.

## **5. PACIENTES Y METODOS**

## 5.1 PACIENTES

Hemos examinado 1.385 muestras de pacientes procedentes del Hospital General de Asturias (HGA), Hospital de Jove y Hospital de Cabueñes, que fueron analizadas en el laboratorio del Servicio de Medicina Nuclear del HGA.

El grupo control estaba integrado por 109 donantes de sangre HBsAg negativos, con edades comprendidas entre los 20 y 60 años. De ellos, 72 eran varones y 33 mujeres. Se estudió el hábito tabáquico, siendo 53 no fumadores y 56 fumadores (> 20 cigarrillos/día).

El grupo de patologías benignas estaba formado por 904 pacientes, de los que 458 eran portadores de patologías digestivas y 446 no digestivas.

Los 458 casos de patologías digestivas se distribuyeron de la siguiente manera:

GASTROINTESTINALES	157
. Enfermedad de Crohn	17
. Colitis ulcerosa	35
. Ulcus péptico GD	32
. Gastritis/esofagitis	22

. Poliposis colon	21
. Apendicitis aguda	7
. Diverticulosis colon	21
. Obstrucción intestinal	2
<b>HEPATOPATIAS</b>	<b>143</b>
. Cirrosis Hepática	107
. Hepatitis Aguda	18
. Portadores HBsAg	18
<b>PANCREATITIS</b>	<b>56</b>
. Agudas	35
. Crónicas	21
<b>BILIARES</b>	<b>102</b>
. Colecistitis	69
. Cole-coledocolitiasis	33

Los 446 pacientes con patologías no digestivas se distribuyeron de la siguiente forma:

<b>GINECOLOGICAS</b>	<b>108</b>
. Quistes Ovario	54
. Endometriosis	46
. Mioma uterino	6
. Adenoma Endometrio	2
<b>MASTOPATIAS</b>	<b>121</b>
. MFQ	111
. Fibroadenoma	9
. Ginecomastia	1

I.R.C	69
RESPIRATORIAS	72
. EPOC	33
. Neumonía	14
. TBC activa	6
. TBC residual	10
. Asma	4
. Neumotorax	5
PIEL	27
. Sinus pilonidal	25
. Hemorroides	2
PARED	5
. Hernia inguinal	2
. Eventración	3
EAI	22
. Lupus eritematoso diseminado	
. Artritis reumatoide	
. Esclerodermia	
. Anemia Hemólítica autoinmune	

Dentro de la patología maligna. centramos nuestra atención en las neoplasias de origen digestivo. Incluimos 372 pacientes que se distribuyen de la siguiente manera :

## ADENOCARCINOMAS COLORRECTALES 222

. Estadio A de Dukes	17
. Estadio B de Dukes	101
. Estadio C de Dukes	70
. Estadio D de Dukes	33

## ADENOCARCINOMAS GASTRICOS 88

. Estadio I (TNM)	21
. Estadio II	14
. Estadio III	39
. Estadio IV	9

## CA. EPIDERMOIDES DE ESOFAGO 43

. Estadio I (TNM)	2
. Estadio II	11
. Estadio III	15
. Estadio IV	15

## ADENOCARCINOMAS DE PANCREAS 19

. Estadio I (TNM)	7
. Estadio II	1
. Estadio III	7
. Estadio IV	4

En todos los casos, se realizaron determinaciones séricas pre y postoperatorias del marcador B72.3, y de otros marcadores como el CEA. En el seguimiento postoperatorio, entendemos por **remisión** la no evidencia de enfermedad (NDE), por **actividad** la presencia de recidiva locoregional y por **progresión** la existencia de metástasis a distancia. La clasificación por estadíos se ha realizado utilizando el sistema TNM, excepto en el cancer colorrectal donde empleamos la clasificación de Dukes<sup>(105,106)</sup>.

## **5.2. METODO**

### **5.2.1. METODO ANALITICO**

Describimos a continuación el procedimiento empleado para el análisis cuantitativo de la Glucoproteína Asociada a Tumor - 72 (TAG-72) en muestras de suero, definida por el Anticuerpo Monoclonal B72.3. Hemos empleado los Kits para dosificación inmunoradiométrica (IRMA), gentileza de los laboratorios SORIN-ITALIA, cuyo límite inferior de sensibilidad fue de 3 U/ml.

#### **\* Principios del análisis**

La dosificación se basa en un método inmunoradiométrico competitivo, empleando esferas cubiertas y sensibilizadas con anticuerpo. Para ello, se utiliza IgG B 72.3 monoclonal fijada a las esferas, e IgG B 72.3 monoclonal marcada, como trazador.

El método consiste en una sola incubación durante la cual, el antígeno TAG-72 contenido en las muestras se liga al trazador en la fase sólida. Al final de la incubación, el material no ligado se extrae por aspiración y lavado. Al terminar el proceso, la cantidad de AM B 72.3 marcado, ligado a la fase sólida, es proporcional a la cantidad de TAG-72 presente en las muestras. Todos los reactivos se conservan a una temperatura óptima entre 2 y 8 °C.

#### **\* Composición y preparación de los reactivos**

- 1.- ESFERAS CUBIERTAS: 100 esferas de poliestireno sensibilizadas con IgG monoclonal de tipo B 72.3 anti TAG-72.
- 2.- TRAZADOR: el reactivo está constituido por una solución que contiene 12 ml de IgG monoclonal de tipo B 72.3 marcado con  $I^{125}$  junto con sustancias *buffer*, proteínas, estabilizantes y conservantes. La radioactividad máxima es de 777 KBq (21 alfaCi), establecida en el momento en que se efectuó la calibración.
- 3.- TAG-72 STANDARD: Cada vial está constituido por una solución que contiene TAG-72 standard, suero humano y conservantes. Las concentraciones de TAG-72 son las siguientes: 3, 5, 40, 100 U/ml. El vial standard contiene 6 ml, y se emplea para la dilución de la muestra. Los otros 3 viales contienen 1 ml.
- 4.- SUERO CONTROL: El vial contiene 1 ml de TAG-72, suero humano y conservantes.
- 5.- MATERIAL ACCESORIO NECESARIO:
  - Contador Gamma
  - Sistema automático de lavado esférico PLA 2
  - Sistema de distribución del líquido de lavado (como la Bomba GOMAN-RUPP modelo 14696 o equivalente) con bomba de vacío.
  - Micropipetas con extremos desechables.
  - Dispensador de esferas (MEDI 578) o pinzas no metálicas.

#### **\* Recogida y preparación de la muestra**

La dosificación puede realizarse en suero o plasma. Las muestras no deben estar hemolizadas, ni contener material en suspensión. Si la dosificación se efectúa dentro de las 24 horas de la extracción de las muestras, éstas deben conservarse a 2-8°C. En caso contrario, deben congelarse a -20°C, evitando repetir la descongelación de las muestras.

Si se preveen concentraciones de TAG-72 superiores a 100 U/ml, es necesario diluir las muestras con el standard 1, en proporción 1/10 o 1/100.

#### **\* Procedimiento operativo**

Antes del ensayo, los reactivos se conservan a temperatura ambiente (20-25°C). Es necesario llevar a cabo todas las fases del procedimiento sin interrupción.

Se emplean pipetas monouso para repartir cada muestra y el vial standard, y se identifican los pozos de las cubetas de reacción con etiquetas para todos los reactivos y muestras. La dosificación se lleva a cabo, en todos los casos, por duplicado.

Se realizan los siguientes pasos:

- 1.- Distribuir 100 microl de standard, suero control y muestras dentro de sus respectivos pocillos. Distribuir 100 microl de trazador en todos los pocillos.
- 2.- Distribuir una esfera en cada pozo para cada una de las muestras a examinar, con el dispensador fijado en el extremo del vial.
- 3.- Recubrir el pozo con un cartón autoadhesivo para evitar la vaporización. Agitar suavemente la cubeta de reacción para eliminar eventuales burbujas de aire. Asegurarse de que las esferas están completamente cubiertas por el líquido.
- 4.- Incubar la cubeta de reacción 18-22 horas a 2 - 8°C.
- 5.- Al finalizar la incubación, se elimina el cartón autoadhesivo. Se aspira el líquido y se lava repetidamente cada pozo y esfera con un volumen total de agua desionizada. Hay que evitar el rebozamiento del líquido de las cubetas de reacción. Asegurarse de la

completa eliminación del agua adherida a la cubeta, pozos o esferas.

6.- Transferir las esferas desde los pozos de reacción a las probetas convenientemente identificadas. Se invierte el portaprobetas sobre la cubeta de reacción y se fijan las probetas sobre los pozos, de forma que las esferas queden dentro de los tubos.

7.- Se mide la radioactividad de las esferas.

Se calcula la media del recuento para cada grupo de probetas, después de haber sustraído el valor del fondo. Se establece una curva de calibración señalando en las ordenadas los cpm medios obtenidos para cada standard, y en las abscisas, las correspondientes concentraciones de TAG-72.

Directamente desde la curva de calibración, se obtiene la concentración de TAG-72 de cada muestra, expresada en U/ml. Si la muestra está diluida, la concentración encontrada en la misma debe corregirse mediante el Factor de dilución, considerando el valor en U/ml del standard.

La fórmula aplicada es la siguiente:

$$S = X - \frac{n-1}{n} y n$$

donde:

S = concentración de la muestra estudiada, en U/ml.

X = concentración leída en la curva, en U/ml.

y = concentración del standard 1, en U/ml

n = factor de dilución ( n=2 para una dilución 1:2)

### 5.2.2. METODO ESTADISTICO

La significación estadística de las asociaciones entre los diferentes factores individuales y la expresión sérica del antígeno TAG-72 fue evaluada utilizando la prueba del CHI-cuadrado. Un modelo de regresión logística multivariante (BMDPPR) fue también empleado para evaluar simultáneamente la influencia de más de un factor sobre dicha expresión antigénica.

Debido a que los valores séricos del B72.3 no siguen una distribución *gaussiana*, al no ser una población normal, se ha empleado el test no paramétrico de Mann-Witney para evaluar las diferencias entre los niveles séricos del marcador en los distintos grupos de pacientes.

Para estudiar la relación existente entre más de dos grupos, se utilizó el análisis no paramétrico de varianza de Kruskal-Wallis<sup>(107)</sup>.

Las curvas del tiempo libre de enfermedad (TLE) y de supervivencia fueron establecidas por el método de Kaplan-Meier<sup>(108)</sup>, y comparadas con el test de log-rank<sup>(109)</sup>. El análisis de Regresión Logística de Cox<sup>(110)</sup> fue también utilizado para examinar las diferentes combinaciones e interacciones de los factores pronósticos en un análisis multivariante.

El nivel de significación establecido fue del 95 % ( $P < 0,05$ ).

## **6. RESULTADOS**

## 6.1. CONTROLES

El grupo control estuvo constituido por 109 donantes de sangre HBs Ag negativos, 72 varones y 33 mujeres, con edades comprendidas entre los 20 y 60 años, siendo la media de 39,4 años.

Las concentraciones séricas del antígeno (ver TABLA 1) oscilaron entre 3 y 8,1 U/ml, con una media de  $3,34 \pm 0,79$ , y una mediana de 3 U/ml.

Hemos considerado como LSN (Límite Superior de Normalidad) inicial la cifra de 6 U/ml, que representa el 97,5 percentil.

Se estudió la influencia del hábito tabáquico con 53 no fumadores y 56 fumadores (> 20 cigarrillos/día), sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas (TABLA 2) en las concentraciones del marcador. Tampoco se constataron en relación al sexo (TABLA 3).

**TABLA 1. Niveles de B72.3 sérico en controles**

B72.3 U/ml				
Nº CASOS	INTERVALO	MEDIANA	MEDIA	D.STANDARD
109	3 - 8,1	3	3,24	0,79
$X + 2dx = 4,9 \text{ U/ml}$ $\text{LSN} = 6 \text{ U/ml (97,5 percentil)}$				

**TABLA 2. Niveles de B72.3 sérico según el hábito tabáquico**

B72.3 U/ml					
FUMAR	Nº CASOS	INTERVALO	MEDIANA	MEDIA	D. STANDARD
SI	56	3 - 8,1	3	3,17	0,71
NO	53	3 - 7,0	3	3,31	0,87

**TABLA 3. Niveles de B72.3 sérico según el sexo**

B72.3 U/ml					
SEXO	Nº CASOS	INTERVALO	MEDIANA	MEDIA	D.STANDARD
V	76	3 - 8,1	3	3,30	0,92
H	33	3 - 4,5	3	3,09	0,31

## 6.2. PATOLOGIAS BENIGNAS

El análisis de las concentraciones de B72.3 sérico en las 904 patologías benignas estudiadas mostró los resultados que se expresan en la TABLA 4. El valor medio de B72.3 sérico fue de 3,86 U/ml (DS =3,62; i =0,5 - 50). Las patologías digestivas tuvieron una media de 3,93 U/ml (DS =4,11; i =1 - 50), ligeramente más elevada que las no digestivas, cuya media fue de 3,78 U/ml (DS =3,04 ; i = 0,5 - 28,7). Sin embargo, la mediana fue de 3 U/ml en ambos grupos.

El estudio de los casos con B72.3 sérico superior a 6 U/ml y su valoración porcentual se refleja en las TABLAS 5 y 6 respectivamente. De los 904 pacientes con enfermedades benignas, 60 (6,63 %) presentaron valores superiores a 6 U/ml, y 31 (3,42 %) valores superiores a 10 U/ml.

El número de falsos positivos fue prácticamente igual en el grupo de patologías digestivas y no digestivas. Así, en las primeras ( N=458), en 30 casos (6,55 %) se observaron valores superiores a 6 U/ml, y en 15 (3,72 %) superiores a 10 U/ml. En las no digestivas (N=446), 30 (6,72 %) tuvieron un valor superior a 6 U/ml y 16 (3,58 %) a 10 U/ml. La proporción de falsos positivos se muestra en la TABLA 7. Los casos que con mayor frecuencia superaron el nivel de 6 U/ml fueron las patologías ginecológicas (10,18 %), seguidas de las pulmonares (8,33 %), gastrointestinales (8,28 %), mamarias (8,26 %), pancreáticas (7,14 %), biliares ( 5,88 %), hepáticas (4,89 %), EAI (4,54 %) e IRC (1,44 %). Dentro de las enfermedades pancreatobiliares, las colecistitis registraron valores superiores a 6 U/ml en un 7,24 %, y las pancreatitis crónicas en un 9,52 %. Las patologías con valores superiores a nuestro LSN se muestran en la TABLA 8. En este sentido, cabe reseñar la diferencia de positividad encontrada en el grupo de patologías mamarias entre MFQ (Mastopatía Fibroquística) con 9 casos positivos (9 / 111) y fibroadenomas donde solamente hubo una paciente con valor de B72.3 sérico superior a 6 U/ml ( 1 / 9) . En el grupo de enfermedades gastrointestinales, casi todos los casos de falsos positivos correspondieron a procesos inflamatorios, excepto dos casos de pólipos de colon. En la TABLA 9 se muestra el número de casos con valores de B72.3 sérico superiores a 15 U/ml.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en las positividad del B72.3 sérico entre patologías no digestivas (30 / 446) y digestivas (30 / 458).

Si del total de patologías benignas excluimos las ginecológicas, mamarias y gastrointestinales, solamente el 4,24 % superan las 6 U/ml, el 2,50 % las 10 U/ml y el 1,54 % las 15 U/ml ( ver TABLA 10).

De estos resultados obtenemos el DAC (Dintel de Aplicación Clínica) que hemos establecido en 10 U/ml.

Si del total de patologías benignas excluimos las ginecológicas y mamarias (TABLA 11), sólo 38 casos (5,62 %) superan las 6 U/ml y 19 casos (2,81 %) las 10 U/ml. De estos 38 casos, 13 corresponden a patologías gastrointestinales (5 Enfermedad de Crohn, 2 Colitis Ulcerosa, 2 Diverticulitis, 2 poliposis cólica, y gastritis y 1 esofagitis) y 17 a patologías hepatobiliopancreáticas (4 Cirrosis hepáticas, 3 hepatitis aguda, 2 pancreatitis aguda, 2 pancreatitis crónica, 5 colecistitis y 1 cole/coledocolitiasis). De los 675 casos restantes, las posibilidades de encontrar valores superiores a 10 U/ml son del 2,81 % para patologías digestivas y del 0 % para las no digestivas. Podemos establecer un segundo DAC en 15 U/ml, ya que solamente el 1,77 % de los casos, correspondientes a patologías digestivas, superan este valor.

En resumen, podemos establecer tres dinteles de aplicación clínica para el B72.3 sérico:

- A. Límite Superior de Normalidad : 6 U/ml
- B. Tumores no digestivos : 10 U/ml
- C. Tumores digestivos : 15 U/ml

TABLA 4. Concentraciones de B72.3 sérico en patologías benignas

GRUPO	Nº CASOS	B72.3 (U/ml)			
		MEDIANA	MEDIA	INTERVALO	D. STANDAR
<b>GINECOLOGICAS</b>	108	3	3,95	1 - 21,5	3,05
<b>MAMA</b>	121	3	4,09	3 - 27,0	3,82
<b>RESPIRATORIAS</b>	72	3	4,18	3 - 28,7	3,92
<b>I.R.C.</b>	67	3	3,10	0,5- 12,0	1,21
<b>GASTROINTESTINAL</b>	157	3	4,16	1 - 50,0	5,14
<b>HEPATICAS</b>	143	3	3,54	1 - 24,1	2,31
* Cirrosis	107	3	3,54	1 - 24,1	2,38
* Hepatitis ag.	18	3	4,05	3 - 15,0	2,95
* HBs Ag +	18	3	3,07	3 - 4,4	0,33
<b>PANCREATITIS</b>	56	3	3,85	3 - 13,5	1,84
* Agudas	35	3	3,78	3 - 8,6	1,44
* Crónicas	21	3	3,98	3 - 13,5	2,39
<b>BILIARES</b>	102	3	4,16	1 - 45,4	5,11
* Colecistitis	69	3	4,61	1 - 45,4	6,15
* Litiasis	33	3	3,23	3 - 8,2	0,94
<b>PIEL</b>	29	3	3,22	3 - 8,0	0,94
<b>E.A.I.</b>	22	3	3,62	3 - 12,0	1,96
<b>ENDOCRINO</b>	9	3	3,06	3 - 3,3	0,13
<b>PARED</b>	6	3	3,36	3 - 5,2	0,98
<b>OTROS</b>	10	3	3,00	-	-
<b>TOTAL NO DIGESTIVAS</b>	446	3	3,78	0,5 - 28,7	3,04
<b>TOTAL DIGESTIVAS</b>	458	3	3,93	1 - 50,0	4,11
<b>BENIGNAS TOTALES</b>	904	3	3,86	0,5 - 50,0	3,62

TABLA 5. Número de casos con B72.3 superior a 6 U/ml en patologías benignas

GRUPO	Nº CASOS	B72.3 (U/ml)			
		> 6	> 10	> 15	> 20
<b>GINECOLOGICAS</b>	108	11	4	2	1
<b>MAMA</b>	121	10	8	4	2
<b>RESPIRATORIAS</b>	72	6	3	2	2
<b>I.R.C.</b>	69	1	0	0	0
<b>GASTROINTESTINAL</b>	157	13	6	4	3
<b>HEPATICAS</b>	143	7	2	1	1
* Cirrosis	107	4	2	1	1
* Otras	36	3	0	0	0
<b>PANCREATITIS</b>	56	4	1	0	0
* Agudas	35	2	0	0	0
* Crónicas	21	2	1	0	0
<b>BILIARES</b>	102	6	5	5	1
* Colecistitis	69	5	5	5	1
* Litiasis	33	1	0	0	0
<b>PIEL</b>	29	1	0	0	0
<b>E.A.I.</b>	22	1	1	0	0
<b>ENDOCRINO</b>	9	0	0	0	0
<b>PARED</b>	6	0	0	0	0
<b>OTROS</b>	10	0	0	0	0
<b>TOTAL NO DIGESTIVAS</b>	<b>446</b>	<b>30</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>5</b>
<b>TOTAL DIGESTIVAS</b>	<b>458</b>	<b>30</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>5</b>
<b>BENIGNAS TOTALES</b>	<b>904</b>	<b>60</b>	<b>31</b>	<b>18</b>	<b>10</b>

TABLA 6. Porcentaje de casos con B72.3 superior a 6 U/ml en patologías benignas

GRUPO	Nº CASOS	B72.3 (U/ml)			
		> 6	> 10	> 15	> 20
<b>GINECOLOGICAS</b>	108	10,18 %	3,70 %	1,85 %	0,92 %
<b>MAMA</b>	121	8,26 %	6,61 %	3,30 %	1,65 %
<b>RESPIRATORIAS</b>	72	8,33 %	4,16 %	2,77 %	2,77 %
<b>I.R.C.</b>	69	1,44 %	0	0	0
<b>GASTROINTESTINAL</b>	157	8,28 %	3,82 %	2,54 %	1,91 %
<b>HEPATICAS</b>	143	4,89 %	1,39 %	0,69 %	0
* Cirrosis	107	3,73 %	1,86 %	0,93 %	0
* Otras	36	8,33 %	0	0	0
<b>PANCREATITIS</b>	56	7,14 %	1,78 %	0	0
* Agudas	35	5,71 %	0	0	0
* Crónicas	21	9,52 %	4,76 %	0	0
<b>BILIARES</b>	102	5,88 %	4,90 %	4,90 %	0
* Colecistitis	69	7,24 %	7,24 %	7,24 %	0
* Litiasis	33	3,03 %	0	0	0
<b>PIEL</b>	29	3,44 %	0	0	0
<b>E.A.I.</b>	22	4,54 %	4,54 %	0	0
<b>ENDOCRINO</b>	9	0	-	-	-
<b>PARED</b>	6	0	-	-	-
<b>OTROS</b>	10	0	-	-	-
<b>TOTAL NO DIGESTIVAS</b>	<b>446</b>	<b>6,72 %</b>	<b>3,58 %</b>	<b>1,79 %</b>	<b>1,12 %</b>
<b>TOTAL DIGESTIVAS</b>	<b>458</b>	<b>6,55 %</b>	<b>3,27 %</b>	<b>2,18 %</b>	<b>1,09 %</b>
<b>BENIGNAS TOTALES</b>	<b>904</b>	<b>6,63 %</b>	<b>3,42 %</b>	<b>1,99 %</b>	<b>1,10 %</b>

TABLA 7. Falsos positivos en patologías benignas

		B72.3 > 6 U/ml		% Falsos *
GRUPO	NUMERO CASOS			
GINECOLOGICAS	108	11		18,18 %
MAMARIAS	121	10		8,26 %
RESPIRATORIAS	72	6		8,33 %
I.R.C.	69	1		1,44 %
GASTRO- INTESTINALES	157	13		8,28 %
HEPATICAS	143	7		4,89 %
PANCREATICAS	56	4		7,14 %
BILIARES	102	6		5,88 %
PIEL /PARED	35	1		3,92 %
EAI	22	1		4,54 %
ENDOCRINO	9	0		-
OTROS	10	0		-
<b>TOTAL</b>	<b>904</b>	<b>60</b>		<b>6,83%</b>

TABLA 8. Valores de B72.3 sérico obtenidos en los falsos positivos de patologías benignas

PATOLOGIA	Nº CASOS	B72.3 U/ml
<b>GINECOLOGICA</b>		
* QUISTE OVARIO	8	6,8;15,8,4;7,4;9,9;21,5;19,4;8,1
* ENDOMETRIOSIS	2	6,8;6,3
* ADENOMA ENDOMETRIO	1	14,6
<b>MAMARIA</b>		
* MFQ	9	25,6;27;13,4;15,6;11,4;13,5;6,8;12;6,9
* FIBROADENOMA	1	9,5
<b>RESPIRATORIA</b>		
* EPOC	5	22;6,6;9,1;28,7;7,3
* NEUMONIA	1	11,8
<b>I.R.C.</b>	1	12,7
<b>GASTROINTESTINAL</b>		
* E. CROHN	5	9,3;28;8;8;8;
* COLITIS ULCEROSA	2	7,1;11,3
* DIVERTICULITIS	2	50;16,5
* POLIPOS COLON	2	11,4;8,4
* GASTRITIS	1	10
* ESOFAGITIS	1	33
<b>HEPATICA</b>		
* CIRROSIS	4	24,1;7,5;12;10
* HEPATITIS AGUDA	3	6,5;15;6,5
<b>PANCREATITIS</b>		
* AGUDAS	2	8,6;8,6
* CRONICAS	2	13,5;6,6

TABLA 9. Casos de B72.3 sérico superiores a 15 U/ml en patologías benignas

PATOLOGIA	Nº CASOS	B 72.3 (U/ml)		
		> 15	> 20	> 30
GINECOLOGICA	108	2	1	0
MAMARIA	121	4	2	0
RESPIRATORIA	72	2	2	0
I.R.C.	69	0	0	0
GASTROINTESTINAL	157	4	3	2
HEPATICA	143	1	0	0
PANCREATICA	56	0	0	0
BILIAR	102	5	1	0
PIEL	29	0	0	0
EAI	22	0	0	0
ENDOCRINO	9	0	0	0
PARED	6	0	0	0
OTROS	10	0	0	0
TOTALES	904	18	9	2
(% +)		(2,17%)	(1%)	(0,2%)

**TABLA 10. Relación de casos con B72.3 sérico superior a 6 U/ml en patologías benignas. Variación al excluir patologías ginecológicas, mamarias y gastrointestinales.**

<b>B72.3 (U/ml)</b>					
	<b>Nº CASOS</b>	<b>&gt;6</b>	<b>&gt;10</b>	<b>&gt;15</b>	<b>&gt;20</b>
<b>PATOLOGIAS BENIGNAS (% +)</b>	904	59 (6,52 %)	31 (3,42 %)	18 (1,99 %)	10 (1,10 %)
<b>SIN PATOLOGIA GINECOLOGICA</b>	796	48 (6,03 %)	27 (3,29 %)	16 (2,01 %)	9 (1,13 %)
<b>SIN PATOL.MAMARIA</b>	675	38 (5,62 %)	19 (2,81 %)	12 (1,77 %)	7 (1,03 %)
<b>SIN PATOL. GASTROINT.</b>	518	25 (4,82 %)	13 (2,50 %)	8 (1,54 %)	4 (0,77 %)

**TABLA 11. Relación de casos con B72.3 sérico superior a 6 U/ml en patologías benignas. Variación al excluir patologías ginecológicas y mamarias**

<b>B72.3 (U/ml)</b>					
	<b>Nº CASOS</b>	<b>&gt; 6</b>	<b>&gt;10</b>	<b>&gt;15</b>	<b>&gt;20</b>
<b>PATOLOGIAS BENIGNAS (% +)</b>	904	59 (6,52%)	31 (3,42 %)	18 (1,99 %)	10 (1,10 %)
<b>SIN PATOLOGIAS GINECOLOGICAS Y MAMARIAS (% +)</b>	675	38 (5,82 %)	19 (2,81 %)	12 (1,77 %)	7 (1,03 %)

### **6.3.- CANCER DE ESTOMAGO**

Con objeto de evaluar el comportamiento de los niveles séricos preoperatorios de la TAG-72 en el cáncer gástrico, se realizó un estudio prospectivo con 88 pacientes (edad media: 63,5 años; intervalo: 29-86) que fueron sometidos a tratamiento quirúrgico.

En las TABLA 12 se recogen los resultados obtenidos de las concentraciones de B72.3 sérico preoperatorios en relación a las características de los pacientes y de los tumores.

En las determinaciones preoperatorias la media global fue de  $16,7 \pm 45,3$  U/ml ( $i=3-294$ ). La mediana fue de 3 U/ml en los estadios I y III, de 4 U/ml en el II, ascendiendo a 12 U/ml en el estadio IV. Como puede apreciarse en la TABLA 12 existieron diferencias significativas de los niveles preoperatorios del marcador en relación al estadio. Así, los pacientes con estadio tumoral I presentaron unos niveles pretratamiento de TAG-72 significativamente ( $p<0,05$ ) más bajos en relación a los pacientes con estadios tumorales superiores. Asimismo, se observó también una asociación significativa entre los niveles séricos pretratamiento y el grado de diferenciación del tumor siendo aquellos significativamente más bajos en los tumores bien diferenciados (Grado I:  $4,9 \pm 6,8$  U/ml) que en los moderada (Grado II:  $20,3 \pm 49,5$  U/ml) ( $p<0,05$ ) o pobremente diferenciados (Grado III:  $23,6 \pm 60,7$  U/ml) ( $p<0,01$ ). Por el contrario, no se encontró relación significativa entre las concentraciones séricas de la TAG-72 y la edad, sexo, localización del tumor y su tipo histológico.

Durante el seguimiento postoperatorio (tiempo medio de 28,5 meses), 43 pacientes (48,86 %) estaban libres de enfermedad (NED) mientras que en 45 (51,13 %) se constató la existencia de tumor. De estos, 9 casos correspondían a enfermedad avanzada desde el momento del diagnóstico, 3 a tumor irreseccable y uno a un caso en el que se realizó cirugía exéretica paliativa quedando tumor residual. De los 32 casos restantes (36,36 %), 10 (11,36 %) presentaron recidiva locoregional (grupo en actividad) y 22 (25 %) metástasis a distancia (grupo en progresión).

En el grupo de pacientes NDE, el valor medio pretratamiento de B72.3 sérico fue de  $4,44 \pm 3,98$  ( $i=1-41$ ) con un descenso postoperatorio de los niveles del marcador a 3 U/ml. Como puede observarse en la TABLA 13, no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,372$ ) entre las concentraciones séricas post-tratamiento de la TAG-72 en relación a la presencia de recidiva locoregional ( $17,7 \pm 27,5$  U/ml) o de metástasis a distancia ( $27,4 \pm 32,1$  U/ml). Sin embargo, esos niveles fueron significativamente más elevados ( $p<0,001$ ) que en el grupo de pacientes sin evidencia de enfermedad ( $3,8 \pm 4,7$ ).

El número y el porcentaje de casos con valores elevados de B72.3 sérico están representados en las TABLAS 14 y 15. En el grupo pretratamiento, el porcentaje de positividad global fue de 31,8 % considerando el LSN de 6 U/ml, y de 25 % si se aplica el DAC de 10 U/ml. Como puede apreciarse en la TABLA 14 existieron diferencias significativas entre los distintos estadios, con menor número de casos positivos en estadio I ( $P=0,001$ ) y II ( $P<0,05$ ) en relación al estadio IV.

En el grupo post-tratamiento, el porcentaje de positividad global ascendió al 45,5 % para un LSN de 6 U/ml y a 36,3 % para un DAC de 10 U/ml, siendo similar en los grupos de pacientes con actividad y en progresión tumoral. En el conjunto de pacientes con enfermedad, la sensibilidad fue de 39,6 % considerando el dintel de 6 U/ml. Por el contrario, en los pacientes libres de enfermedad, no hubo ningún valor de B72.3 sérico superior a 6 U/ml, poniendo en evidencia un descenso significativo ( $P<0,001$ ) de las concentraciones del marcador tras la exéresis quirúrgica del tumor primario.

Por otra parte, se compararon los porcentajes de positividades del B72.3 sérico ( $> 10$  U/ml) y del CEA ( $>6$  ng/ml) tanto pre como post-operatorias (TABLAS 16 y 17). Así, en el grupo pretratamiento, los porcentajes de positividad global del CEA y B72.3 fueron similares (21,5% y 25 %, respectivamente). La combinación de ambos marcadores, elevó el porcentaje de positividades a un 35,2 %. En los pacientes libres de enfermedad no existieron falsos positivos para el B72.3, mientras que un 6,9 % mostraron niveles elevados de CEA. En el grupo post-tratamiento, los pacientes en progresión presentaron un mayor porcentaje de positividades (57% para el B72.3 y 43 % para el CEA) que en aquellos con recidiva local (40 % para ambos marcadores), aunque sin alcanzar significación estadística. Combinando ambos marcadores, el porcentaje de positividades en el total de pacientes con recurrencia se elevó a 72 %, con un 82,6 % para el grupo en progresión y un 50 % para los pacientes en actividad.

Si consideramos al conjunto de pacientes con enfermedad, el CEA presentó una sensibilidad del 27,2 % y el B72.3 del 31.4 % (DAC de 10 U/ml) aumentando al 45,5 % si combinamos ambos. Esta elevación fue significativa ( $P < 0,05$ ) con respecto a la determinación aislada del CEA, pero no ocurre así para el B72.3 ( $P = 0,140$ ).

El análisis del valor diagnóstico del B72.3 sérico en el cáncer gástrico ofreció el siguiente resultado para un DAC de 10 U/ml: Sensibilidad: 39,6 %; especificidad: 100 %; Valor Predictivo Positivo: 100 %; Valor Predictivo Negativo: 37 %.

## **SIGNIFICACION PRONOSTICA DEL B72.3 SÉRICO PREOPERATORIO EN EL CANCER GASTRICO**

La posible relación existente entre la expresión sérica del antígeno TAG-72 en el cáncer gástrico con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia total, fue evaluada de forma prospectiva en 88 pacientes. De ellos, 75 fueron seleccionados en base a la resecabilidad del tumor y, por tanto, a la realización de cirugía resectiva con intención curativa. El análisis del tiempo libre de enfermedad (TLE) y de supervivencia reveló que las concentraciones elevadas de TAG-72 sérica estuvieron significativamente asociados con un menor TLE y una menor supervivencia.

Primeramente, tratamos de identificar el valor óptimo de CEA sérico preoperatorio para predecir la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con cáncer gástrico resecable, y ese valor fue de 7 ng/ml (FIGURA 1). Como se puede apreciar en las FIGURAS 2 y 3, existió una diferencia significativa ( $P=0,003$ ) entre las curvas de TLE determinadas para los dos grupos de pacientes. Sin embargo, la diferencia entre las curvas de supervivencia total no fue estadísticamente significativa.

La búsqueda del dintel óptimo de los niveles séricos preoperatorios de la glucoproteína TAG-72 para predecir la supervivencia libre de enfermedad en 75 pacientes con cáncer gástrico resecable, nos condujo a la definición de un valor de 20 U/ml (FIGURA 4), y teniendo en cuenta en el análisis multivariante otros factores pronósticos clásicos así como el valor óptimo de CEA previamente establecido (TABLA 18). Ese valor identificó un 13,6 % de pacientes con niveles elevados de B72.3 y un mal pronóstico. Así, la recurrencia de la enfermedad fue confirmada en 23 de 66 pacientes (34,8 %) con cáncer gástrico resecable y  $B72.3 < 20$  U/ml y en los 9 pacientes (100 %) similares con  $B72.3 > 20$  U/ml ( $P=0,0026$ ).

Por otra parte, los niveles séricos elevados de B72.3 también estuvieron asociados con una supervivencia total más corta. Así, durante el periodo de seguimiento clínico de los pacientes con cáncer gástrico resecable se detectaron 15 fallecimientos en los 66 pacientes (22,72 %) con  $B72.3 < 20$  U/m, y 4 fallecimientos en los 9 pacientes (44.4 %) con niveles preoperatorios del marcador superiores a ese dintel, existiendo una diferencia significativa ( $P<0,01$ ) entre las curvas de supervivencia determinadas para esos dos grupos de pacientes (FIGURA 5). Además, en el conjunto de pacientes con cáncer gástrico también existió una diferencia significativa ( $P<0,001$ ) entre las curvas de supervivencia total determinadas para los pacientes en función de los valores séricos preoperatorios de B72.3 (FIGURA 6). Así, se registraron 18 fallecimientos a causa de la enfermedad en el grupo total de 76 pacientes (23,68 %) con  $B72.3 < 20$  U/ml, y 6 en el grupo similar de 12 pacientes (50 %) con valores del marcador superiores a ese dintel.

En nuestra población estudiada, el análisis univariante de otros factores pronósticos en el cáncer gástrico mostró que el mayor estadio tumoral y los niveles séricos preoperatorios elevados de CEA también estuvieron asociados con una elevada incidencia de recurrencias tumorales (TABLA 18). Así mismo, el mayor estadio tumoral también estuvo asociado con una menor supervivencia total en el estudio univariante ( $P<0,0001$ ). El análisis de regresión múltiple de Cox confirmó que la TAG-72 ( $> 20$  U/ml) es un factor pronóstico

independiente, y el más potente tras el estadio del tumor para predecir el tiempo libre de enfermedad ( $P < 0,0001$ ) y la supervivencia ( $P = 0,0032$ ) en pacientes con cáncer gástrico.

**TABLA 12.** Valores de B72.3 sérico preoperatorio en pacientes con cáncer gástrico clasificados de acuerdo a sus diferentes características

Características de los pacientes y tumores	Nº	B72.3 (U/ml)		
		Media ± DS	Mediana	Intervalo
Total tumores	88	16,7 ± 45,3	3	3 - 294
Sexo				
Varón	54	10,3 ± 21,9	3	3 - 146
Mujer	34	26,8 ± 66,9	3,5	3 - 249
Localización				
Cardias	5	16,2 ± 28,4	3	3 - 67
Cuerpo-Fundus	22	14,1 ± 30,8	3	3 - 146
Antro-Píloro	56	18,6 ± 53,1	3	3 - 294
Muñón Gástrico	5	7,0 ± 5,7	5	3 - 14
Estadio				
I	25	6,1 ± 9,8 *\$	3	3 - 41
II	15	28,6 ± 75,2	4	3 - 294
III	39	17,8 ± 48,5	3	3 - 277
IV	9	21,6 ± 18,4	12	3 - 49
Grado Histológico <sup>p</sup>				
I	25	4,9 ± 6,8 & #	3	3 - 36
II	43	20,3 ± 49,5	3	3 - 294
III	20	23,6 ± 60,7	5,5	3 - 277

\* p &lt; 0,001 vs estadio IV

\$ p &lt; 0,05 vs estadio II y III

&amp; p &lt; 0,05 vs grado histológico II

# p &lt; 0,01 vs grado histológico III

**Tabla 13.** Concentraciones de B72.3 sérico en cáncer gástrico en función de la evolución postoperatoria

ESTADIO	Nº CASOS	MEDIA	MEDIANA	D.STANDARD	INTERVALO
NDE	43	4,44*	3	3,98	1-18
ACTIVIDAD	10	17,70	6	27,5	3-93
PROGRESION	23	27,47	12	32,1	3-100
TOTAL RECORRENCIAS	33	32,48	5	70,77	3-294

\* P &lt; 0,0001 vs progresión

**TABLA 14.** Valores positivos de B72.3 sérico en cáncer gástrico en función del estadio clínico y de los dinteles superior de normalidad y de actividad clínica

ESTADIO	Nº CASOS	> 6 U/ml	> 10 U/ml	> 15 U/ml
I	25	3 *	2	2
II	15	5 **	3	2
III	39	13	11	5
IV	9	7	6	3
<b>TOTAL</b>	<b>88</b>	<b>28</b>	<b>22</b>	<b>12</b>
NDE	43	0	0	0
ACTIVIDAD	10	4	4	3
PROGRESION	23	16	12	9
TOTAL RECURRENCIAS	33	20	16	12
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	<b>121</b>	<b>48</b>	<b>38</b>	<b>24</b>

\* Estadio I vs IV P = 0,001

\*\* Estadio II vs IV P &lt; 0,05

**TABLA 15.** Porcentaje de positividad de B72.3 sérico en cáncer gástrico en función del estadio clínico y de los dinteles superior de normalidad y de actividad clínica

ESTADIO	N° CASOS	> 6U/ml	> 10 U/ml	> 15 U/ml
I	25	12	8	8
II	15	33,3	20	20
III	39	33,3	28,2	20,5
IV	9	77,7	66,6	44,4
<b>TOTAL</b>	<b>88</b>	<b>31,8</b>	<b>25</b>	<b>19,3</b>
NDE	43	-	-	-
ACTIVIDAD	10	40	40	40
PROGRESION	23	47,82	34,78	30,43
TOTAL RECURRENCIAS	33	45,45	36,36	30,30
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	<b>121</b>	<b>39,66</b>	<b>31,40</b>	<b>19,83</b>

**TABLA 16.** Valores positivos de B72.3 (> 10 U/ml) y CEA (> 6 ng/ml) séricos en cáncer gástrico en función del estadio clínico y evolución

ESTADIO	N° CASOS	B72.3	CEA	B72.3 y/o CEA
I	25	2	1	2
II	15	3	4	6
III	39	11	11	17
IV	9	6	2	6
<b>TOTAL</b>	<b>88</b>	<b>22</b>	<b>18</b>	<b>31</b>
NDE	43	0	3	3
ACTIVIDAD	10	4	4	5
PROGRESION	23	12	10	19
TOTAL RECURRENCIAS	33	16	14	24
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	<b>121</b>	<b>38</b>	<b>33</b>	<b>55</b>

**TABLA 17.** Porcentaje de positividad de B72.3 y CEA séricos en cáncer gástrico en función del estadio clínico y evolución

ESTADIO	N° CASOS	B72.3	CEA	B72.3 y/o CEA
I	25	8	4	8
II	15	20	26,6	40
III	39	28,2	28,2	43,5
IV	9	66,6	22,2	66,6
<b>TOTAL</b>	<b>88</b>	<b>25</b>	<b>20,4</b>	<b>35,2</b>
NDE	43	-	6,9	6,9
ACTIVIDAD	10	40	40	50
PROGRESION	23	57,12	43,47	82,60
TOTAL RECURRENCIAS	33	48,8	30,30	72,72
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	<b>121</b>	<b>31,40</b>	<b>27,27</b>	<b>45,45</b>

**Tabla 18.** Niveles séricos preoperatorios de B72.3 y pronóstico en 88 pacientes con cáncer gástrico

Factores analizados	Supervivencia libre de enfermedad		Supervivencia total	
	Valor de la P univariante	Valor de la P multivariante	Valor de la P univariante	Valor de la P multivariante
B72.3	0,0026	< 0,0001	0,0232	0,0032
CEA	0,0003	0,0631	0,0914	0,5462
Edad	0,6795	0,6239	0,6125	0,2506
Localización	0,7768	0,9607	0,6793	0,7878
Grado Histológico	0,9307	0,1584	0,7735	0,5320
Estadío	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

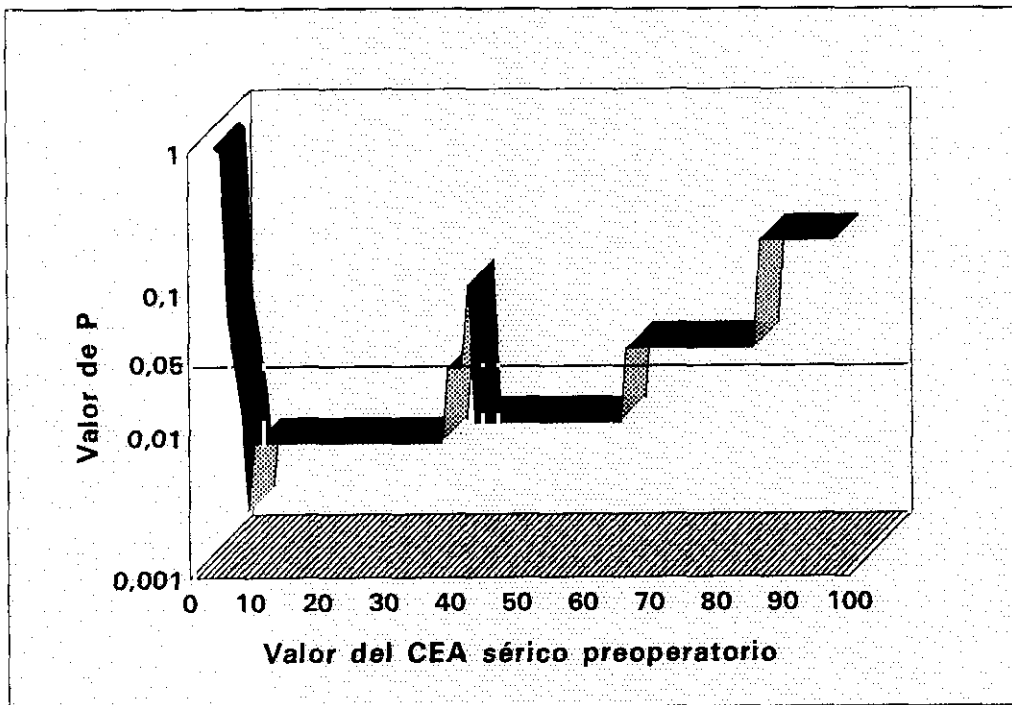


FIGURA 1.  
Determinación del valor óptimo de CEA sérico preoperatorio para predecir la supervivencia libre de enfermedad en el cáncer gástrico resecable. La significación en el nivel  $p < 0,05$  está indicada por la línea horizontal

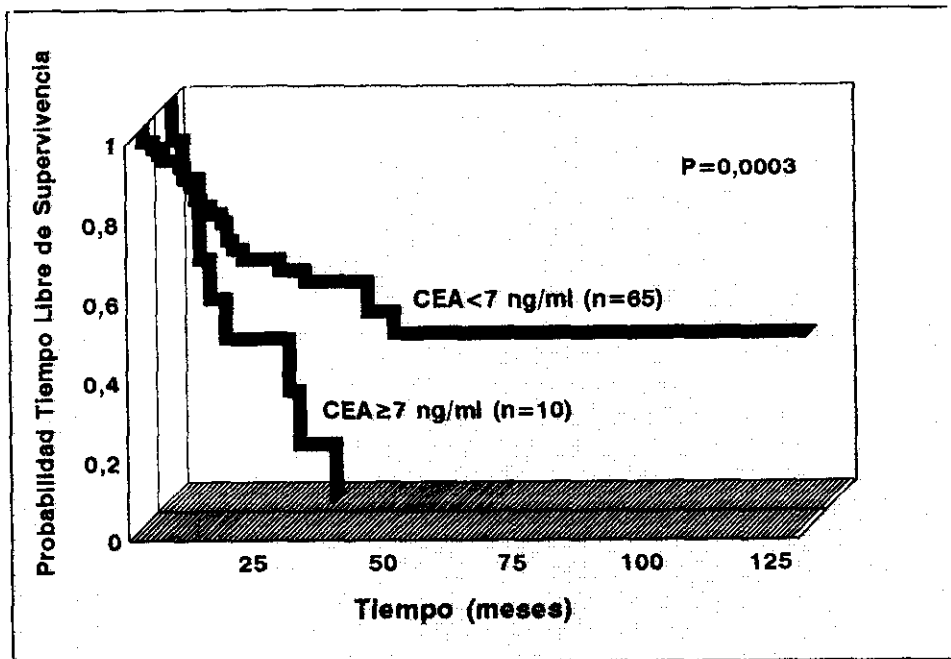


FIGURA 2.  
Tiempo libre de enfermedad en función de los niveles séricos preoperatorios de CEA en pacientes con cáncer gástrico resecable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p=0,0003$

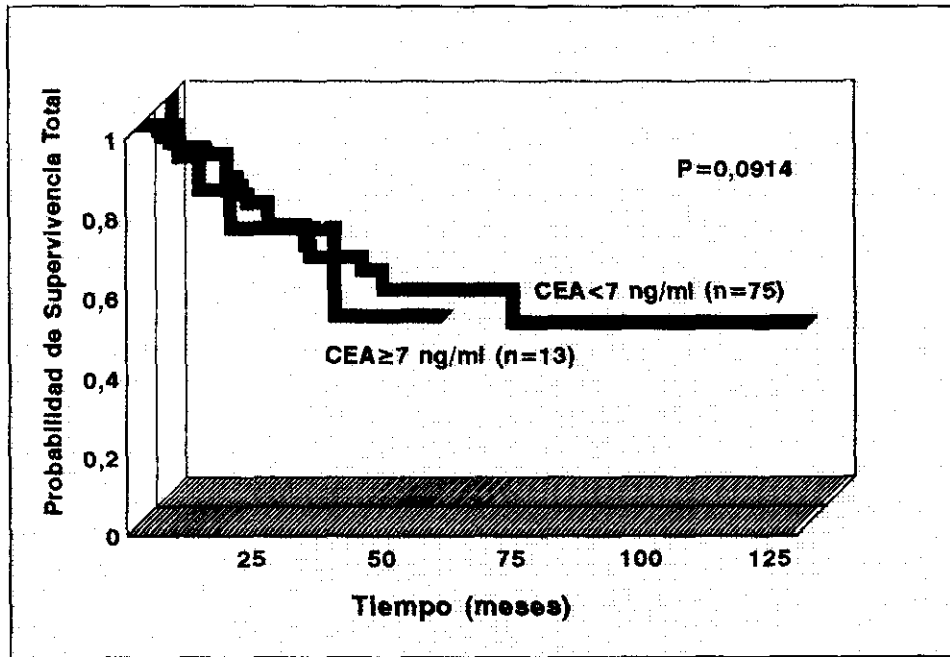


FIGURA 3.  
Probabilidad de supervivencia total en función de los niveles séricos preoperatorios de CEA en pacientes con cáncer gástrico.

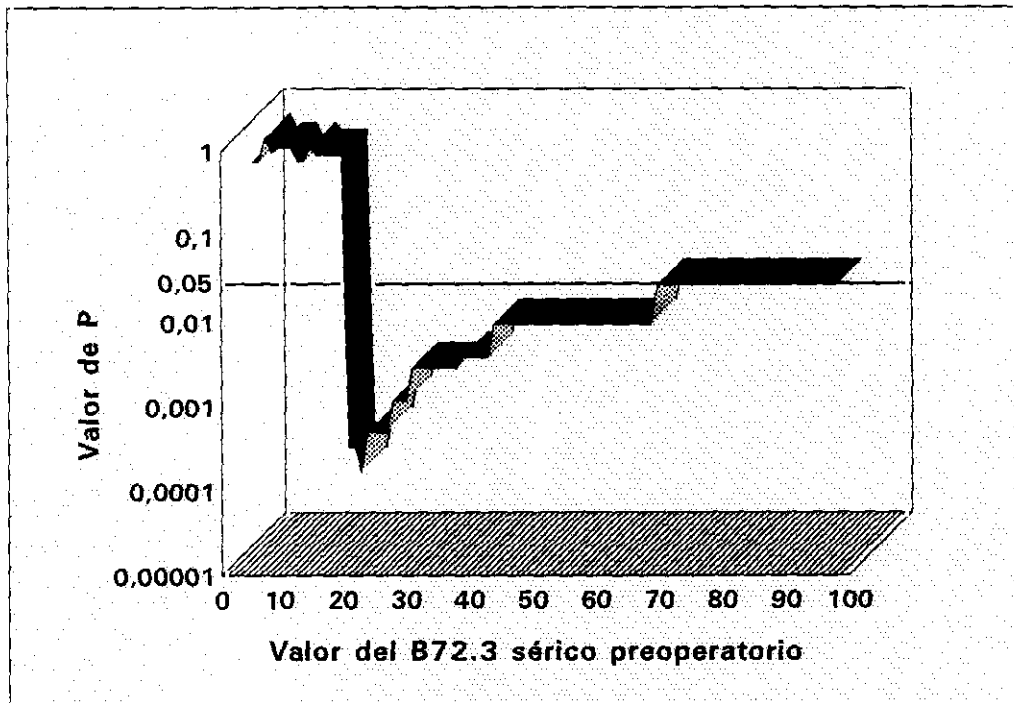


FIGURA 4.  
Determinación del valor óptimo de B72.3 sérico preoperatorio para predecir la supervivencia libre de enfermedad en el cáncer gástrico resecable. La significación en el nivel  $p < 0,05$  está indicada por la línea horizontal

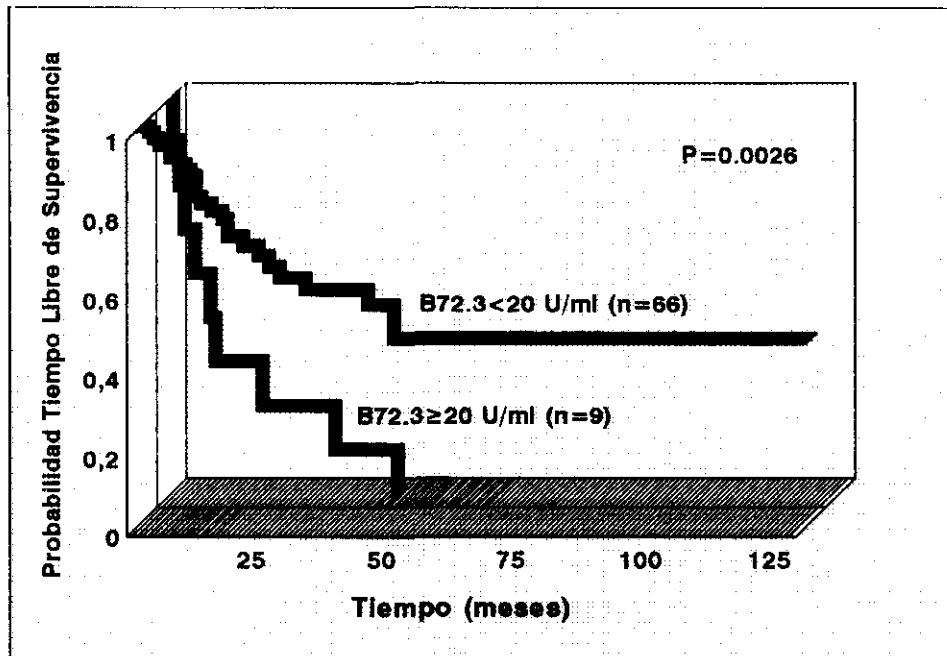


FIGURA 5. Tiempo libre de enfermedad en función de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en pacientes con cáncer gástrico resecable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p=0,0026$

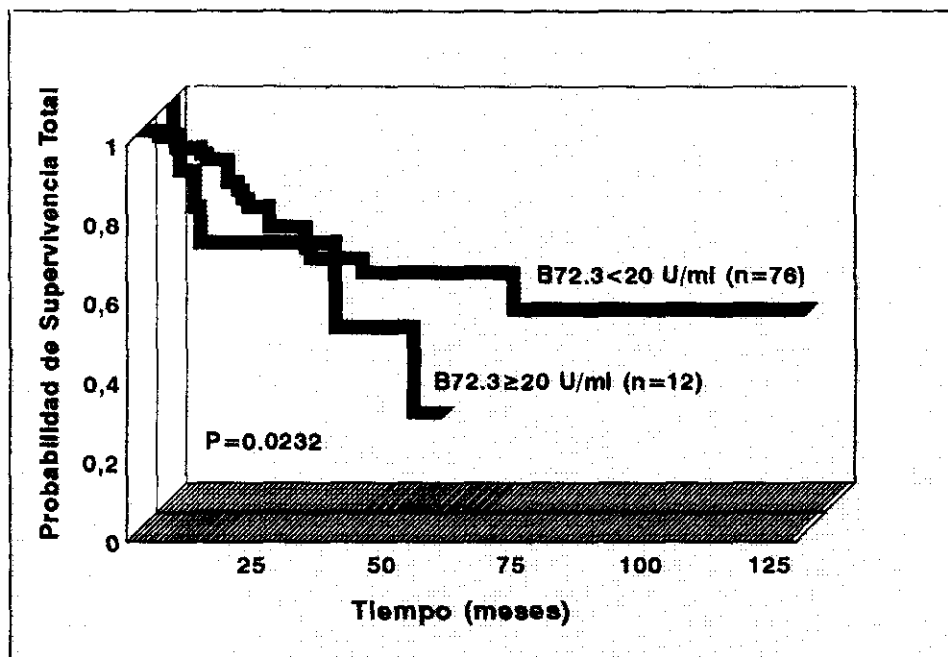


FIGURA 6.  
Probabilidad de supervivencia total en función de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en pacientes con cáncer gástrico. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p=0,0232$

## 6.4 CANCER DE COLON

Con el fin de evaluar el comportamiento de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en el cáncer colorrectal, hemos realizado un estudio prospectivo con 222 pacientes (edad media  $64,49 \pm 11,48$ ; intervalo: 28-94) que fueron sometidos a tratamiento quirúrgico.

En la TABLAS 19 y 20 están representados los resultados de las concentraciones de B72.3 sérico en el cáncer colorectal en relación a las características de los pacientes y de los tumores.

En las determinaciones pretratamiento, el valor medio global fue de  $22,31 \pm 2,29$  U/ml ( $i = 3-1983$ ). En el estadio A aquel fue de  $4 \pm 2,23$  U/ml ( $i = 3-11$ ), mientras que en el B,C y D fueron de  $7,49 \pm 13,11$  U/ml ( $i = 3-93$ ),  $15,05 \pm 67,21$  U/ml ( $i = 3-564$ ) y  $92,60 \pm 341,46$  U/ml ( $i = 3-1983$ ), respectivamente. La mediana fue de 3 U/ml en los estadios A,B y C mientras que en el estadio D ascendió a 23,50 U/ml. Hemos observado la existencia de diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) entre las concentraciones preoperatorias del marcador en función del estadio de la enfermedad, pero no en relación al grado de histológico de los tumores.

Durante el seguimiento de los pacientes (tiempo medio de  $40,7 \pm 35,01$  meses ( $i = 1-193$ ), 129 estaban libres de enfermedad (NED) mientras que en 93 se comprobó la existencia de progresión tumoral. De estos, 32 correspon-

dieron a pacientes con enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico (estadio D), y 61 a recidiva de la enfermedad (23 locoregional y 38 como metástasis a distancia).

En el grupo de pacientes NED, el valor medio pretratamiento del B72.3 fue de  $9,84 \pm 49,55$  U/ml ( $i = 3-564$ ) y la mediana de 3 U/ml, mientras que la media post-tratamiento fue de  $3,79 \pm 4,69$  U/ml ( $i = 1-50$ ) y la mediana de 3 U/ml, existiendo diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) entre las concentraciones séricas del marcador pre y post-tratamiento.

En los pacientes con recurrencia de la enfermedad, el valor medio post-tratamiento fue de  $18,82 \pm 24,57$  U/ml ( $i = 3-100$ ), con una mediana de 9 U/ml. Los pacientes con recidiva locoregional presentaron unos niveles séricos de B72.3 significativamente ( $p < 0,05$ ) más bajos ( $12,82 \pm 21,62$  U/ml) en relación a los pacientes con metástasis a distancia ( $22,31 \pm 24,57$  U/ml).

El número de casos positivos y el correspondiente porcentaje se expresan en las TABLAS 21 y 22. En el grupo pretratamiento el porcentaje de positividad global fue de 39,18 % considerando como LSN de 6 U/ml y de 21,62 %, si aquel se estableció en 10 U/ml. Se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de positividades en función del estadio de la enfermedad. Así, en el estadio A el porcentaje de casos con niveles de B72.3 superiores a 10 U/ml fue del 5,88 %, en el B del 12,87 %, en el C del 14,08 % y en el D del 71,87 %.

En el grupo post-tratamiento el porcentaje de positividad global fue del 42,62 % (para un dintel de actividad de 10 U/ml), siendo en el grupo en actividad del 26,08 % y en el de progresión del 52,63 %. En los pacientes libres de enfermedad, el porcentaje de positividades fue del 3,10 %.

En el conjunto de los pacientes con enfermedad la sensibilidad del marcador fue del 43,81 % para un LSN de 6 U/ml y del 25,79 % para un DAC (dintel de actividad clínica) de 10 U/ml. Por otra parte, se constataron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) de los niveles séricos del marcador en relación a la existencia de actividad/progresión de la enfermedad. Sin embargo,

no existió diferencia significativa entre el grupo en actividad (6/23) y el de progresión (20/38).

Los porcentajes de positividades de B72.3 (>10 U/ml) y del CEA (> 6 ng/ml) séricos fueron comparados en el conjunto de los pacientes con enfermedad. Así, como se puede observar en las TABLAS 23 y 24, en el grupo pretratamiento el porcentaje de positividad global del CEA (36,93 %) fue significativamente ( $P<0,001$ ) superior a la del B72.3 (21,62 %). Cuando se combinaron ambos este porcentaje fue del 40,09 %, superior a la obtenida utilizando cada marcador por separado, tanto en la globalidad del grupo como en cada estadio.

En el grupo post-tratamiento, el porcentaje global de positividades fue del 73,77 % para el CEA y del 42,62 % para el B72.3. Además, este porcentaje fue también significativamente ( $P<0,001$ ) superior para el CEA tanto en el grupo en actividad (% vs %) como en el de progresión (% vs %). La combinación de ambos marcadores elevó el porcentaje de positividades al 83,60 %. En los pacientes sin evidencia de enfermedad (NED), el CEA presentó una positividad del 3,10 % que fue similar al del B72.3 (%). La combinación de ambos llevó el porcentaje de positividad hasta el 4,65 %.

En el conjunto de los pacientes con enfermedad, el CEA mostró una sensibilidad del 44,87 % y el B72.3 del 26,14 % para un DAC de 10 U/ml ( $P<0,001$ ). Combinando ambos marcadores, la sensibilidad se elevó hasta el 49,46 %. El análisis del valor diagnóstico del B72.3 sérico en el cáncer colorrectal arrojó los siguientes resultados para un LSN de 6 U/ml: Especificidad: 92 %; Sensibilidad: 44 %; Valor Predictivo Positivo : 96 %; y Valor Predictivo Negativo: 43 %.

## **SIGNIFICACION PRONOSTICA DEL B72.3 SÉRICO PREOPERATORIO EN EL CANCER COLO-RECTAL**

La posible relación existente entre la expresión sérica de la TAG-72 y el pronóstico en el cáncer colo-rectal fue evaluada de forma prospectiva en 222 pacientes. De ellos, 190 fueron seleccionados en base a la resecabilidad del tumor y a la realización de cirugía resectiva con intención curativa para la evaluación del Tiempo Libre de Enfermedad (TLE).

El Antígeno Carcinoembrionario (CEA), es el MT universalmente aceptado por la comunidad oncológica en el manejo de los tumores colo-rectales. Por ello, tratamos de identificar en primer lugar el valor óptimo del CEA sérico preoperatorio para predecir el TLE en pacientes con cáncer colorrectal resecable (n=190), y ese valor fue de 14 ng/ml. (FIGURA 7). Considerando este valor del marcador, la recurrencia de la enfermedad fue confirmada en 40 de 161 pacientes con CEA negativo (24,84 %) y en 22 de 29 pacientes con CEA positivo (75,86 %). Como se puede observar en la FIGURA 8 existió una diferencia significativa ( $P < 0,0001$ ) entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad determinadas para esos dos grupos de pacientes. Por otra parte, los niveles elevados de CEA también estuvieron asociados con una supervivencia total más corta. Así, durante el periodo de estudio, se registraron 14 fallecimientos (7,32 %) a causa de recurrencia tumoral en los pacientes con CEA sérico inferior a 14 ng/ml y 10 (34,48 %) en los pacientes con niveles elevados del marcador. Como puede apreciarse en la FIGURA 9 también existió una diferencia significativa ( $P < 0,001$ ) entre las curvas de supervivencia total para esos dos grupos de pacientes.

A continuación, determinamos el valor óptimo de B72.3 sérico preoperatorio para predecir el TLE en pacientes también con cáncer colorrectal reseccable, y teniendo en cuenta en el análisis multivariante el resto de los factores pronósticos clásicos, así como el del valor óptimo de CEA anteriormente citado (TABLA 25). La búsqueda de este dintel óptimo nos condujo a la definición de un valor de B72.3 sérico de 45 U/ml ( $P=0,0205$ ) en el estudio multivariante (FIGURA 10). Considerando este valor del marcador, la recurrencia de la enfermedad fue confirmada en 59 de 185 pacientes con B72.3 negativo (31,89 %) y en 3 de 5 pacientes con B72.3 positivo (60%). Como se puede observar en la FIGURA 11 existió una diferencia significativa ( $P=0,0047$ ) entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad determinadas para esos dos grupos de pacientes.

Un segundo dintel de B72.3 de 6 U/ml fue establecido en estos pacientes. Puesto que el valor dintel para el B72.3 de 45 U/ml identifica a un porcentaje muy reducido de pacientes con valores positivos para ese marcador, también utilizamos un segundo valor delimitador de 6 U/ml de B72.3. Así, teniendo en cuenta ese valor, la recurrencia de la enfermedad se confirmó en 33 de 131 pacientes con B72.3 negativo (25,19 %) y en 29 de 59 pacientes con B72.3 positivo (49,15 %). Utilizando este dintel hubo una diferencia significativa ( $P=0,0007$ ) más marcada que con el valor de 45 U/ml entre las curvas de TLE en ambos grupos de pacientes (FIGURA 12). Además, cabe mencionar que no existieron diferencias significativas entre los periodos medios de seguimiento de esos dos grupos de pacientes.

Por otra parte, los niveles elevados de B72.3 también estuvieron asociados con una supervivencia total más corta. Así, durante el período de estudio, utilizando un dintel de 45 U/ml, se registraron 22 muertes (11,89 %) a causa de recurrencia tumoral en los pacientes con B72.3 inferior a 45 U/ml y 2 (40 %) en los pacientes con niveles elevados del marcador. Cuando el dintel se estableció en 6 U/ml, se registraron 13 fallecimientos (9,62 %) en los pacientes con B72.3 inferior a 6 U/ml y 20 (23%) cuando el marcador fue positivo. Como se puede observar en las FIGURAS 13 y 14, también existió una diferencia significativa ( $P= 0,0095$  para un dintel de B72.3 de 45 U/ml y  $P=0,0108$  considerando el valor de 6 U/ml) entre las curvas de supervivencia total determinadas para los dos grupos de pacientes.

Hemos estudiado también la supervivencia en el total de pacientes, incluyendo a los casos con tumor irresecable. Así, hubo 28 (13,46 %) fallecimientos en los pacientes con B72.3 inferior a 45 U/ml y 5 (35,71 %) en los casos con niveles del marcador superiores a ese valor. En la FIGURA 15 puede apreciarse que también existió una diferencia significativa ( $P=0,0047$ ) entre las curvas de supervivencia total determinadas para los dos grupos de pacientes. Con un dintel de 6 U/ml el porcentaje de fallecimientos a causa de la enfermedad fue del 9,62 % en el grupo con marcador negativo y 22,98 % cuando este fue positivo. Igualmente, apreciamos una diferencia significativa ( $P=0,0006$ ) entre las curvas de supervivencia determinadas (FIGURA 16) para ambos grupos.

En nuestra población estudiada, el análisis univariante de otros factores pronósticos en el cáncer colorrectal reveló que el mayor estadio tumoral y los niveles séricos elevados de CEA estuvieron fuertemente asociados con una alta incidencia de recurrencias tumorales ( $P<0.0001$  en ambos casos) y una corta supervivencia ( $P>0.0001$  en ambos casos). Sin embargo, otros factores pronósticos clásicos como la edad, localización tumoral o grado histológico no alcanzan significación estadística (TABLAS 25 y 26). El análisis de regresión múltiple de Cox confirmó que los niveles séricos preoperatorios de CEA son un factor pronóstico independiente y el más potente, tras el estadio tumoral, para predecir el TLE y de supervivencia en nuestros pacientes con cáncer de colon. Sin embargo, los valores séricos preoperatorios de B72.3 no alcanzaron significación estadística en el análisis multivariante, tanto para predecir la supervivencia libre de enfermedad como la supervivencia total.

**Tabla 19.** Valores de B72.3 sérico preoperatorio en pacientes con cáncer colorrectal clasificados de acuerdo a sus diferentes características**B72.3 (U/ml)**

Características de los pacientes y tumores	Nº	Media $\pm$ DS	Mediana	Intervalo
Total	222	22.31 $\pm$ 2.23	3	3 - 11
Sexo:				
Varón	122	31.53 $\pm$ 185.80	3	3 - 1983
Mujer	100	11.06 $\pm$ 23.43	3	3 - 192
Localización:				
Colon derecho	40	25.82 $\pm$ 89.87	3	3 - 564
Colon izquierdo	79	36.30 $\pm$ 222.4	4	3 - 1983
Recto	103	10.21 $\pm$ 21.87	3	3 - 192
Estadio (Dukes)				
A	17	4.00 $\pm$ 2.23*	3	3 - 11
B	101	7.49 $\pm$ 13.11*	3	3 - 93
C	72	14.93 $\pm$ 66.28*	3	3 - 564
D	32	65.40 $\pm$ 346.5	23.5	3 - 1983
Grado histológico				
I	75	33.56 $\pm$ 228.3	3	3-1983
II	132	16.41 $\pm$ 53.20	3.5	3 -564
III	15	17.93 $\pm$ 26.90	7	3 - 93

\* P &lt; 0.001 vs Estadio D

**Tabla 20 .** Concentraciones de B72.3 sérico en cáncer colorrectal en función de la evolución postoperatoria

ESTADIO	Nº CASOS	MEDIA	MEDIANA	D.STANDARD	INTERVALO
NDE	129	3.79	3	4.69	1-50
ACTIVIDAD	23	12.82*	3	12.82	3-83
PROGRESION	38	22.31	11.5	25.89	3-100
TOTAL RECORRENCIAS	61	18.82	9	24.57	3-100

\* P &lt; 0,05 vs progresión

**Tabla 21** . Valores positivos de B72.3 sérico en cáncer colorrectal en función del estadio clínico y de los dinteles superior de normalidad y de actividad clínica

ESTADIO	N°CASOS	B72.3 (U/ml)		
		> 6U/ml	> 10 U/ml	< 15 U/ml
A	17	3	1	0
B	101	30	13	9
C	72	35	10	8
D	32	28	23	17
<b>TOTAL</b>	<b>222</b>	<b>87</b>	<b>48</b>	<b>35</b>
NDE	129	5	4	2
ACTIVIDAD	23	8	6	5
PROGRESION	38	28	20	14
TOTAL RECURRENCIAS	61	37	26	19
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	<b>283</b>	<b>124</b>	<b>74</b>	<b>54</b>

**Tabla 22.** Porcentajes de positividades de B72.3 sérico en cáncer colorrectal en función del estadio clínico y de los dinteles superior de normalidad y de actividad clínica

ESTADIO	Nº CASOS	> 6 U/ml	> 10 U/ml	ESTADIO
A	17	17.64	5.88	A
B	101	29.70	12.87	B
C	72	35.21	14.08	C
D	32	87.50	71.87	D
<b>TOTAL</b>	222	39.18	21.62	<b>TOTAL</b>
NDE	129	3.87	3.10	NDE
ACTIVIDAD	23	34.78	26.08	ACTIVIDAD
PROGRESION	38	73.68	52.63	PROGRESION
TOTAL RECURRENCIAS	61	60.65	42.62	TOTAL RECURRENCIAS
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	283	43.81	26.14	<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>

**Tabla 23.** Valores positivos de B72.3 ( $> 10$  U/ml) y CEA ( $> 6$  ng/ml) en cáncer colorrectal en función del estadio clínico

ESTADIO	N° CASOS	B72.3	CEA	B72.3 y/o CEA
<b>A</b>	17	1	2	2
<b>B</b>	101	13	29	33
<b>C</b>	72	10	25	25
<b>D</b>	32	23	25	28
<b>TOTAL</b>	222	48	82	89
NDE	129	4	4	6
ACTIVIDAD	23	6	16	17
PROGRESION	38	20	29	34
TOTAL RECURRENCIA	61	26	45	51
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	283	74	127	140

Tabla 24. Porcentaje de positividades de B72.3 y CEA en cáncer colorrectal en función del estadio clínico

ESTADIO	N° CASOS	B72.3	CEA	B72.3 y/o CEA
A	17	5.88	11.76	11.76
B	101	12.87	28.71	32.67
C	72	14.08	35.21	35.21
D	32	71.87	78.12	87.50
<b>TOTAL</b>	222	21.62	36.93	40.09
NDE	129	3.10	3.10	4.65
ACTIVIDAD	23	26.08	69.56	73.91
PROGRESION	38	52.63	76.31	89.47
TOTAL RECURRENCIAS	61	42.62	73.77	83.60
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	283	26.14	44.87	49.46

**Tabla 25.** Niveles séricos preoperatorios de B72.3 y pronóstico en 222 pacientes con cáncer colorrectal. (Dintel = 45 U/ml)

Factores analizados	Supervivencia libre de enfermedad		Supervivencia total	
	Valor de la P univariante	Valor de la P multivariante	Valor de la P univariante	Valor de la P multivariante
B72.3	0,0047	0.0205	0.0006	0.2412
CEA	<0,0001	0.0006	<0.0001	0.0067
EDAD	0.0401	0.3916	0.0149	0.1803
LOCALIZACION	0.0221	0.4615	0.5571	0.6362
GRADO HISTOLOGICO	0,1026	0,4868	0,2656	0,6026
ESTADIO	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0002

**Tabla 26.** Niveles séricos preoperatorios de B72.3 y pronóstico en 222 pacientes con cáncer colorrectal (Dintel = 6 U/ml)

Factores analizados	Supervivencia libre de enfermedad		Supervivencia total	
	Valor de la P univariante	Valor de la P multivariante	Valor de la P univariante	Valor de la P multivariante
B72.3	0.0007	0.2010	0.0006	0.2982
CEA	<0,0001	0.0001	<0,0001	0.0067
EDAD	0.0401	0.5784	0.0149	0.1803
LOCALIZACION	0.0221	0.3625	0.5571	0.6362
GRADO HISTOLOGICO	0,1026	0,3389	0,2856	0,6026
ESTADIO	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,0002

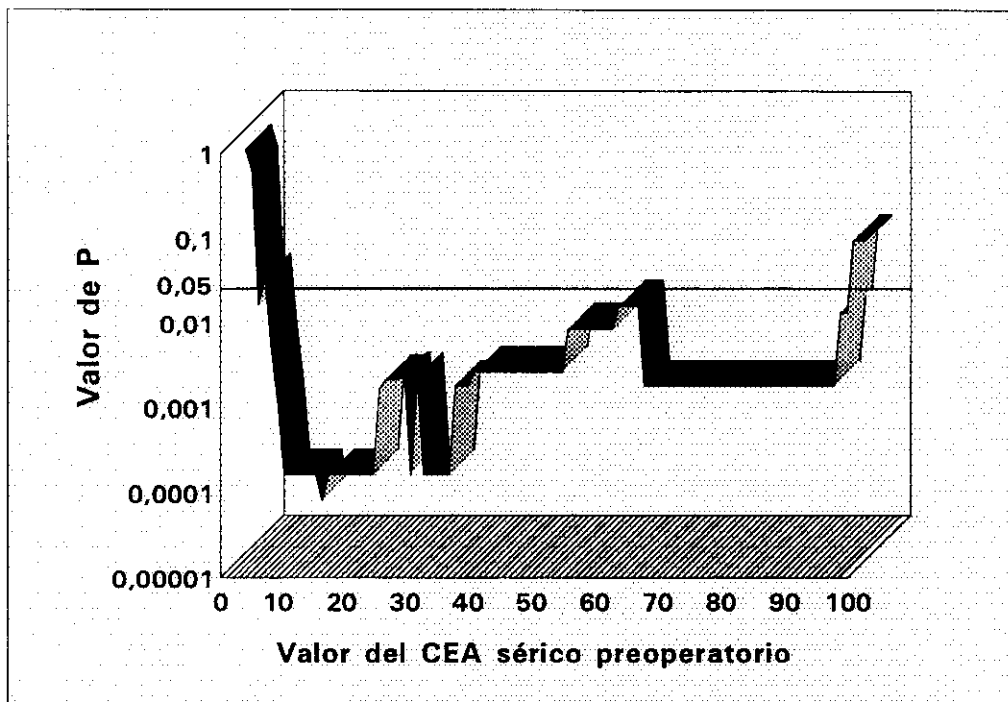


FIGURA 7.  
 Determinación del valor óptimo de CEA sérico preoperatorio para predecir la supervivencia libre de enfermedad en el cáncer colorrectal resecable. La significación en el nivel  $p < 0,05$  está indicada por la línea horizontal

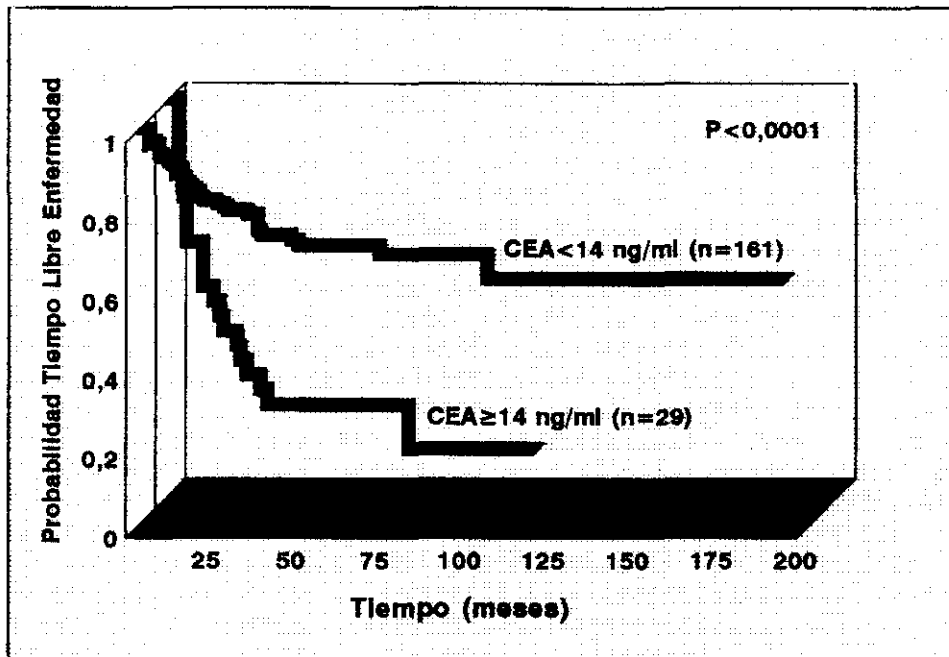


FIGURA 8.  
Tiempo libre de enfermedad en función de los niveles séricos preoperatorios de CEA en pacientes con cáncer colorrectal resecable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p < 0,0001$

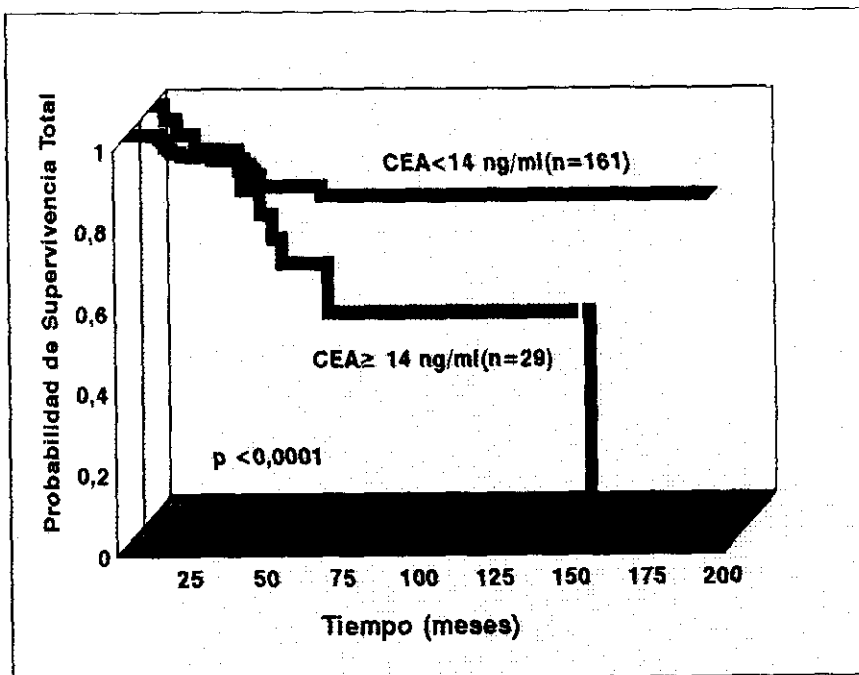


FIGURA 9. Probabilidad de supervivencia total en función de los niveles séricos preoperatorios de CEA en pacientes con cáncer colorrectal resecable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p < 0,0001$

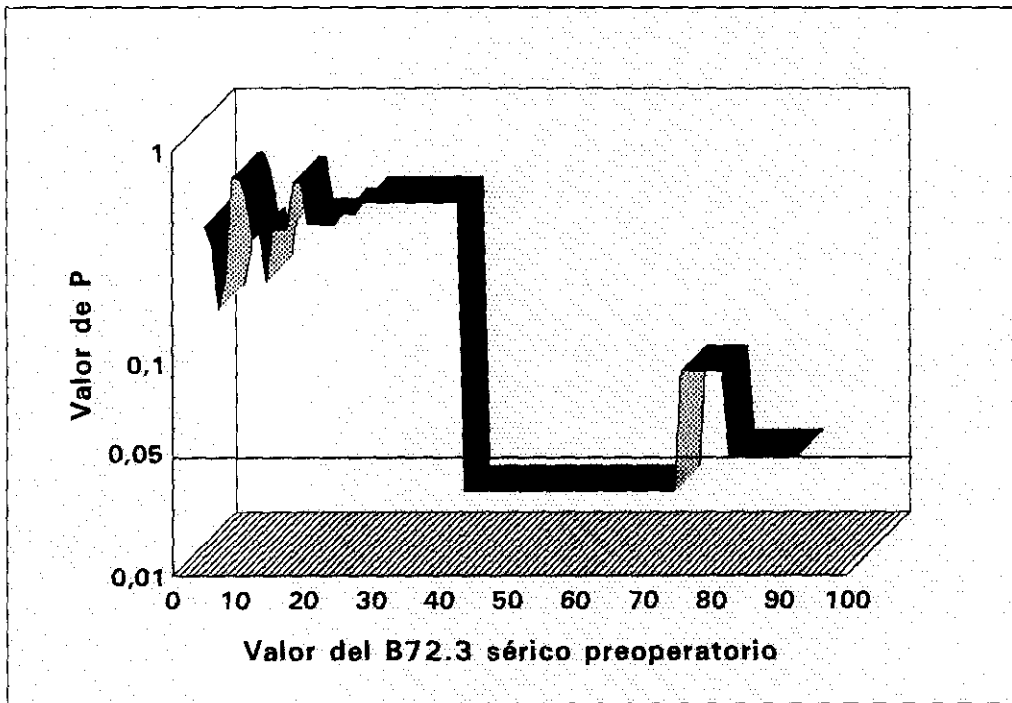


FIGURA 10.  
Determinación del valor óptimo de B72.3 sérico preoperatorio para predecir la supervivencia libre de enfermedad en el cáncer colorrectal resecable. La significación en el nivel  $p < 0,05$  está indicada por la línea horizontal

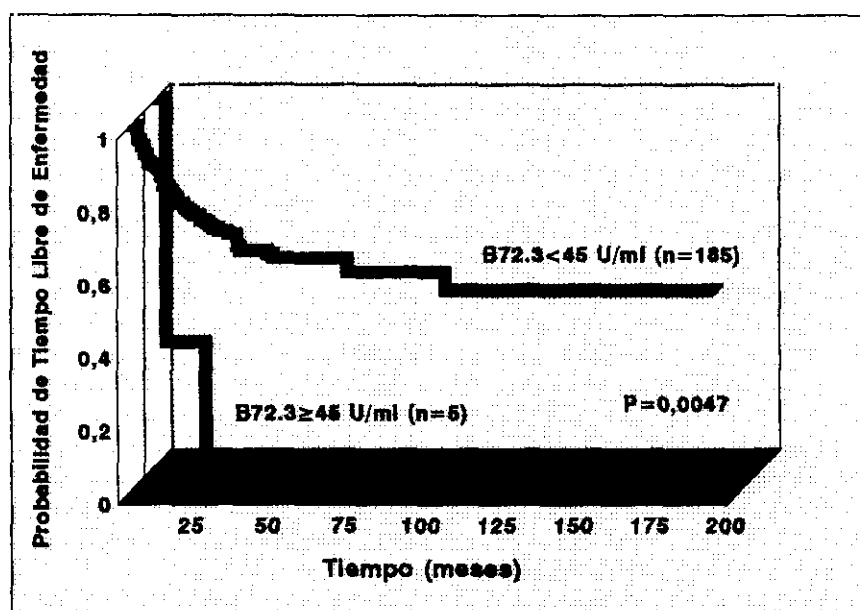


FIGURA 11.  
Tiempo libre de enfermedad en función de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en pacientes con cáncer colorrectal resecable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p=0,0047$

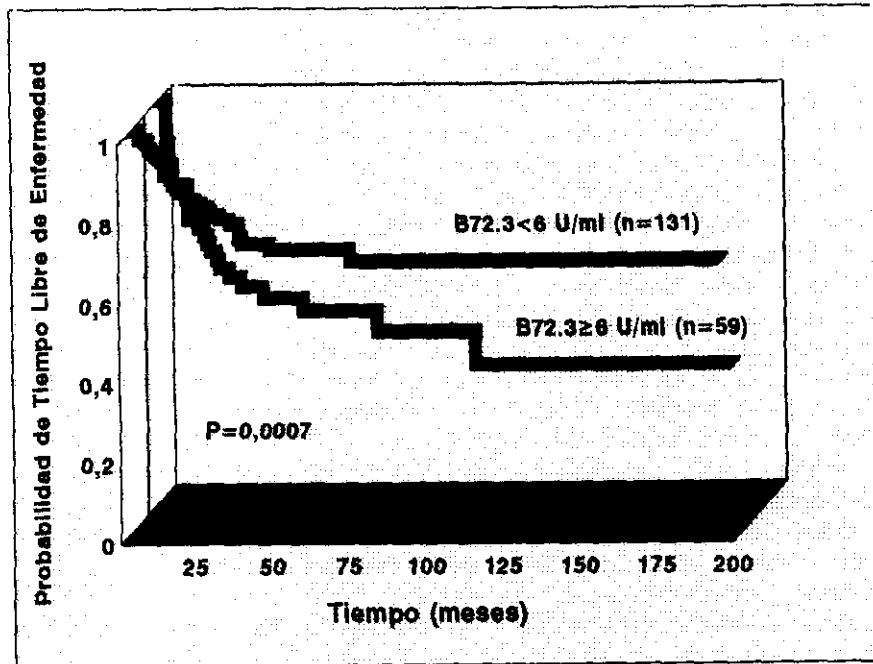


FIGURA 12.  
Tiempo libre de enfermedad en función de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en pacientes con cáncer colorrectal resecable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p=0,0007$

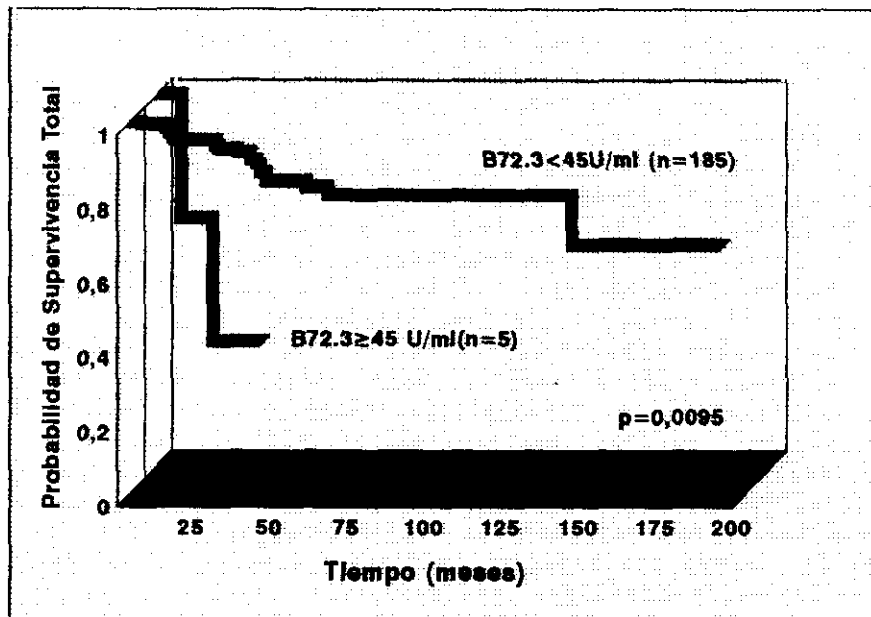


FIGURA 13.

Probabilidad de supervivencia total en función de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en pacientes con cáncer colorrectal resecable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p=0,0095$

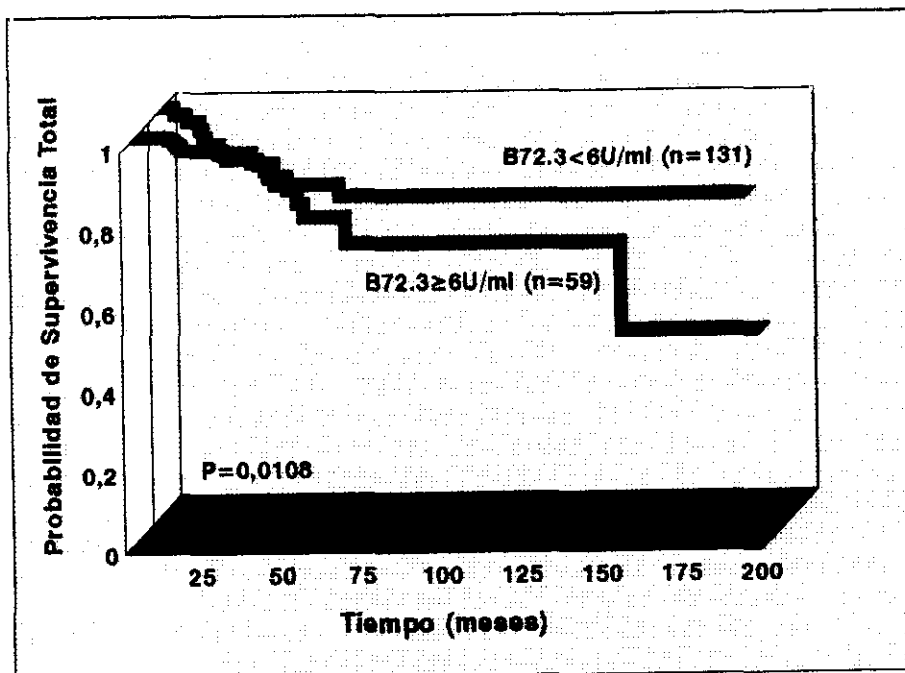


FIGURA 14. Probabilidad de supervivencia total en función de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en pacientes con cáncer colorrectal reseccable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p=0,0108$

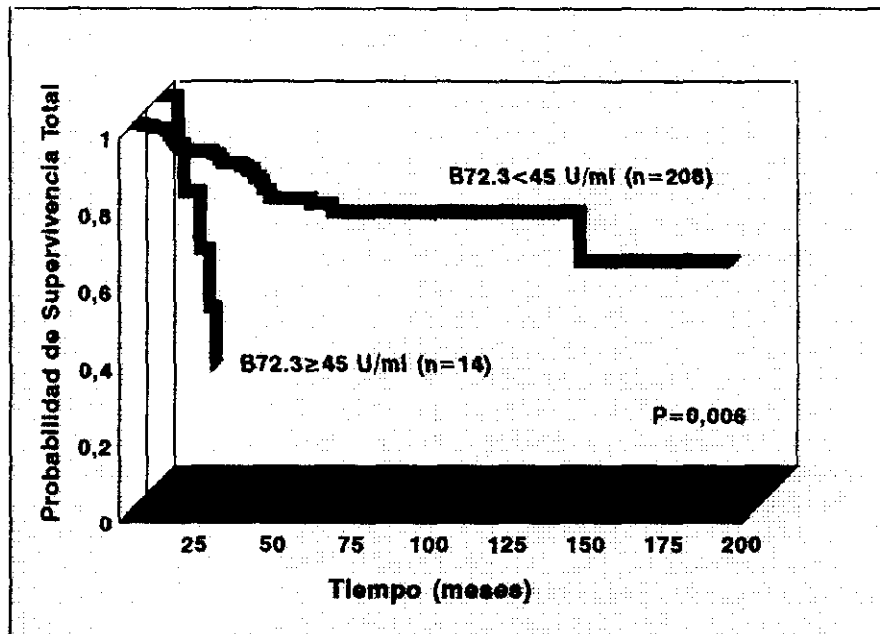


FIGURA 15.  
Probabilidad de supervivencia total en función de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en pacientes con cáncer colorrectal resecable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p=0,006$

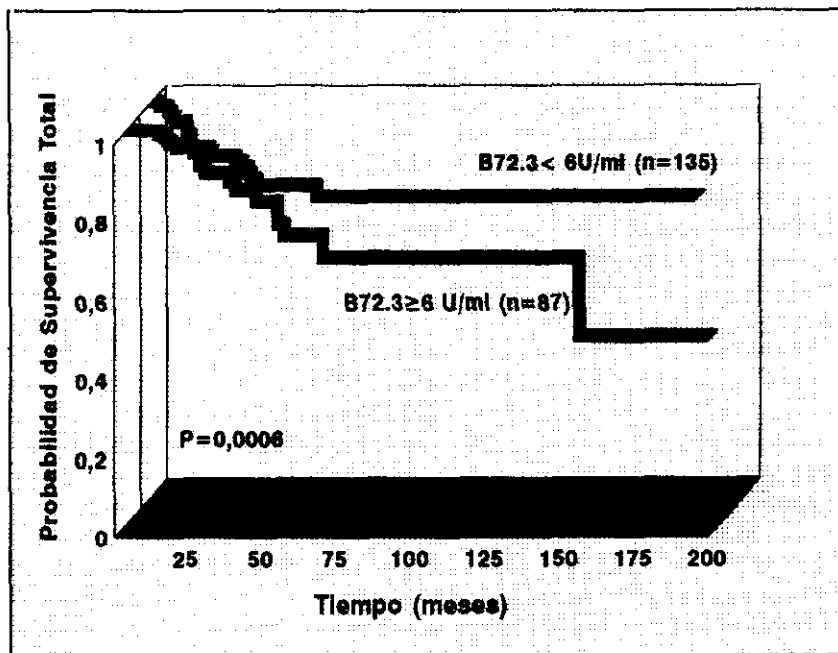


FIGURA 16.

Probabilidad de supervivencia total en función de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en pacientes con cáncer colorrectal reseccable. Las diferencias entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad fueron significativas al nivel  $p=0,0006$

### **6.5.- CANCER DE ESOFAGO**

Este grupo está integrado por 43 pacientes (41 varones y 2 mujeres) con edades comprendidas entre los 33 y 80 años ( $60 \pm 10,5$ ) y diagnosticados de carcinoma epidermoide de esófago. De ellos, el tumor fue resecable en 22 casos.

En la TABLA 27 y 28 están representadas las concentraciones séricas pretratamiento del B72.3 en relación a las características de los pacientes y tumores. El valor medio global fue de  $9,48 \pm 14,25$  U/ml (intervalo: 1-74), y la mediana de 3 U/ml. No existieron diferencias significativas de los niveles séricos preoperatorios del marcador en relación al sexo, estadio, grado histológico o localización del tumor.

Durante el periodo de seguimiento clínico (tiempo medio de  $13 \pm 11,3$  meses; intervalo: 1-60), solamente 3 pacientes estaban libres de enfermedad, mientras que en 40 se detectó la existencia de tumor. De estos, 21 casos co-

rrespondían a enfermedad avanzada desde el momento del diagnóstico y 19 a recurrencia tumoral.

Las TABLAS 29 y 30 representan el número y porcentaje de casos positivos. Así, en el grupo pretratamiento, el porcentaje de positividad global fue del 23,2 % cuando consideramos un dintel de 10 U/ml y del 30,2 % si éste era de 6 U/ml. En los 19 casos de recurrencia, el porcentaje de positividad del marcador fue muy similar, mientras que no se detectó ningún falso positivo, presentando valores inferiores a 6 U/ml los pacientes libres de enfermedad.

Como puede apreciarse en las TABLAS 31 y 32, determinamos también las concentraciones séricas pre y postoperatorias del CEA con objeto de comparar ambos marcadores, registrándose un número muy similar de casos positivos en ambas situaciones. Por otra parte, considerando el total de pacientes con enfermedad, el B72.3 mostró una sensibilidad del 29% y el CEA del 19,3 %. Combinando ambos, el porcentaje ascendió al 32,2%.

En este estudio, el análisis del valor diagnóstico del B72.3 sérico en el cáncer de esófago, dio los siguientes resultados: Especificidad: 100 %; sensibilidad: 29 %; Valor Predictivo Positivo: 100 %; Valor Predictivo Negativo 6,3 %.

Debido al reducido número de casos no hemos realizado una valoración de la significación pronóstica del B72.3 sérico en estos tumores.

**Tabla 27.** Valores de B72.3 sérico en pacientes con cáncer de esófago clasificados de acuerdo a sus diferentes características

		B72.3 (ng/ml)			
Características de los pacientes y tumores		N°	Media $\pm$ DS	Mediana	Intervalo
Total tumores		43	9,48 $\pm$ 14,25	3	1 - 74
Sexo:					
Varón		41	9,85 $\pm$ 14,5	3	1 - 74
Mujer		2	2 $\pm$ 1,41	2	1 - 3
Localización esofágica					
Superior		4	5,75 $\pm$ 4,27	4	3 - 12
Medio		20	8,3 $\pm$ 10,88	3	3 - 37
Inferior		19	11,52 $\pm$ 18,35	3	1 - 74
Estadio:					
I		2	-	3	-
II		11	8,27 $\pm$ 8,74	3	1 - 31
III		15	10,27 $\pm$ 19,68	3	1 - 74
IV		15	10,46 $\pm$ 12,58	3	3 - 74
Grado histológico					
I		9	6,55 $\pm$ 6,48	3	3 - 21
II		26	8,432 $\pm$ 11,34	3	1 - 44
III		8	16,25 $\pm$ 25,37	3	1 - 74

**Tabla 28.** Concentraciones de B72.3 sérico en cáncer de esófago en función de la evolución postoperatoria

ESTADIO	N° CASOS	MEDIA	MEDIANA	D.STANDARD	INTERVALO
NDE	3	-	3	-	-
TOTAL RECURRENTIAS	19	38,15	3	136,3	3 - 600

**Tabla 29.** Valores positivos de B72.3 sérico en cáncer de esófago en función del estadio clínico y de los dinteles superior de normalidad y de aplicación clínica

ESTADIO	N° CASOS	B72.3 (U/ml)		
		> 6 U/ml	> 10 U/ml	> 15 U/ml
I	2	0	0	0
II	11	5	4	1
III	15	3	2	2
IV	15	5	4	4
<b>TOTAL</b>	<b>43</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>7</b>
RECIDIVA	19	5	5	3
NDE	3	0	0	0
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	<b>62</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>10</b>

**Tabla 30.** Porcentaje de positividades de B72.3 en cáncer de esófago en función del estadio clínico

ESTADIO	N° CASOS	> 6 U/ml	> 10 U/ml	> 15 U/ml
I	2	-	-	-
II	11	45,45	36,36	9,09
III	15	20	13,33	13,33
IV	15	33,33	26,66	26,66
<b>TOTAL</b>	<b>43</b>	<b>30,23</b>	<b>23,25</b>	<b>16,27</b>
RECIDIVA	19	26,31	26,31	15,78
NDE	3	-	-	-
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	<b>62</b>	<b>29,03</b>	<b>24,19</b>	<b>16,12</b>

**Tabla 31.** Valores positivos de B72.3 (> 10 U/ml) y CEA (>6 ng/ml) en cáncer de esófago en función del estadio clínico y evolución

ESTADIO	Nº CASOS	B72.3	CEA	B72.3 y/o CEA
I	2	0	0	0
II	11	4	1	4
III	15	2	5	6
IV	15	4	3	5
<b>TOTAL</b>	<b>43</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>15</b>
RECIDIVA	19	5	3	5
NDE	3	0	0	0
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	<b>62</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>20</b>

**Tabla 32.** Porcentaje de positividad de B72.3 y CEA en cáncer de esófago en función del estadio clínico y evolución

ESTADIO	Nº CASOS	B72.3	CEA	B72.3 y/o CEA
I	2	-	-	-
II	11	36,36	9,09	36,36
III	15	13,33	33,33	40
IV	15	26,66	20	33,33
<b>TOTAL</b>	<b>43</b>	<b>23,25</b>	<b>20,93</b>	<b>34,88</b>
RECIDIVA	19	26,31	15,78	26,31
NDE	3	-	-	-
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	<b>62</b>	<b>29,03</b>	<b>19,35</b>	<b>32,25</b>

## 6.6. CANCER DE PANCREAS

Este grupo está integrado por 19 pacientes (8 varones y 11 mujeres) de edades comprendidas entre los 36 y 89 años ( $65,2 \pm 12,3$ ) y diagnosticados de adenocarcinoma de páncreas. De ellos, el tumor fue resecable en 10 casos.

En la TABLA 33 y 34 están representadas las concentraciones séricas pretratamiento del B72.3 en relación a las características de los pacientes y tumores. El valor medio global fue de  $43,8 \pm 123,12$  U/ml (intervalo: 1-541), y la mediana de 5 U/ml. No existieron diferencias significativas de los niveles séricos preoperatorios del marcador en relación al sexo o grado histológico. Sin embargo, se apreció una mayor elevación de los niveles de B72.3 en los estadios más avanzados de la enfermedad, aunque sin alcanzar significación estadística, probablemente debido al corto número de casos.

Durante el periodo de seguimiento clínico (tiempo medio de  $10,6 \pm 12,3$  meses; intervalo: 1-52), solamente 4 pacientes estaban libres de enfermedad, mientras que en 15 se constató la existencia de tumor. De ellos, 11 casos correspondían a enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico y 6 a recurrencia tumoral.

Las TABLAS 35 y 36 representan el número y porcentaje de casos positivos. Así, en el grupo pretratamiento, el porcentaje de positividad global fue

del 47,36 % cuando consideramos un dintel de 6 U/ml y del 31,57 % si éste era de 10 U/ml. En los 6 casos de recurrencia tumoral, el porcentaje de positividad del marcador fue del 50 % cuando consideramos un LSN de 6 U/ml y del 33,3 % si el dintel era de 10 U/ml, mientras que no se detectó ningún falso positivo, presentando valores inferiores a 6 U/ml los pacientes libres de enfermedad.

Como puede apreciarse en las TABLAS 37 y 38, determinamos también las concentraciones séricas pre y postoperatorias del CEA con objeto de comparar el comportamiento de ambos marcadores tumorales en el cáncer de páncreas, registrándose un porcentaje de positivities muy similar en ambas situaciones (CEA preoperatorio superior a 6 ng/ml en el 42 % y un 50 % en caso de recurrencia tumoral). Por otra parte, considerando el conjunto de pacientes con enfermedad, el B72.3 mostró una sensibilidad del 32 % (para un dintel de 10 U/ml), y el CEA del 44 % . Combinando ambos el porcentaje ascendió al 60 %.

En este estudio, el análisis del valor diagnóstico del B72.3 sérico mostró los siguientes resultados: Especificidad: 100 %; sensibilidad: 32 %; Valor Predictivo Positivo: 100 %; Valor predictivo Negativo: 19 %.

Debido al reducido número de casos, no hemos realizado una valoración de la significación pronóstica del B72.3 sérico en estos tumores.

**Tabla 33.** Concentraciones séricas pretratamiento de B72.3 en cáncer de páncreas en relación a las características de los pacientes y tumores

Características de los pacientes y tumores	Nº	Media $\pm$ DS	Mediana	Intervalo
Total	19	43.78 $\pm$ 123.12	5	1 - 541
Sexo:				
Varón	8	90.87 $\pm$ 185.62	5,5	2 - 541
Mujer	11	9.54 $\pm$ 10.19	5	1 - 29
Estadio				
I	7	5.14 $\pm$ 5.11	3	3 - 11
II	1	-	-	-
III	7	17.14 $\pm$ 23.68	3	2 - 67
IV	4	168.25 $\pm$ 251,8	64.5	3 - 541
Grado histológico				
I	4	5,5 $\pm$ 1,9	6	3- 7
II	12	58.25 $\pm$ 153.26	3	3 - 541
III	3	37 $\pm$ 54.6	3	3 - 100

**Tabla 34.** Concentraciones de B72.3 sérico en cáncer de páncreas en función de la evolución postoperatoria

ESTADIO	Nº CASOS	MEDIA	MEDIANA	D.STANDARD	INTERVALO
NDE	4	5,75	3	6,89	1-16
RECIDIVA	6	8	3	10	3-28

**Tabla 35.** Valores positivos de B72.3 (>10 U/ml) y CEA (>6 ng/ml) en cáncer de páncreas en función del estadio clínico y evolución

ESTADIO	N° CASOS	B72.3 (U/ml)		
		> 6U/ml	> 10 U/ml	> 15 U/ml
I	7	2	1	1
II	1	0	0	0
III	7	4	2	2
IV	4	3	3	3
<b>TOTAL</b>	19	9	6	6
RECIDIVA	6	3	2	2
NDE	4	0	0	0
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	25	12	8	8

**Tabla 36.** Porcentaje de positividades de B72.3 sérico en cáncer de páncreas en función del estadio clínico y evolución

ESTADIO	N° CASOS	> 6U/ml	> 10 U/ml	> 15 U/ml
I	7	28,5	14,2	14,2
II	1	-	-	-
III	7	57,1	28,5	28,5
IV	4	75	75	75
<b>TOTAL</b>	19	47,3	31,5	31,5
RECIDIVA	6	50	33,3	33,3
NDE	4	-	-	-
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	25	48	32	32

**Tabla 37.** Valores positivos de B72.3 (>10 U/ml) y CEA (> 6 ng/ml) en cáncer de páncreas en función del estadio clínico y evolución

ESTADIO	Nº CASOS	B72.3	CEA	B72.3 y/o CEA
I	7	1	1	1
II	1	0	0	-
III	7	2	4	5
IV	4	3	3	5
<b>TOTAL</b>	19	6	8	11
RECIDIVA	6	2	3	4
NDE	4	0	0	0
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	25	8	11	15

**Tabla 38.** Porcentaje de positividades de B72.3 y CEA en cáncer de páncreas en función del estadio clínico y evolución

ESTADIO	Nº CASOS	B72.3	CEA	B72.3 y/o CEA
I	7	14,2	14,2	14,2
II	1	-	-	-
III	7	28,5	57,1	71,4
IV	4	75	75	100
<b>TOTAL</b>	19	31,5	42,1	57,8
RECIDIVA	6	33,3	50	66,6
NDE	4	-	-	-
<b>TOTAL ENFERMEDAD</b>	25	32	44	60

## **7. DISCUSION**

## 7.1. CONTROLES

En nuestro grupo control (109 casos), las concentraciones séricas de B72.3 oscilaron entre 3 y 8, 1 U/ml, siendo la media de  $3,24 \pm 0,79$  U/ml y la mediana de 3 U/ml.

En un estudio realizado previamente<sup>(111)</sup> consideramos como Límite Superior Provisional de la Normalidad la cifra de 5 U/ml, que corresponde prácticamente a la media  $\pm 2$  ds. Posteriormente, establecimos el Límite Superior de Normalidad (LSN) en 6 U/ml, que representa el 97,5 percentil.

Nuestros valores son inferiores a los descritos por Klug<sup>(83)</sup> y Sagredo<sup>(103)</sup> y superiores a los establecidos por otros autores<sup>(88,112,113,114)</sup>. En la TABLA 39 presentamos los valores obtenidos por distintos autores en sus grupos controles.

TABLA 39. Resultados de B72.3 sérico en grupo control según diversos autores

GRUPO	LSN (U/ml)	MEDIA±DS
KLUG (83)	10	1,83 ± 2,03
PATERSON (88)	5,6	2,30 ± 3,00
SAGREDO (103)	6,5	1,83 ± 2,03
FATEH-MOGHADAM(112)	3	-
HEPTNER(113)	4	3,20 ± 1,20
BYRNE(114)	4,4	-
GERO (115)	6	-
NUESTRO GRUPO (111)	6	3,24 ± 0,79

No encontramos, al igual que otros autores<sup>(83)</sup>, diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones séricas de B72.3 en relación a la edad, sexo y hábito tabáquico.

## 7.2. PATOLOGIAS BENIGNAS

En nuestro estudio, la concentración media de B72.3 sérico en patologías benignas fue de  $3,86 \pm 3,62$  U/ml ( $i=0,5-50$ ). Las patologías digestivas presentaron una media de  $3,93 \pm 4,11$  U/ml ( $i=1-50$ ), ligeramente superior a las no digestivas, cuya media fue de  $3,78 \pm 3,04$  U/ml ( $i=0,5-28,7$ ). Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos por Ohuchi y cols.<sup>(116,117)</sup> que citan una media de 2,7 U/ml en patologías benignas digestivas.

El porcentaje de positividad de B72.3 sérico (LSN de 6 U/ml) en el total de patologías benignas fue del 6,63 %, inferior a los hallados por Ohuchi y cols. (7,5 y 10 % con LSN de 4 U/ml) en sus series<sup>(116,117)</sup>. Dentro de las patologías benignas, las digestivas presentaron un porcentaje de positividad del 6,55 %, similar a las no digestivas (6,72 %). Este porcentaje, es similar al obtenido por Gero y cols.<sup>(115)</sup> que señalan un 6,70 % (LSN de 6 U/ml), y superior al 2 % de positividad hallado por Heptner y cols.<sup>(113)</sup>, para un LSN de 4 U/ml.

Considerando las patologías benignas digestivas y sus respectivas localizaciones, el mayor número de falsos positivos se registraron en las patologías gastrointestinales (8,28 %), seguidas de las pancreáticas (7,14 %), biliares (5,88 %) y hepáticas (4,89 %). Estos datos son semejantes a los obtenidos por Heptner y cols.<sup>(113)</sup> que refieren solamente 8 falsos positivos de 410 pacientes con patología digestiva benigna, correspondiendo un caso a pancreatitis crónica sin colestasis, uno a coledocolitiasis, 5 a Enfermedad de Crohn activa y uno a colitis ulcerosa.

En este sentido, en la serie presentada por Klug y cols.<sup>(83)</sup> menos del 4 % de los pacientes con enfermedades benignas gastrointestinales mostraron niveles séricos del marcador superiores a 20 U/ml. Al restringir la consideración a las enfermedades benignas colorrectales, la especificidad del B72.3 sérico fue casi del 100 %. Sin embargo, esta perfecta especificidad parece improbable teniendo en cuenta que, en estudios inmunohistoquímicos, se ha encontrado reactividad focal con el B72.3 dentro de áreas de atipia glandular en algunas lesiones inflamatorias crónicas del intestino, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Precisamente en estas enfermedades, estos autores han encontrado también niveles séricos elevados de TAG-72, aunque con una frecuencia mucho menor que la reseñada para las áreas reactivas con el B72.3. La razón de esta discordancia suero/tejido no está clara, pero podría estar en relación con las diferencias existentes en la liberación del antígeno desde lesiones benignas frente a lesiones premalignas o malignas. Así, la TAG-72 en enfermedades benignas, puede liberarse en gran parte dentro de la luz intestinal, mientras que en los procesos malignos podría escapar de esta estricta compartimentalización y liberarse a la luz vascular.

De forma similar, en nuestro estudio, la mayoría de los falsos positivos hallados en el grupo de enfermedades gastrointestinales benignas correspondieron a procesos inflamatorios (5 a E. de Crohn y 2 a Colitis Ulcerosa), excepto dos casos de pólipos adenomatosos de colon.

Por otra parte, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en las positivities del B72.3 sérico entre patologías digestivas y no digestivas. Si del total de patologías benignas excluimos las ginecológicas y mamarias, solamente el 5,62 % de los pacientes superan el dintel de 6 U/ml y el 2,8 % las 10 U/ml. Así, las posibilidades de encontrar valores superiores a 10 U/ml son del 2,8 % para patologías digestivas y del 0 % para las no digestivas. Podemos pues considerar un Dintel de Actividad Clínica de 10 U/ml que proporciona una especificidad del 97 %, similar a la reseñada por otros autores<sup>(83,112,113,118 y 119)</sup>.

### 7.3. CANCER GASTRICO

El cáncer de estómago, aunque parece que su frecuencia tiende a disminuir a nivel mundial, sigue siendo una de las neoplasias más comunes, ocupando el tercer lugar en orden de frecuencia entre los tumores digestivos <sup>(120)</sup>.

En España, la tasa de mortalidad por cáncer de estómago es elevada, siendo superada únicamente por la del cáncer de pulmón en los varones y el de mama en las mujeres <sup>(121)</sup>. En Asturias, lugar de donde proceden los pacientes incluidos en nuestro estudio, la mortalidad por cáncer gástrico supera el 17,8 x 100.000 habitantes<sup>(122)</sup>.

A pesar de los avances logrados en las últimas décadas, los resultados en el tratamiento de estos tumores no son satisfactorios, y su pronóstico sigue siendo infausto. Así, en la última década, aunque ha aumentado el índice de resecabilidad, que oscila entre el 68 y 80 %, y ha disminuido la mortalidad operatoria del 14 al 6 %, la supervivencia global a los 5 años no ha variado, oscilando entre el 8 y el 15 % <sup>(123)</sup>.

Aunque estas cifras son poco alentadoras, no cabe duda que la cirugía sigue siendo el pilar fundamental en el tratamiento del cáncer de estómago. El camino para superar estos resultados depende, en primer lugar, de un diagnóstico precoz, y en segundo término, de un mejor control postoperatorio

de los pacientes con el fin de detectar lo antes posible la aparición de recidivas o de metástasis, susceptibles de tratamiento quirúrgico.

En este sentido, los Marcadores Tumorales tendrían un campo de aplicación de gran interés, si bien los resultados prácticos en el cáncer gástrico son más bien escasos. Para explicar este hecho se ha invocado la peculiar cinética secretora de las células neoplásicas en estos tumores, especialmente si se comparan con los cánceres colorrectales<sup>(124)</sup>, así como una serie de condiciones bioquímicas íntimamente ligadas a ellos. La existencia de una heterogenicidad celular en el cáncer gástrico añade una nueva dimensión en la cinética de las poblaciones celulares tumorales y condiciona importantes implicaciones en la respuesta terapéutica. Así, en la evolución natural del cáncer gástrico, esa heterogenicidad celular implica la existencia de diferentes subpoblaciones clonales, de las cuales una subpoblación es la dominante. El rechazo y/o destrucción de la subpoblación dominante, permite la proliferación de las otras subpoblaciones, convirtiéndose éstas en dominantes. Si como sucede habitualmente en la práctica clínica, no se consigue el objetivo terapéutico de erradicar totalmente la enfermedad tumoral, la evolución de la heterogenicidad celular hace muy difícil la curación. Sin embargo, sea cual sea la causa, la obtención de marcadores tumorales útiles en el diagnóstico y seguimiento del cáncer gástrico, constituye un tema de gran actualidad. Por otra parte, a la hora de valorar los resultados obtenidos, hay que considerar su aplicación no sólo en el diagnóstico y seguimiento, sino también su interés como posible factor pronóstico.

### 7.3.1. B72.3 COMO PARAMETRO DIAGNOSTICO

Entre las aplicaciones diagnósticas de los MT se incluye no solamente el análisis sérico para determinar las concentraciones de antígeno circulante, sino también, técnicas inmunohistoquímicas que permiten obtener información acerca del fenotipo y diferenciación celular en base a la expresión del antígeno específico de superficie. En este sentido, diversos autores<sup>(125,126)</sup> han encontrado reactividad para la TAG-72 en el 97% de los adenocarcinomas gástricos. Además, todos los early-cancer estudiados fueron inmunopositivos para este antígeno, aunque en menor porcentaje que los cánceres avanzados. También detectaron expresión del antígeno TAG-72 en lesiones benignas con metaplasia intestinal, así como en lesiones displásicas. Esta reactividad selectiva para adenocarcinomas gástricos y lesiones precancerosas versus tejido gástrico normal, puede ser de gran utilidad para la detección precoz y seguimiento del cáncer gástrico humano.

A la vista de estos alentadores resultados, y por su aceptable costo económico e inocuidad, merece especial atención el análisis sérico de las concentraciones del antígeno TAG-72 definido por el anticuerpo monoclonal B72.3. El principal problema con que nos encontramos al estudiar el comportamiento sérico de un MT como parámetro diagnóstico en los diferentes tumores, radica en sus falsos positivos con otras patologías no tumorales. Por ello, es regla común establecer un segundo dintel de actividad, que nos va a permitir conseguir una mayor especificidad. Por esa razón, en las diferentes tablas introducimos más de un dintel cuantitativo. Además, teniendo en cuenta también que el porcentaje de positividades para cada tipo de neoplasia varía en función del dintel considerado por los distintos autores. En relación al B72.3, el valor dintel que permite optimizar la especificidad con una buena sensibilidad tumoral en el cáncer gástrico varía entre 3 U/ml<sup>(112)</sup> y 10 U/ml<sup>(83)</sup> según los diferentes autores.

En nuestro estudio, tras analizar el comportamiento sérico del B72.3 en un grupo control y con patologías benignas, hemos establecido inicialmente

un Límite Superior de Normalidad (LSN) de 6 U/ml<sup>(111)</sup>, que representa el 97,5 percentil. Posteriormente, hemos considerado un segundo Dintel de Aplicación Clínica (DAC) de 10 U/ml, superado solamente por el 3,4 % del global de pacientes con enfermedades benignas y por el 2,8 % si excluimos las patologías ginecológicas y mamarias.

En relación a las concentraciones séricas preoperatorias de la TAG-72, Heptner G. y cols.<sup>(113)</sup>, en un grupo de 27 pacientes con adenocarcinoma gástrico detectaron una sensibilidad del 29 % en pacientes con estadio tumoral I-II y del 59 % cuando existían metástasis a distancia. Además, Ohuchi N. y cols.<sup>(116,117)</sup>, también han encontrado niveles séricos elevados del antígeno TAG-72 en el 48 % de 56 pacientes con cáncer gástrico. Resultados similares han sido publicados por otros autores<sup>(114,115,118,119,127,129,130)</sup>.

En nuestro estudio, la especificidad del B72.3 sérico en el cáncer gástrico, y en relación al grupo de enfermedades gástricas benignas, fue del 99%. La sensibilidad global, considerando como LSN el valor de 6 U/ml, fue del 31 %. Además, analizando su valor diagnóstico cualitativo, comprobamos una elevación significativa del B72.3 respecto a los valores referenciados como patrones. Así, los pacientes con estadio I presentaron unos niveles séricos de la TAG-72 significativamente más bajos ( $P < 0,05$ ) en relación a los pacientes con estadios tumorales superiores, elevándose la sensibilidad del marcador al 77 % en el estadio IV, mientras que en los pacientes con estadios I-II fue del 33%. Así mismo, también observamos una asociación significativa entre los niveles séricos preoperatorios del antígeno y el grado de diferenciación tumoral, con valores significativamente más bajos ( $P < 0,01$ ) en los tumores bien diferenciados, que en aquellos moderada o pobremente diferenciados. Por otra parte, registramos un descenso significativo ( $P < 0,001$ ) de las concentraciones séricas del marcador tras la exéresis quirúrgica del tumor primario, poniendo en evidencia su utilidad para constatar la radicalidad de la resección oncológica.

Así pues, de todo lo anterior, podemos afirmar que el B72.3 sérico en el cáncer gástrico tiene una elevada especificidad (99 %) y una sensibilidad creciente de acuerdo con el estadio clínico, con un porcentaje de positividad

situado entre el 25 y 33 % en los cánceres gástricos sin metástasis distantes, mientras que éste oscila entre el 66 y 77 % cuando existe diseminación, considerando siempre un segundo dintel cuantitativo (DAC 10 U/ml) superior al límite máximo de normalidad (LSN 6 U/ml) y, además, existe una correlación con el grado de diferenciación histológica del tumor.

### **7.3.2. B72.3 Y SEGUIMIENTO**

Un aspecto de interés práctico reside en clasificar los tumores gástricos en función de la existencia o no de metástasis a distancia con el fin de lograr establecer un dintel de actividad clínica útil en el seguimiento de los pacientes. De los 88 pacientes con cáncer gástrico incluidos en nuestro estudio en 75 el tumor fue resecable (85 %). Durante el seguimiento postoperatorio de estos pacientes no detectamos ningún falso positivo siendo las concentraciones séricas de B72.3 inferiores a 6 U/ml en todos los pacientes libres de enfermedad. Por otra parte, registramos 13 falsos negativos en el grupo que presentó recurrencia tumoral, con un mayor porcentaje en los pacientes con recidiva locoregional en relación a los que presentaron metástasis a distancia. Así, un B72.3 sérico normal indicó ausencia de enfermedad en el 76,8 % de los casos. Por el contrario, un B72.3 sérico elevado se apreció en el 60,6 % de los pacientes con recurrencia tumoral, con un 69,5 % de positividades cuando existía diseminación a distancia y un 40 % en caso de recidiva local.

Nuestro índice de resecabilidad (85 %) se ajusta al descrito por la mayor parte de los autores<sup>(123)</sup>. Del análisis de nuestros resultados obtenemos la conclusión de que el B72.3 presenta una alta especificidad (100 %) en el cáncer gástrico, con una sensibilidad del 60 % en pacientes con recurrencia tumoral, cifra que coincide con la aportada por otros autores<sup>(131)</sup>. Todo ello

parece indicar que este marcador es de utilidad en el seguimiento de los carcinomas gástricos<sup>(131)</sup>.

### 7.3.3. B72.3 COMO FACTOR PRONOSTICO

Para algunos autores<sup>(132)</sup>, el empleo de marcadores tumorales en el seguimiento de los pacientes intervenidos con criterios de radicalidad tiene solamente un interés meramente biológico a causa de que la recurrencia del cáncer gástrico es generalmente incurable. Sin embargo, el nivel sérico preoperatorio puede tener valor pronóstico y, por tanto, ser clínicamente útil para seleccionar pacientes de alto riesgo susceptibles de recibir tratamiento adyuvante.

En nuestro estudio, hemos tratado de evaluar la significación pronóstica de los niveles séricos preoperatorios del B72.3 en el cáncer gástrico. El análisis del tiempo libre de enfermedad y de supervivencia reveló que los valores séricos elevados del antígeno TAG-72 estuvieron significativamente asociados con un menor tiempo libre de enfermedad y una menor supervivencia. La búsqueda del dintel óptimo de los niveles séricos de B72.3 para predecir el tiempo libre de enfermedad en 75 pacientes con cáncer gástrico resecable, condujo a la definición de un valor de 20 U/ml. Este identificó a un 13,6 % de pacientes con cifras elevadas de TAG-72 y un mal pronóstico.

No hemos encontrado en la literatura revisada ningún estudio prospectivo sobre el comportamiento del B72.3 sérico como factor pronóstico en el cáncer gástrico. Como era de esperar, existen niveles séricos más elevados del marcador en los estadios avanzados de la enfermedad, al igual que ocurre con otros marcadores tumorales empleados de forma rutinaria en la práctica clínica. Si embargo, en nuestro estudio, el análisis de regresión múltiple de Cox confirmó que el B72.3 sérico (20 U/ml) es un factor pronóstico inde-

pendiente, y el más potente tras el estadio del tumor, para predecir el tiempo libre de enfermedad ( $p < 0,0001$ ) y la supervivencia ( $p < 0,001$ ) en pacientes con cáncer gástrico.

#### 7.3.4. B72.3 y CEA EN EL CANCER GASTRICO

Los primeros estudios realizados con el CEA sugirieron que era un marcador específico de los tumores digestivos<sup>(133)</sup> y hoy en día, todavía se emplea de forma rutinaria como marcador tumoral en el cáncer colorrectal. Además, el CEA también se ha aislado en el jugo gástrico<sup>(134)</sup>, por lo que su empleo como marcador tumoral gástrico tiene justificación<sup>(135)</sup>, aun cuando su utilidad está sometida a controversia<sup>(136)</sup>.

Centrándonos en el papel del CEA en el cáncer gástrico podemos decir que existe una relación entre el porcentaje de positividad y el estadio clínico<sup>(137)</sup>. El estudio más completo al respecto lo ha realizado recientemente Staab<sup>(124,138)</sup>. De sus resultados se deduce que la sensibilidad no cambia sustancialmente con el incremento de la clasificación TNM, variando entre el 40 y 60 %, y llegando al 72 % cuando existen metástasis a distancia. Ruibal A.<sup>(139)</sup> señala, considerándose siempre un segundo dintel cuantitativo superior al límite máximo de normalidad, un porcentaje de positividad del antígeno en los cánceres gástricos sin metástasis distantes situado entre el 15 y el 25 %, mientras que oscila entre el 45 y el 60 % cuando existe tal diseminación neoplásica. Un aspecto relevante es la existencia de un 4 % de falsos positivos en los pacientes libres de enfermedad, así como de diferencias estadísticamente significativas entre los tumores activos con o sin metástasis, pero no entre estos últimos y los pacientes libres de enfermedad. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores<sup>(140,141,142)</sup>.

En nuestro estudio, la sensibilidad preoperatoria del CEA fue ligeramente inferior a la del B72.3 (20% versus 25%). Sin embargo, llama la atención la existencia de un 44% de falsos negativos con el CEA en pacientes con estadio tumoral IV. La combinación de ambos marcadores elevó el porcentaje de positividad al 35%. Durante el seguimiento, no obtuvimos ningún falso positivo con el B72.3, mientras que, en cambio, un 7 % de los pacientes libres de enfermedad presentaron elevación del CEA. Safi y cols.<sup>(137)</sup> obtienen resultados parecidos, si bien aprecian un elevado número de falsos positivos (18/23) con el CEA. Según nuestros datos, en los casos de diseminación de la enfermedad, el B72.3 se elevó en el 57 % frente al 43 % del CEA, mientras que cuando existió recidiva local el porcentaje de positividad fue similar para ambos marcadores (40%). Combinando ambos marcadores, la sensibilidad para detectar recurrencia tumoral se elevó al 72 %.

Podemos pues decir que cifras normales de CEA no descartan progresión y que concentraciones elevadas no siempre son indicativas de recidiva. En cuanto al valor del CEA para predecir el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico, Staab<sup>(138)</sup> describe una clara relación negativa entre la resecabilidad quirúrgica y la cifra preoperatoria del marcador, así como una relación inversa entre la concentración de CEA y la curabilidad de la neoplasia. De forma similar, Sakamoto<sup>(143)</sup> encuentra que niveles elevados de CEA en el preoperatorio pueden ser considerados como uno de los factores de riesgo de recurrencia en el cáncer gástrico en estadios I y II, y que la monitorización postoperatoria del CEA puede ser utilizada para la detección precoz de recurrencias. Por el contrario, Hamazoe<sup>(144)</sup> señala que el B72.3 se eleva con mayor frecuencia que el CEA ( $P < 0,01$ ) en estadios III y IV.

No hay duda de que cuanto mayor es la cifra de CEA peor es el pronóstico, pero al contrario de lo observado en los cánceres de colon, la información pronóstica sólo se aprecia en ciertos grupos clínicamente homogéneos<sup>(138)</sup>. De hecho, cuando la cifra de CEA preoperatoria es normal el valor pronóstico del antígeno es muy escaso.

En nuestro estudio, el B72.3 presenta una mayor especificidad y sensibilidad que el CEA en el cáncer gástrico, tanto en el preoperatorio como en

el seguimiento. Además, el B72.3 es un factor pronóstico independiente para predecir el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia, mientras que el CEA pierde significación estadística en el análisis multivariante, siendo un parámetro que depende del estadio tumoral.

#### 7.4. CANCER COLO-RECTAL

El Carcinoma Colorrectal es la tercera neoplasia, en orden de frecuencia, de la población mundial, después del cáncer de pulmón y de mama, siendo la incidencia más elevada en los países occidentales<sup>(145)</sup>. En España, en función del sexo y la región, la frecuencia oscila entre 10 y 23 x 100.000 habitantes<sup>(146)</sup>. El índice de supervivencia a los 5 años en pacientes con enfermedad localizada es del 80-90 %, aunque la supervivencia global se estima en un 50 % a causa del gran número de pacientes que presentan extensión locoregional y/o a distancia de la enfermedad en el momento del diagnóstico. En el momento actual, con los métodos diagnósticos disponibles, se pueden detectar los tumores en fases no muy avanzadas. Sin embargo, los programas de detección precoz son muy costosos en tiempo, medios humanos y económicos, no siendo fácilmente aplicables a grandes grupos de población.

En general, en la práctica clínica habitual, la enfermedad se detecta precozmente en solo un 20 % de los casos. El tratamiento quirúrgico con intención curativa solamente es posible en un 70 % de los pacientes. De ellos, se estima que aproximadamente un 5 % desarrollará un segundo tumor susceptible de nuevo tratamiento. Un 45 % presentará una recidiva locoregional o a distancia, también susceptible de tratamiento si se detecta a tiempo. Estadísticamente, se ha constatado que, aproximadamente el 12 % de todos los pacientes con cáncer colorrectal, en algún momento de su evolución, tendrán metástasis hepáticas y podrían ser considerados como candidatos potenciales

a una resección hepática (147). Es en estos grupos de pacientes donde se centran los mayores esfuerzos por realizar un diagnóstico precoz. Así, las recurrencias detectadas en sujetos asintomáticos, pueden ser susceptibles de cirugía exéretica curativa, permitiendo rescatar hasta un 30 % adicional de pacientes. El desarrollo de nuevas técnicas radiológicas ha contribuido a llevar a cabo diagnósticos más precisos de las metástasis hepáticas localizando lesiones de pequeño tamaño y con una mejor definición de las mismas. Sin embargo, no consiguen establecer la extensión del tumor primario ni el estado de afectación de los ganglios linfáticos regionales. Por ello, durante el seguimiento de los enfermos intervenidos, sería deseable disponer de un test sensible y específico, realizable en cortos intervalos de tiempo, que pueda además combinarse con reexploraciones por procedimientos de imagen. En este sentido, los MT desempeñarían un importante papel.

Actualmente, la monitorización postoperatoria de las concentraciones séricas del CEA se emplea de forma rutinaria como instrumento para la detección de recurrencias, si bien presenta notables limitaciones: reacciones cruzadas, seronegatividad en tumores poco diferenciados, seronegatividad en estadios iniciales de la enfermedad, etc. Sin embargo, el advenimiento de los AM ha permitido obviar muchas reacciones cruzadas con el CEA, al detectarse la mayoría de los Antígenos de Reacción Cruzada no Específica (NCA), sobre todo el denominado NCA-12, responsable en muchos casos, de las elevaciones observadas en la determinación del CEA sérico empleando técnicas policlonales(148). Debido a su poca especificidad, el CEA no es útil como instrumento de *screening*, centrándose su empleo para monitorizar la respuesta al tratamiento y predecir el pronóstico de la enfermedad. Todo ello ha llevado a buscar otros MT más específicos que, aisladamente o en combinación con el CEA, permitan aumentar los niveles de sensibilidad y el significado pronóstico, junto con su correlación terapéutica.

#### 7.4.1. EL B72.3 COMO PARAMETRO DIAGNOSTICO

Stramignoni y cols.<sup>(75)</sup>, que estudiaron la reactividad del AM B72.3 en lesiones benignas y malignas de colon mediante técnicas inmunohistoquímicas, señalan un 82 % de positividad en adenocarcinomas de colon y la existencia de una heterogenicidad en la expresión del antígeno entre las células del tumor primario y metastásico sin apreciar correlación entre la localización de las metástasis y el porcentaje de reactividad celular. Sin embargo, no encontraron reactividad en los adenomas de colon ni en pacientes con diverticulitis. Porter y cols.<sup>(149)</sup> señalan un 80 % de positividades en cáncer primario de colon, y Thor y cols.<sup>(85)</sup> encuentran una reactividad del 94 %. Por otra parte, Listrion y cols.<sup>(150)</sup> han estudiado la inmunoreactividad de la TAG-72 en colon normal, hiperplásico y neoplásico, detectando una expresión antigénica en el 100 % de los carcinomas invasivos, en el 100 % de los pólipos hiperplásicos, en el 93% de lesiones adenomatosas y en un 84 % de las muestras de colon normal. Sin embargo, los patrones inmunohistoquímicos fueron diferentes, localizándose en la superficie luminal y mucina intraluminal y/o difusamente citoplasmática en el caso de carcinomas, lo que permite distinguir la transformación maligna. Wolf y cols.<sup>(151)</sup> han encontrado inmunoreactividad en la displasia severa y en la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>(75,85)</sup>. Así, la tendencia apreciada en la expresión de la TAG-72 para correlacionarse con la duración de la enfermedad en pacientes con estadios quiescentes de la misma, y para incrementarse con los grados más severos de displasia, sugiere que la expresión de este antígeno se correlaciona con la secuencia displasia-carcinoma. En este sentido, el B72.3 al expresarse de una manera oncoevolutiva, podría ser de utilidad para identificar pacientes con colitis ulcerosa y riesgo elevado de desarrollar un carcinoma de colon.

Se ha estudiado también la expresión sérica del antígeno reactivo TAG-72 en pacientes con cáncer colorrectal. Así, Klug y cols.<sup>(83)</sup> considerando como límite superior de la normalidad la cifra de 10 U/ml, encuentran una sensibilidad del 58 %, elevándose al 77 % cuando se toma como valor de referencia 6 U/ml. Además, esos autores también describen la existencia de una correlación significativa de las concentraciones séricas del antígeno con el estadio de la enfermedad, mientras que no encontraron correlación con el grado de diferenciación tumoral. Datos similares han sido publicados por otros autores<sup>(88,122,125)</sup>.

Por otra parte, Stramignoni y cols.<sup>(75)</sup> señalan la existencia de una discordancia suero/tejido en pacientes con cáncer de colon, así como la existencia de una heterogenicidad significativa, dentro de una masa tumoral dada, en cuanto a la reactividad del B72.3. Igualmente, Klug y cols.<sup>(83)</sup> han demostrado mediante estudios inmunohistoquímicos, que más del 80 % de los cánceres colorrectales son reactivos con el B72.3, pero solamente un 68 % de los mismos muestra concentraciones séricas del marcador superiores a 6 U/ml. La falta de detección del antígeno TAG-72 en el suero de algunos pacientes con cáncer de colon puede estar en relación con la sensibilidad del análisis o bien deberse a una característica de la membrana de la célula tumoral o a cambios en el metabolismo y/o liberación del antígeno<sup>(89)</sup>.

En nuestro estudio, para una especificidad del 96 %, la sensibilidad preoperatoria del B72.3 fue del 40 %, considerando como LSN la cifra de 6 U/ml y del 21,6 % si aquel se establece en 10 U/ml. Se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de positividad en función del estadio de la enfermedad. Así, en el estadio A, el porcentaje de casos con niveles superiores a 10 U/ml fue del 5,88 %, en el B del 12,87 %, en el C del 14,08 % y en el D del 71,87 %. Por el contrario, al igual que otros autores<sup>(83,88,152)</sup> no hemos encontrado diferencias significativas en relación al grado histológico ni a la localización de los tumores.

Las determinaciones realizadas a los 30 días de la intervención reflejan un descenso significativo ( $p < 0,001$ ) en las concentraciones séricas del mar-

cador, pudiendo ser de utilidad para valorar la efectividad del tratamiento quirúrgico.

#### **7.4.2. B72.3 Y SEGUIMIENTO**

Durante el seguimiento de los pacientes registramos 61 casos de recurrencia de la enfermedad. De ellos, 23 correspondieron a recidiva locoregional y 38 a diseminación a distancia. El porcentaje de positividad global fue del 42,6 % para un valor dintel de B72.3 de 10 U/ml, siendo en el grupo de recidiva local del 26 % y en el de progresión del 52,6 %, sin alcanzar significación estadística. En el grupo de pacientes sin evidencia de enfermedad (n=129), registramos solamente 4 falsos positivos considerando un LSN de 10 U/ml, existiendo diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) en relación a los pacientes con recidiva tumoral. Por tanto, la existencia de niveles séricos postoperatorios elevados de B72.3 pueden ser indicativos de recurrencia de la enfermedad<sup>(152)</sup>.

#### **7.4.3. B72.3 COMO FACTOR PRONOSTICO**

Un aspecto de grán interés práctico es la posible relación existente entre las concentraciones séricas preoperatorias del antígeno TAG-72 y el pronóstico en pacientes con carcinoma colorrectal. En este sentido, en nuestra población estudiada, los niveles preoperatorios de B72.3 se acompañaron de un mayor número de recidivas postcirugía, apreciándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las curvas de supervivencia libre de enfermedad en relación a la elevación preoperatoria del marcador. Por otra parte, los

niveles elevados de B72.3 también estuvieron asociados con una supervivencia total más corta en pacientes con cáncer colorrectal resecable. Si consideramos al conjunto de los pacientes, incluyendo aquellos con tumor irresecable, apreciamos que también existió una diferencia significativa ( $p=0,0047$ ) entre las curvas de supervivencia total en relación a la elevación preoperatoria del marcador.

Sin embargo, en nuestro estudio, el análisis multivariante mostró que los niveles séricos preoperatorios de B72.3 no fueron un factor pronóstico independiente tanto para predecir la supervivencia libre de enfermedad como la supervivencia total.

No hemos encontrado en la literatura consultada referencias acerca de la significación pronóstica del B72.3 sérico en el cáncer colorrectal.

#### **7.4.4. B72.3 Y CEA EN CANCER COLORRECTAL**

El antígeno carcinoembrionario (CEA) no es un marcador específico de cáncer, pudiéndose detectar ciertas concentraciones en el suero de individuos sanos, aunque generalmente con tasas inferiores a 3-5 ng/ml. Además, niveles elevados de CEA pueden observarse también en pacientes con distintas enfermedades no tumorales. Fletcher y cols.<sup>(153)</sup> realizaron el cálculo estadístico del valor del CEA para el diagnóstico de tumores intestinales en la población, estableciendo una tasa de falsos positivos de 250 por cada positivo real. Todo ello, excluye su valor en el *screening* de patologías tumorales, y concretamente del cáncer colorrectal, en la población general.

En cuanto a la sensibilidad diagnóstica del CEA, entre un 60-70 % del conjunto de pacientes con carcinoma colorrectal presentan concentraciones séricas elevadas del marcador<sup>(154)</sup>. En líneas generales, se acepta que los títulos de CEA y su proporción de positivos reflejan el grado de extensión de la enfermedad, ya que se ha demostrado la existencia de una correlación entre su nivel patológico y el estadio de la neoplasia<sup>(155-160)</sup>. Así, aquellos pacientes

con poca masa tumoral (estadios precoces), solo presentan elevación del CEA en un 20-40 % de los casos, mientras que en el estadio D algunos autores señalan un 100 % de positividad<sup>(154,161)</sup>. No obstante, en un pequeño porcentaje de pacientes no se observa la elevación del marcador pese a la existencia de metástasis, hecho atribuido a factores huesped y/o tumor dependientes.

En nuestro estudio, la sensibilidad del CEA sérico preoperatorio en el conjunto de los pacientes con enfermedad fue del 43,8 %. La distribución por estadios es similar a la presentada por otros autores con una porcentaje de positividad del 11,7; 28,7; 35,2 y 78 % en los estadios A,B,C y D, respectivamente. La sensibilidad en el preoperatorio del CEA fue significativamente superior ( $p < 0,001$ ) a la presentada por el B72.3, con un porcentaje de positividad del 6%, 13 %, 14 % y 71 %, respectivamente, considerando un valor dintel de 10 U/ml. Sin embargo, si tenemos en cuenta un valor de referencia del B72.3 sérico de 6 U/ml, la sensibilidad es muy similar para ambos marcadores. Combinando el CEA y el B72.3, el porcentaje de positividad se incrementa, alcanzando el 33 % en el Estadio B y el 87,5 % en el C.

Por otra parte, diversos autores<sup>(162,163,164)</sup> han relacionado la expresión del CEA con la diferenciación celular, indicando que si el CEA es un antígeno característico de la mucosa colorrectal, los tumores más indiferenciados podrían dejar de producirlo.

En cuanto a la significación pronóstica del CEA en el cáncer colorrectal, numerosos estudios<sup>(165-169)</sup> han demostrado la existencia de una correlación positiva entre el nivel sérico preoperatorio de CEA y el riesgo de recurrencia tras la cirugía, así como con la respuesta al tratamiento quimio y radioterápico. Así, la concentración sérica preoperatoria elevada del CEA se relaciona con un mal pronóstico de la enfermedad y un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad tras cirugía radical. En este sentido, Beatty y cols<sup>(154)</sup> demostraron la existencia de una tasa de recurrencia del 50 % en pacientes con valores preoperatorios elevados de CEA, comparado con el 25 % en aquellos con similar estadio y valores normales del marcador. Además, la supervivencia libre de enfermedad también es más corta en aquellos pacientes con niveles elevados del antígeno. La elevación del CEA traduciría la

existencia de la penetración del tumor a través de la pared intestinal o bien la presencia de micrometástasis que, posteriormente, conducirían a una recidiva de la enfermedad.

En este sentido, Wanebo y cols.<sup>(159)</sup> señalan que la concentración preoperatoria de CEA tiene un valor pronóstico independiente del estadio de la enfermedad. En su estudio, tras evaluar un grupo de pacientes con cáncer colorrectal en estadio B de Dukes, señalan que el 78 % de los enfermos con CEA preoperatorio elevado presentaron recurrencia tumoral a los 30 meses comparado con el 44 % en aquellos con valores normales de CEA. Un comportamiento semejante del marcador se observó en el estadio C (41 y 15 % de recurrencias a los 30 meses). Sin embargo, el valor de estos datos no es concluyente existiendo algunos autores<sup>(160)</sup> que niegan el valor pronóstico del CEA. Por el contrario, Steele y cols.<sup>(164)</sup> indican que la determinación preoperatoria del CEA comportaría el reconocimiento y selección de un grupo de pacientes con alto riesgo de recidiva, principalmente locorregional, y que, teóricamente, podrían beneficiarse de un tratamiento complementario.

En nuestra población estudiada, existieron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) de las concentraciones preoperatorias de CEA en relación con la reseccabilidad tumoral. Por otra parte, de los 61 pacientes en los que se constató recurrencia de la enfermedad, un 47,5 % tenían niveles preoperatorios elevados de CEA y en el 73,7 % se apreció una elevación del marcador al diagnosticarse la recidiva tumoral. Por el contrario, el porcentaje de positividad para el B72.3 en los pacientes con recurrencia tumoral fue del 42,6 %. Dicho porcentaje fue significativamente ( $p < 0,001$ ) superior para el CEA tanto en los pacientes con recidiva locorregional (69,5 vs 26 %) como en aquellos con diseminación a distancia de la enfermedad (73,6 vs 52 %). La combinación de ambos marcadores elevó el la sensibilidad al 74 % en caso de recidiva local y al 83,6 % cuando existían metástasis a distancia. En el seguimiento de los pacientes intervenidos la especificidad fue similar para los dos marcadores, alcanzando el 97 %, con el mismo número de falsos positivos (4 casos) en los pacientes libres de enfermedad.

En un estudio comparativo entre el CEA y B72.3 como marcadores tumorales del cáncer colorrectal, Guadani y cols.<sup>(152)</sup> indican que ambos marcadores se complementan. Así, el 49,6% de pacientes con niveles normales de CEA preoperatorio, presentaron concentraciones patológicas de TAG-72. Por otra parte, durante el seguimiento, en un 60 % de pacientes en los que no se detectaron cambios significativos del CEA, el B72.3 presentó niveles séricos positivos antes de que se tuviera evidencia clínica de la recurrencia. En nuestro estudio, hemos encontrado 18 casos (8 %) con niveles preoperatorios normales de CEA y TAG-72 elevada y 19 (8,5 %) con CEA positivo y B72.3 negativo. Durante el seguimiento, el B72.3 detectó 7 casos de recurrencia tumoral con CEA negativo frente a 15 casos detectados por el CEA y no por el B72.3.

Así pues, de acuerdo con la mayoría de los autores, el CEA puede considerarse como un excelente marcador en el seguimiento de los pacientes con cáncer colorrectal, para predecir la recurrencia tumoral y monitorizar la respuesta al tratamiento<sup>(170-172)</sup>. En este sentido, se admite que tras la resección quirúrgica completa el CEA sérico debe retornar a la normalidad. Una elevación persistente o progresiva indica usualmente una resección quirúrgica incompleta. No obstante, pueden presentarse falsos positivos, aunque rara vez son persistentes<sup>(171)</sup>. La mayor fiabilidad tiene lugar en aquellos casos en que la tasa de CEA no sólo no tiende a la normalidad, sino que aumenta con el tiempo. Por el contrario, la normalidad del CEA sérico, no excluye necesariamente el diagnóstico de recidiva y, mucho más, si preoperatoriamente no estaba elevado<sup>(154)</sup>.

Por otra parte, Norton y cols.<sup>(173)</sup> señalan la presencia de metástasis hepáticas ocultas en un 10-30 % de los pacientes en el momento del diagnóstico del tumor primario. Además, un 25-30 % de las metástasis hepáticas pueden ser reseçadas, si se detectan precozmente<sup>(170)</sup>. En este sentido, líneas de investigación actuales ofrecen resultados alentadores sobre la utilidad del B72.3 marcado radioactivamente para localizar lesiones metastásicas de cáncer colorrectal y recurrencias locales<sup>(96-100)</sup> con un 70-80 % de positividades en algunas series. Igualmente, se están realizando intentos inmunoterapéuticos, en base a esa elevada especificidad del B72.3.

En nuestro estudio, el análisis de la significación pronóstica del B72.3 sérico preoperatorio para predecir la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia total reveló que los valores elevados de TAG-72 estuvieron significativamente asociados con un menor tiempo libre de enfermedad y una menor supervivencia. Sin embargo, el análisis de regresión múltiple de Cox confirmó que los niveles séricos preoperatorios de CEA son un factor pronóstico independiente, y el más potente tras el estadio de la enfermedad, para predecir el TLE y la supervivencia. Por el contrario, los valores séricos preoperatorios de B72.3 no alcanzaron significación estadística en el análisis multivariante, siendo un factor dependiente del estadio tumoral, tanto para predecir el TLE como la supervivencia total.

## 7.5. CANCER DE ESOFAGO

La frecuencia del carcinoma de esófago está aumentando progresivamente, apreciándose una notable variabilidad geográfica en su incidencia. En España, el cáncer de esófago ocupa el séptimo lugar en incidencia entre las lesiones neoplásicas<sup>(174)</sup>. Concretamente en Asturias, la tasa de mortalidad por cáncer de esófago se estima en un 6,3 x 100.000 habitantes, con una marcada predilección por el sexo masculino (12,3 vs 0,7 x 100.000 habitantes)<sup>(113)</sup>.

A pesar de los avances diagnósticos y terapéuticos logrados en las últimas décadas la supervivencia no se ha modificado prácticamente en los últimos 25 años, no superando el 5 % a los 5 años<sup>(175)</sup>. Ello se debe a que la enfermedad es difícil de detectar mientras se encuentra confinada a la mucosa esofágica, planteando un reto tanto para el gastroenterólogo como para el cirujano.

Aunque no se ha dilucidado la etiología del cáncer de esófago, los cambios esofágicos de Barret y la acalasia pueden preceder el desarrollo de la neoplasia. En este sentido, Ferguson<sup>(176)</sup> señala una incidencia 40 veces mayor de carcinoma de esófago en pacientes con esófago de Barret en relación a la población general y Wichulis y cols.<sup>(177)</sup> indican que los pacientes con acalasia tienen una incidencia 7 veces mayor de la neoplasia.

La sensibilidad de los marcadores tumorales empleados hasta el momento actual en el cáncer de esófago es escasa, encontrándose tan solo concentraciones séricas elevadas en estadios avanzados de la enfermedad. Esto anula su valor en el screening de la población general. Por otra parte, no se consideran útiles en el seguimiento de los pacientes, ya que la recidiva de la enfermedad es generalmente susceptible de tratamiento estrictamente sintomático.

Diversos autores han estudiado la expresión del antígeno TAG-72 en el carcinoma escamoso de esófago mediante técnicas inmunohistoquímicas. Así, Thor y cols.<sup>(85)</sup> encuentran una reactividad variable y, generalmente, los tumores poco diferenciados presentan mayor expresión del antígeno que los bien diferenciados, productores de queratina.

En cuanto al análisis de las concentraciones séricas de B72.3, hemos encontrado muy pocas referencias en la literatura revisada. Heptner y cols.<sup>(120)</sup>, en una serie de 24 pacientes diagnosticados de carcinoma de células escamosas de esófago obtienen solamente un 4 % de positividades frente al 17 % para el CEA. Combinando ambos marcadores, la sensibilidad fue del 17 %.

En nuestro estudio, la especificidad del B72.3 en el cáncer de esófago fue elevada, alcanzando un 95,4 %. Merece destacar el hallazgo de concentraciones notablemente elevadas del marcador (B72.3 = 33 U/ml) en un paciente con esofagitis y alteraciones de Barret. Por otra parte, la sensibilidad en el conjunto de los pacientes con carcinoma escamoso de esófago fue del 30,2 % considerando un valor dintel de 6 U/ml (especificidad = 95,4 %), apreciándose los valores más elevados en estadios avanzados de la enfermedad. No en-

contramos diferencias significativas de las concentraciones séricas pretratamiento del B72.3 en relación a la localización del tumor, estadio ni grado de diferenciación tumoral. Durante el seguimiento, no obtuvimos ningún falso positivo en los pacientes libres de enfermedad. Por el contrario, el marcador se elevó de forma significativa ( $p < 0,001$ ) en los pacientes que presentaron recurrencia de la enfermedad en relación al grupo sin evidencia de tumor, con una concentración sérica media de  $38,15 \pm 136,3$  U/ml.

Por otra parte, también determinamos las concentraciones séricas pre y postoperatorias del CEA, registrándose una sensibilidad preoperatoria del 20,9 %, muy similar a la del B72.3 (23,25 %). Sin embargo, el CEA se elevó en un 15,7 % de los pacientes con recurrencia de la enfermedad, frente a un 26,3 % de positividades para el B72.3. Combinando ambos marcadores, la sensibilidad global se elevó al 32,2 %. Resultados similares son señalados por Heptner y cols.<sup>(120)</sup> en cuanto a la sensibilidad del CEA sérico (17 %). Sin embargo, estos autores presentan un porcentaje de positividad global del B72.3 muy inferior al obtenido en nuestro estudio (4 % vs 29 %).

## 7.6. CANCER DE PANCREAS

El incremento de su incidencia, la dificultad para realizar un diagnóstico precoz y el mal pronóstico del cáncer de páncreas, exigen la necesidad de desarrollar nuevos métodos para el diagnóstico y tratamiento de esta agresiva neoplasia. En este sentido, los marcadores tumorales podrían proporcionar resultados alentadores si se consiguieran identificar sustancias en el suero con la suficiente sensibilidad y especificidad para permitir un diagnóstico del cáncer de páncreas en un estadio inicial.

En 1986, Klug y cols.<sup>(83)</sup> encontraron que el B72.3 mostraba una mayor sensibilidad para el carcinoma pancreático que para otros adenocarcinomas y por tanto, reunía características apropiadas para su empleo en el diagnóstico serológico de esta neoplasia. Posteriormente, Takasaki y cols.<sup>(178)</sup> estudiaron la expresión del antígeno TAG-72 en tejido pancreático normal, pancreatitis crónica y adenocarcinoma pancreático empleando técnicas inmunohistoquímicas y comparando los resultados con otros marcadores tumorales que parecían prometedores en el cáncer de páncreas (CA 19-9 y DUPAN-2).

De los resultados obtenidos señalan que, a diferencia de los hallazgos en casos de pancreatitis crónica y pancreas normal, la TAG-72 se expresa en el citoplasma y superficie luminal de las células cancerosas, así como en el lumen glandular. Además, el antígeno se encuentra a elevada concentración en el estroma que rodea a las glándulas neoplásicas. La similitud de los patrones de distribución entre el CA 19-9 y DUPAN-2 en el adenocarcinoma pancreático apoya la hipótesis de que los anticuerpos dirigidos contra estos dos antígenos reconocen diferentes epitopos de una misma molécula de tipo mucina de alto peso molecular<sup>(179)</sup>. Los datos obtenidos por Takasaki sugieren que el anticuerpo monoclonal B72.3 reconoce una sustancia producida en el aparato de Golgi de las células ductales benignas. El incremento en la expresión de la TAG-72 en las células ductales, y su aparición en las células centroacinares en la pancreatitis crónica podría indicar que dicha sustancia está asociada con la diferenciación celular. En el adenocarcinoma de pancreas, se observa un cambio en la distribución de la TAG-72 presentando una localización citoplasmática y no en el aparato de Golgi como ocurre en la pancreatitis crónica. La sobreproducción de esta sustancia y/o composición alterada de los productos sintetizados en el aparato de Golgi (glicosilación incompleta) podrían explicar los cambios apreciados en la localización intracelular del antígeno. Una hipótesis que podría explicar la capacidad del B72.3 para distinguir pancreas normal de adenocarcinoma ductal es la falta de accesibilidad del antígeno TAG-72 en tejidos normales e inflamados (Golgi) y una fácil accesibilidad en tejidos neoplásicos (citoplasma). Todo ello hace que el B72.3 pueda ser considerado como un MT de gran valor en el cáncer de pancreas y un instrumento válido de radioinmunolocalización, y en un futuro, de inmunoterapia<sup>(180)</sup>. En este sentido, Lyubsky y cols.<sup>(181)</sup> señalan una reactividad del B72.3 superior al 90 % tanto en el tumor primario de pancreas como en las lesiones metastásicas, mientras que en las pancreatitis esa reactividad fue escasa o ausente. Resultados similares han sido publicados por otros autores<sup>(63,74)</sup>. Sin embargo, estas técnicas son muy costosas y no están al alcance de la mayoría de los laboratorios.

En base a los alentadores resultados obtenidos en cuanto a la expresión tisular de la TAG-72, cabía suponer que la determinación de las

concentraciones séricas del antígeno sería de gran utilidad en el diagnóstico del cáncer de páncreas. Pero los hallazgos obtenidos no han confirmado esta suposición. Así, Heptner y cols<sup>(120)</sup>, obtienen una sensibilidad del 22 % para el B72.3 sérico (dintel de 4 U/ml), inferior a la del CEA (47 %) y todavía muy inferior a la del CA 19-9 (82 %). Además, solamente se encontraron concentraciones séricas elevadas de TAG-72 en estadios avanzados y con diseminación metastásica de la enfermedad. Combinando el B72.3 y CEA la sensibilidad se elevó al 54 %. Sin embargo, la especificidad del B72.3 fue superior a la del CEA en relación a enfermedades benignas como la pancreatitis, colestasis y cirrosis hepática, por lo que la ganancia en sensibilidad no compensa la pérdida de especificidad<sup>(182)</sup>. Además, teniendo en cuenta que el sistema hepatobiliar interviene en la regulación de los niveles séricos del CEA, toda obstrucción biliar sea benigna o maligna, determina una elevación del mismo. La falta de elevación del CEA en el plasma de los pacientes con cáncer de páncreas puede atribuirse a dos razones: a) las células tumorales del páncreas, en fases precoces, liberan el antígeno en su mayor parte por vía canalicular al duodeno y b) el hígado es capaz de depurar el CEA de la sangre circulante.

Otros autores describen similares resultados. Así, Motoo y cols.<sup>(125)</sup> señalan un 38 % de positividad para el B72.3, con un porcentaje de falsos positivos inferior al 1 %, mientras que Ohuchi y cols<sup>(121)</sup> obtienen una sensibilidad del 46 %.

En nuestra población estudiada, la especificidad del B72.3, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el grupo de patologías benignas, fue del 96 %, para un dintel de B72.3 sérico de 6 U/ml y del 99 % considerando un valor de referencia de 10 U/ml. Así, solamente 2 de 35 pacientes con pancreatitis aguda y 2 de 21 con pancreatitis crónica presentaron niveles séricos del marcador superiores a 6 U/ml. En cuanto a la sensibilidad preoperatoria del B72.3 sérico en el conjunto de pacientes con adenocarcinoma de páncreas, el 47,3 % presentaron concentraciones séricas del marcador superiores a 6 U/ml, y el 31,5 % de los mismos mostraron concentraciones mayores de 10 U/ml, ob-

servándose los valores más elevados en estadios avanzados y con metástasis a distancia de la enfermedad. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores<sup>(120,182)</sup>. Por otra parte, el CEA mostró una sensibilidad preoperatoria global del 42 %, correspondiendo también los valores más elevados a pacientes con estadios avanzados (III y IV). Combinando ambos marcadores, el porcentaje global de positividad se elevó al 57,8 %, alcanzando el 100 % en caso de metástasis a distancia.

Durante el seguimiento de los pacientes, no detectamos ningún caso falso positivo y constatamos una discreta elevación de las concentraciones séricas de B72.3 (> 6 U/ml y < 10 U/ml) en el 50 % de los pacientes con recurrencia de la enfermedad, y valores superiores a 10 U/ml en el 33,3 % de los mismos. De forma similar, el CEA mostró una sensibilidad del 50 % para detectar la presencia de recidiva tumoral, sin apreciar tampoco ningún falso positivo en los pacientes libres de enfermedad. Combinando ambos marcadores, el porcentaje de positividad ascendió al 66,6 %.

## **8. CONCLUSIONES**

1.- Tras estudiar las concentraciones séricas de B72.3 en un grupo de 109 donantes de sangre HBs Ag negativos, hemos establecido el **Límite Superior de Normalidad (LSN)** en 6 U/ml (97,5 percentil). No se han detectado diferencias significativas en función de la edad, sexo ni del hábito tabáquico.

2.- En el grupo de pacientes con patologías benignas (N=904), el porcentaje de falsos positivos fue similar en las enfermedades de naturaleza no digestiva (6,63 %) y digestiva (6,72 %). Dentro de estas últimas, el mayor número de positividades corresponde a las enfermedades gastrointestinales (8,28 %) de tipo inflamatorio, y a las pancreatitis (7,14 %).

3.- Si descartamos la presencia de patologías benignas ginecológicas, mamarias y gastrointestinales, una cifra de **10 U/ml** puede ser utilizada como **Dintel de Actividad Tumoral**, ya que solamente es superada por el 2,5 % de las patologías no tumorales. En la valoración de las neoplasias de origen digestivo, podemos considerar un segundo Dintel de Actividad de 15 U/ml, solamente superado por el 1,54 % de las patologías benignas estudiadas incluyendo las enfermedades gastrointestinales inflamatorias.

4.- En función de lo anteriormente expuesto, podemos decir que el **B72.3 no es un marcador específico de tumor**, ya que pueden encontrarse concentraciones elevadas del antígeno TAG-72 en pacientes con enfermedades no tumorales. Sin embargo, al considerar la influencia de las enfermedades benignas digestivas sobre las concentraciones séricas del marcador, podemos comprobar que presenta una excelente especificidad (**98,4 %**), lo que permite seleccionar valores de referencia, predictivos de la presencia de carcinoma.

5.- En el grupo de pacientes con **cáncer gástrico**, tanto las concentraciones séricas preoperatorias de **B72.3**, como el porcentaje de positividades, **se relacionan de forma significativa con la extensión** de la enfermedad. Asimismo, existe una asociación entre dichos niveles séricos y el **grado histológico de la neoplasia**, siendo aquellos significativamente más bajos en los tumores bien diferenciados.

6.- El análisis del **Tiempo Libre de Enfermedad (TLE)** y de **supervivencia** en los pacientes con **cáncer gástrico** reveló que las concentraciones séricas preoperatorias elevadas de la TAG-72 estuvieron significativamente asociadas con un menor TLE y una menor supervivencia.

7.- La determinación de los niveles séricos preoperatorios de B72.3 en el cáncer gástrico, comporta el reconocimiento y selección de un grupo de pacientes con alto riesgo de recidiva tras cirugía radical, y que teóricamente, podrían beneficiarse de una terapia complementaria. Así, la búsqueda del dintel óptimo de B72.3 sérico para predecir el TLE en pacientes con cáncer gástrico resecable condujo a la definición de un valor de 20 U/ml. Ese identificó a un **13,6 % de pacientes con concentraciones elevadas de TAG-72 y un mal pronóstico.**

8.- El análisis de regresión múltiple de Cox confirmó que el **B72.3 (20 U/ml)** preoperatorio **es un factor pronóstico independiente, y el más potente tras el estadio del tumor para predecir el TLE ( $p < 0,0001$ ) y la supervivencia ( $p = 0,0032$ ) en pacientes con cáncer gástrico.**

9.- En los pacientes con **cáncer colorrectal**, las concentraciones séricas preoperatorias de B72.3 reflejan el **grado de extensión inicial de la enfermedad**, ya que existe una asociación significativa ( $p < 0,001$ ) entre su nivel patológico y el estadio de la neoplasia. Por el contrario, no hemos encontrado asociación significativa entre dichos niveles séricos y el grado histológico del tumor.

10.- En el grupo pretratamiento, la positividad global del CEA (36,9 %) fue significativamente superior a la del B72.3 (21,62 %). Combinando ambos, ese porcentaje fue del 40,09 %, superior al obtenido utilizando cada marcador por separado, tanto en la globalidad del grupo como en cada estadio. En el grupo post-tratamiento, el porcentaje de positividad del CEA (73,77 %) fue también significativamente ( $p < 0,001$ ) superior al del B72.3 (42,62 %). La combinación de ambos marcadores elevó la sensibilidad al 83,6 % en este grupo de pacientes.

11.- El **análisis del TLE y de supervivencia** en pacientes con cáncer colorrectal reveló que las **concentraciones séricas preoperatorias elevadas de B72.3 (dintel óptimo de 45 U/ml)** estuvieron **significativamente ( $p < 0,05$ ) asociadas con un menor TLE y una supervivencia más corta**. El análisis de regresión múltiple de Cox confirmó que los **niveles séricos preoperatorios de CEA ( $> 6$  ng/ml)** son un **factor pronóstico independiente** y el más potente tras el estadio tumoral para predecir el TLE y la supervivencia total en el cáncer colorrectal. Sin embargo, los niveles séricos preoperatorios de B72.3 no alcanzaron significación estadística en el análisis multivariante para predecir esas dos variables biológicas.

12.- En el grupo de pacientes con **carcinoma epidermoide de esófago**, el B72.3 mostró una elevada especificidad (100 %) con una sensibilidad del 29 % (dintel=10 U/ml), superior a observada con el CEA (19,3 %).

La combinación de ambos marcadores es de utilidad clínica ya que se eleva el porcentaje de positividad al 32 %.

13.- En el grupo de pacientes con **adenocarcinoma de páncreas**, la sensibilidad fue del 31,57 % (límite=10 U/ml), correspondiendo las concentraciones más elevadas del marcador a los estadios avanzados de la enfermedad. No hemos encontrado asociación significativa con el grado histológico de la neoplasia. El CEA mostró un porcentaje superior de positividad (44 %) en el conjunto de los pacientes con enfermedad. Combinando ambos marcadores, la sensibilidad se eleva al 60 %, revelando la utilidad clínica de dicha asociación.

## **9. BIBLIOGRAFIA**

- 1.- **FIALKOW PJ.** Clonal origin and stem evolution of human tumors. In Mulvihill JJ, Miller RW, Fraumeni JF Jr (eds): Genetics of human Cancer, pp 439-452. New York, Raven Press, 1977.
- 2.- **YUNIS JJ.** The chromosomal basis of human neoplasia. Science 1983; 221: 227-235.
- 3.- **ERIKSON RL.** Oncogenes. A unitary cause of cancer? JAMA 1982; 247: 178-181.
- 4.- **DIAMOND L, O'BRIEN TG, BARD WM.** Tumor promoters and the mechanism of tumor promotion. Adv Cancer Res 1980; 32: 1-74.
- 5.- **SHIH C, SHILO B, GOLDFARB MP ET AL.** Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 5714-5718.
- 6.- **LAND H, PARADA LF, WEIMBERG RA.** Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science 1983; 222: 771-778.
- 7.- **LAND H, PARADA LF, WEIMBERG RA.** Tumorigenic conversion of primary embryofibroblasts at least two cooperating oncogenes. Nature 1983; 304: 596-601.
- 8.- **MAXAM AM, GILBERT W.** A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 560-564.
- 9.- **PERUCHO M, GOLDFARB M, SHIMIZU K ET AL.** Human tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. Cell 1981; 27: 467-476.

- 10.- **TABIN CJ, BRADLEY SM, BARGMANN CI, WEIMBERG RA.** Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1983; 304: 596-601.
- 11.- **PULCIANI S, SANTOS E, LAUVER AV, LONG LK, AARONSON SA, BARBACID M.** Oncogenes in solid human tumors. *Nature* 1982; 300: 539-542.
- 12.- **BISHOP JM.** Retroviruses and cancer genes. *Adv Cancer Res* 1982; 37: 1-32.
- 13.- **TEMIN HM.** Viral oncogenes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 1979; 44: 1-7.
- 14.- **DUESBERG PH.** Retroviral transforming genes in normal cells?. *Nature* 1983; 304: 219-226.
- 15.- **WEISS R, TEICH N, VARMUS H, COFFIN C.** RNA tumor viruses. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory 1982.
- 16.- **SANTOS E, REDDY EP, PULCIANI S, FELDMANN RJ, BARBACID M.** Spontaneous activation of a human proto-oncogen. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80: 4679-4683.
- 17.- **HYNES RO.** Cell surface proteins and malignant transformation. *Biochim Biophys Acta* 1976; 458: 73-107.
- 18.- **SUKUMAR S, NOTARIO V, MARTIN ZANCA D, BARBACID M.** Induction of mammary carcinomas in rats by Nitroso-Methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* 1983; 306: 658-661.

- 19.- **SHIH TY, WEEKS MO.** Oncogenes and cancer: the p21-ras gene. *Cancer Invest* 1984; 2: 108-123.
- 20.- **ELLIS RW, LOWY DR, SCOLNICK EM.** The viral and cellular p21(ras) gene family. In Klein G (ed). *Advances in viral oncology*. Vol 1, pp 107-126. New York, Raven Press 1982.
- 21.- **GOLDFARB M, SHIMIZU K, PERUCHOM, WRIGLER M.** Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 1982; 296: 404-409.
- 22.- **O'BRIEN SJ, NASH WG, GOODWIN JL ET AL.** Dispersion of the ras family of transforming genes to four different chromosomes in man. *Nature* 1983; 302: 839-842.
- 23.- **TAPAROWSKY E, SHIMIZU K, GOLDFARB M ET AL.** Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell* 1983; 34: 581-586.
- 24.- **CAPON DJ, SEEBURG PH, MC GRATH JP ET AL.** Activation of Ki-ras 2 gene in human colon and lung carcinomas by two different mutations. *Nature* 1983; 304: 507-513.
- 25.- **KLEIN G.** The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. *Nature* 1981; 294: 313-318.
- 26.- **BLAIR DG, OSKARSSON M, WODD TG, MC CLEMENTS WL.** Activation of the transforming potential of a normal cell sequences: A molecular model for oncogenesis. *Science* 1981; 212: 941-942.
- 27.- **YUNIS JJ.** The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1983; 221: 227-236.

- 28.- **MARK JL.** Cooperation between oncogenes. *Science* 1983; 222: 602-603.
- 29.- **NAOR D.** Suppressor cells: permitters and promoters of malignancy? *Adv Cancer Res* 1979; 29: 45-125.
- 30.- **BRODER S, WALDMANN TA.** The suppressor cell network in cancer. *N Engl J Med* 1978; 299: 1281.
- 31.- **GREGGARD P.** Phosphorylated proteins as physiological effectors. *Science* 1978; 199: 146-152.
- 32.- **GILMAN AG.** G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 1984; 36: 577-579.
- 33.- **DOERFLER W.** DNA methylation and gene activation. *Annu Rev Bioch* 1983; 52: 93-124.
- 34.- **LLOYD KO.** Human Tumor Antigens: Detection and characterization with monoclonal antibodies. In Herberman RB (ed): *Basic and clinical tumor immunology* pp 159-214. Boston, Martinus Nijhoff Publishers 1983.
- 35.- **BLACK PH.** Shedding from the cell surface of normal and cancer cells. *Adv Cancer Res* 1980; 32: 75.
- 36.- **KOHLER M, MILSTEIN C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 494-497.
- 37.- **RUIBAL A.** Estado actual de los marcadores tumorales con futuro. *Oncología* 1982; 5: 437-446.

- 39.- **TOUITOU Y, BOGDAN A.** Etude critique des marqueurs tumoraux recents. Bull Cancer 1988; 75: 247-262.
- 40.- **VALLADARES Y.** Estado actual de los marcadores biológicos en oncología. Rev Esp Oncología 1985; 32: 129-161.
- 41.- **BATES SE, LONGO DL.** Tumor markers: value and limitations in the management of cancer patients. Cancer Treat Rev 1985; 12: 163-207.
- 42.- **KLAVINS JA.** Tumor Markers. In: Clinical and Laboratory Studies 1985. Alan R Liss eds., New York.
- 43.- **WEINTRAUB BD, ROSEN SW.** Competitive radioassays and "specific" tumor markers. Metabolism 1973; 22: 119-1123.
- 44.- **ABELEUGI H, PERONA SS, KHRAMKOVA NI ET AL.** Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. Transplantation 1963; 9: 174-180.
- 45.- **GOLD P, FREEDMAN SD.** Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. J Exp Med 1965; 121: 439-462.
- 46.- **ANDERSON ML, SPANDIDOS DA.** Oncogenes and onco-suppressor genes. Their involvement in cancer. J Pathol 1989; 157: 1-10.
- 47.- **BARNES DM.** Breast cancer and a protooncogene (c-erbB2). C-erb B2 is a reliable pronostic marker. Br Med J 1989; 299: 1061-1062.

- 48.- **ARBUTHNOT P, KEW M, PARKER I, FITSCHER W.** Expression of c-erb A in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 1989; 9: 885-888.
- 49.- **SANO T, REMVIKOS Y, SALMON RJ.** Cytometrie en flux. Application a l'étude du contenu cellulaire en ADN des tumeurs colorectales. *Gastroenterol Clin Biol* 1988; 12: 449-454.
- 50.- **TAYLOR PAPADIMITRIOU J, STAMPFER M, BARTEK J. ET AL.** Keratin expression in human mammary epithelial cells cultures from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J Cell Science* 1989; 94: 403-413.
- 51.- **HAKOMORI S, KANNAGI R.** Glycosphingolipide as tumor associated and diferentiation markers. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71: 231-251.
- 52.- **ROSENMAN SJ, FENDERSON BA, HAKOMORI SI.** Murine embryonal carcinoma cell surface sialyl Le<sup>X</sup> is present on a novel glycoprotein and on high molecular weith lactosaminoglycan. *Exp Cell Res* 1989; 180: 326-340.
- 53.- **CHO CHUNG YS, CLAIR T, TAGLIAFERRI P, ET AL.** Site selective cyclic AMP analoge as a now biological toole in growth control, differentiation and protooncogene regulation. *Cancer Invest* 1989; 7: 161-171.
- 54.- **HOMMA Y, TADENAWA T, EMORI Y, SORIMACHI H, SUZUKI K.** Tissue and cell type specific expression of mRNAs for four types of inositolphospholipid-specific phospholipase C. *Biochem Biophys Res Comun* 1989; 164: 406-412.

- 55.- **GESCHER A, DALE IL.** Proteinkinase C : a novel target for rational anticancer drug design?. *Anticancer Res* 1989; 4: 93-105.
- 56.- **MAUDELONDE TH, DOMERGUE J, HENQUEL C. ET AL.** Tamoxifen treatment increases the concentration of 52k-cathepsin and its precursor in breast cancer tissue. *Cancer* 1989; 63: 1265-1270.
- 57.- **CAPONY F, ROUGEOT C, MONTCOURRIER P, CAVAILLES V, SALAZAR G, ROCHEFORT H.** Increases secretion, altered processing and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res* 1989; 49: 3904-3909.
- 58.- **SCHLOM J.** Basic principles and applications of monoclonal antibodies in the management of carcinomas: The Richard and Linda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* 1986; 46:3225-3238.
- 59.- **FOULDS SL.** The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 1954; 14: 728-735.
- 60.- **HORAND HAND P, NUTI M, COLCHER D, SCHLOM J.** Definition of antigenic heterogeneity and modulation among human mammary carcinoma cell population using monoclonal antibodies to tumor associated antigens. *Cancer Res* 1983; 43: 728-735.
- 61.- **KUFE DW, NADLE RL, SARGENT L, SHAPIRO H.** Biological behavior of human breast carcinoma associated antigens expressed during cellular proliferation. *Cancer Res* 1983; 43: 851-857.
- 62.- **HOLYOKE ED, BLOCK GE, JENSEN E ET AL.** Biologic markers in cancer diagnosis and treatment. *Curr Probl Cancer* 1981; 6: 2-14.
- 63.- **SCHLOM J, WEEKS MO.** Potential clinical utility of monoclonal antibodies in the management of human carcinomas. In VJ. De Vita Jr,

- S Hellman and SA Rosemberg (Eds). Important advances in oncology 1985:170-172. Philadelphia: JB Lippincott.
- 64.- **HERLYN M, SEARS HF, STEPLEWSKI Z, SEAR F.** Monoclonal antibody detection of circulating Tumor Associated Antigen. I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric and pancreatic carcinoma. *J Clin Immunol* 1982;2:135-140.
- 65.- **LARSON SM.** Radiolabeled monoclonal antitumor antibodies in diagnosis and therapy. *J Nucl Med* 1985;26:538-545.
- 66.- **RAINSBURY RM.** The localization of human breast carcinomas by radiolabeled monoclonal antibodies. *Br J Surg* 1984; 71: 805-812.
- 67.- **CARRASQUILLO JA, KROHN KA, BEAUMIER P, ET AL.** Diagnosis and therapy for solid tumors with radiolabeled antibodies and immune fragments. *Cancer Treat Rep* 1984; 64: 317-328.
- 68.- **NUTI M, MOTTOLESE M, VIORA M, DONNORSO P, SCHLOM J, NATALI PG.** Use of monoclonal antibodies to human breast tumor-associated antigens in fine needle aspirate cytology. *Int J Cancer* 1986; 37: 493-498.
- 69.- **GREINER JW, HORAN HAND P, NOGUEHI P, FISHER P, PESTKA S, SCLOM J.** Enhanced expression of surface Tumor Associated Antigens on human breast and colon tumor cells after recombinant leukocyte alpha Interferon treatment. *Cancer Res* 1984; 44: 3208-3214.
- 70.- **NEPOM GT, NELSON KA, HOLBECK SL, HELLSTRÖM I, HELLSTRÖM KE.** Induction of immunity to a human tumor marker by in vivo administration of anti-idiotypic antibodies in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2864-2867.

- 71.- **COLCHER D, HORAN HAND P, NUTI M, SCLOM J.** A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3119-3203.
- 72.- **NUTI M, TERAMOTO YA, MARIANI-CONSTANTIN E, HORAN HAND P, COLCHER D, SCHLOM J.** A monoclonal antibody (B72.3) defines patterns of novel Tumor-Associated Antigen in human mammary carcinomas cell populations. *Int J Cancer* 1982; 29: 539-545.
- 73.- **HORAN HAND P, COLCHER D, SALOMON D, RIDGE J, NOGUCHI PH, SCHLOM J.** Influence of spatial configuration of carcinoma cell populations on the expression of a Tumor-Associated-Glycoprotein. *Cancer Res* 1985; 45: 833-840.
- 74.- **JOHNSON VG, SCHLOM J, PATERSON AJ, BENNETT J, MAGNANI JL, COLCHER D.** Analysis of a human Tumor-Associated Glycoprotein (TAG-72) identified by monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res* 1986; 46: 850-857.
- 75.- **STRAMIGNONI D, BOWEN R, ATKINSON BF, SCHLOM J.** Differential reactivity of monoclonal antibodies with human colon adenocarcinomas and adenomas. *Int J Cancer* 1983; 31: 543:552.
- 76.- **TOM BH, RUTZKY LH, JAKSTYS MM, OYASU R, KAYE CI, KAHAN BD.** Human colonic adenocarcinoma cells. 1. Establishment and description of a new cell line. *In vitro (Rockville)*,1976; 12: 180-191.
- 77.- **MAGNANI J, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H, GINSBURG V.** Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res*,1983; 43: 5489-5492.

- 78.- **FAIBANKS G, STECK T, WALLACH D.** Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971; 10: 2606-2617.
- 79.- **ROSE M, VOTER W, BROWN C, KAUFMAN B.** Structural features of human tracheobronchial mucus glycoprotein. *Biochem J* 1984; 222: 371-377.
- 80.- **GOTTSCHALK A.** Definition of glycoproteins and their delineation from other carbohydrate-protein complexes. In: A. Gottschalk (ed), *Glycoproteins: Their composition, structure and function.* 1972:24-90. New York:Elsevier Publishing Co.
- 81.- **GAHMBERG C, ANDERSSON L.** Role of sialic acid in the mobility of membrane proteins containing O-linked oligosaccharides on polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Eur J Biochem*, 1982; 122: 581-586.
- 82.- **SHEER DG, SCHLOM J, COOPER HL.** Purification and composition of the human Tumor-Associated-Glycoprotein TAG-72 defined by monoclonal antibodies CC49 and B72.3. *Cancer Res* 1988; 43: 6811-6818.
- 83.- **KLUG TL, SATTLER MA, COLCHER D, SCHLOM J.** Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic determinant (CA72) on a novel pancarcinoma antigen (TAG-72). *Int J Cancer* 1986; 38: 661-669.
- 84.- **THOR A, VIGLIONE MJ, MURARO R, OHUCHI N, SCHLOM J, GORSTEIN P.** Monoclonal antibody B72.3. reactivity with human endometrium: a study of normal and malignant tissues. *Int J Gynecol Pathol* 1987; 6: 235-247.

- 85.- **THOR A, OHUCHI N, SZPAK CH A, JOHNSTON WW, SCHLOM J.** Distribution of oncofetal antigen Tumor-Associated-Glycoprotein-72 defined by monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res* 1988; 46: 311-3124.
- 86.- **HORAN HAND P, COLCHER D, WUNDERLICH D, NUTI M, TERAMOTO YA, KUFÉ D, SCHLOM J.** Rational basis for the diagnostic, prognostic, and therapeutic utility of monoclonal antibodies in the management of human breast cancer. In BA Chabner (ed), *Rational basis for chemotherapy, UCLA symposia on molecular and cellular biology*, vol 1, pp 315-318, New York A R Liss 1982.
- 87.- **RUIBAL A, SAGREDO E, SORIANO A, ROIZ MT.** TAG-72 sérica en mujeres afectas de cáncer de mama. Ejemplo de la discordancia suero-tejido de un marcador tumoral. *Medicina Clínica* 1989; 92: 39.
- 88.- **PATERSON AJ, SCHLOM J, SEARS HF, BENNET J, COLCHER D.** Radioimmunoassay for the detection of a human tumor associated glycoprotein (TAG-72) using monoclonal antibody B72.3. *Int J Cancer* 1986; 37: 659-666.
- 89.- **ATKINSON BF, ERNST CS, HERLYN M, STEPLEWSKI Z, SEARS HF, KOPROWSKI H.** Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res* 1982; 42: 4820-4823.
- 90.- **THOR A, GORSTEIN F, OHUCHI N, SZPAK CA, JOHNSTON WW, SCHLOM J.** Tumor-associated glycoprotein TAG-72 in ovarian carcinomas defined by a monoclonal antibody B72.3. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 995-1006.
- 91.- **JOHNSTON VG, SZPAK CA, LOTTICH SC, THOR A, SCHLOM J.** Use of a monoclonal antibody (B72.3) as a

immunocytochemical adjunct to the diagnosis of adenocarcinoma in human effusions. *Cancer Res*, 1985; 45: 1894-1900.

- 92.- **LUNDY J, LOZOWSKI M, MISHRUCI Y.** Monoclonal antibody B72.3 as a diagnostic adjunct in fine needle aspirates of breast masses. *Ann Surg* 1986; 203: 399-402.
- 93.- **LUNDY J, KLINE TS, LOZOWSKY M, CHAO S.** Immunoperoxidase studies by monoclonal antibody B72.3 applied to breast aspirates: Diagnostic considerations. *Diagn Cytopathol* 1988; 4: 95-98.
- 94.- **SZPAK CA, JOHNSTON WW, LOTTICH SC.** Patterns of reactivity of four novel monoclonal antibodies (72.3, DF3, B1.1 and B6.2) with cells in human malignant and benign effusions. *Acta Cytol* 1984; 28: 356-366.
- 95.- **SZPAK CA, JOHNSTON WW, ROGGLI V, KOLBECK J, LOTTICH SC, VOLLMER R, THOR A, SCHLOM J.** The diagnostic distinction between malignant mesothelioma of the pleura and adenocarcinoma of the lung as defined by a monoclonal antibody (B72.3). *Am J Clin Pathol* 1986; 122: 252-260.
- 96.- **COLCHER D, KEENAN AM, LARSON SM, SCHLOM J.** Prolonged binding of a radiolabeled monoclonal antibody (B72.3) used for the in situ radioimmunodetection of human colon carcinoma xenografts. *Cancer Res* 1984; 44: 5744-5751.
- 97.- **COLCHER D, CARRASQUILLO JA, ESTEBAN JM, SUGARBAKER P, REYNOLDS JC, SILER K, BRYANT G, LARSON S, SCHLOM J.** Radiolabeled monoclonal antibody B72.3. Localization in metastatic lesions of colorectal cancer patients. *Nucl Med Biol* 1987; 14: 251-262.

- 98.- **SICKLE-SANTANELLO BJ, O'DWYER PJ, MOJZISIK C ET AL.** Radioimmunoguided surgery using the monoclonal antibody B72.3 in colorectal tumors. *Dis Col & Rec* 1987; 30: 683-764.
- 99.- **COLCHER D, ESTEBAN J, CARRASQUILLO JA, SUGARBAKER P, REYNOLDS JC, BRYANT G, LARSON SM, SCHLOM J.** Complementation of intracavitary and intravenous administration of a monoclonal antibody (B72.3) in patients with carcinoma. *Cancer Res* 1987; 47: 4218-4224.
- 100.- **RENDA A, SALVATORE M, SAVA M, LANDI R ET AL.** Immunoscintigraphy in the follow-up of patients operated on for carcinoma of the sigmoid and rectum. Preliminary reports with a new monoclonal antibody: B72.3. *Dis Col & Rec* 1987; 30: 683-686.
- 101.- **MURARO R, KUROKI M, WUNDERLICH D, POOLE DJ, COLCHER D, THOR A, GREINER JW ET AL.** Generation and characterization of B72.3 second generation monoclonal antibodies reactive with the Tumor Associated Glycoprotein 72 Antigen. *Cancer Res* 1988; 48: 4588-4596.
- 102.- **FRIEDMAN E, THOR A, HORAN HAND P, SCHLOM J.** Surface expression of tumor-associated antigens in primary cultures human colonic epithelial cells from carcinomas, benign tumors, and normal tissues. *Cancer Res* 1985; 45: 5648-5655.
- 103.- **SAGREDO E, SORIANO A, POMBO L. ET AL.** CA 72.4 serum levels in patients having non malignant diseases. Our experience with 298 cases. *Int J Biol Markers* 1989; 4:125.
- 104.- **COLCHER D, MINELLI F, ROSELLI M, MURARO R, SIMPSON-MILENIC D, SCHLOM J.** Radioimmunolocalization of human carcinoma xenografts with B72.3 second generation monoclonal antibody. *Cancer Res* 1988; 48: 4597-4603.

- 105.- **DUKES CE.** The classification of cancer of the rectum. J.Pathol.Bacteriol 1932; 35: 323-332.
- 106.- **ASTLER VB Y COLLER FA.** The prognosis significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. Ann Surg 1954; 139: 846-852.
- 107.- **WINER BJ.** Statistical principles in experimental design. New York:Mc Graw Hill 1971.
- 108.- **KAPLAN EL, MEIER P.** Nonparametrics estimation from incomplete observations. J.Am Stat Asso 1958; 53: 457-481.
- 109.- **MANTEL N, MYERS M.** Problems of convergence of maximum likelihood iterative procedures in multiparameter situations. J Am Stat Assoc 1971; 66: 484-491.
- 110.- **COX DR.** Regresion models and life tables. JR Stat Soc B 1972; 34: 187-220.
- 111.- **CARBONI M, GUADAGNI S, CATAREI M ET AL.** Tratamiento quirúrgico del cáncer gástrico. Una experiencia de 15 años. Cir Esp 1991; 49: 209-215.
- 112.- **VIOGUE LOPEZ J. Y BOLUMAR MONTRUL F.** Epidemiologca del cáncer gástrico. En: Patologca del esófago y del estómago, Vol III. Madrid, Jarpyo Ed. 1989: 73-81.
- 113.- Mortalidad en Asturias 1991. Conserjerça de Sanidad y Servicios Sociales Principado de Asturias. Ed. S. de Publicaciones del Principado de Asturias.

- 114.- **CARBONEII ANTOLI C.** Tumores de estómago. En: Balibrea J.L, ed. Tratado de Cirugça. Barcelona Ed Toray 1989,pp 2057-2076.
- 115.- **STAAB HJ, BRUMMENDORF T, HORNING A ET AL.** The clinical validity of circulating tumor-associated antigens CEA and CA19-9 in primary diagnosis and follw-up of patients with gastrointestinal malignancies.Klin Wochenschr 1985; 63: 106-115.
- 116.- **OHUCHI N, THOR A, NOSE M, FUJITA J, KYOGOKU M, SCHLOM J.** Tumor-Associated Glycoprotein (TAG-72) detected in adenocarcinomas and benign lesions of the stomach. Int J Cancer 1986; 38: 643-650.
- 117.- **OHUCHI N, SIMPSON JF, COLCHER D, SCHLOM J.** Complementation of antiCEA and antiTAG-72 monoclonal antibodies in reactivity to human gastric adenocarcinoma. Int J Cancer 1987; 40: 726-733.
- 118.- **FATEH-MOGHADAM A, STIEBER P, LAMERZ R, WALDLICH H, NAGEL D, DENECKE H.** Univ. Munich, FRG. XVIIth Meeting of the International Society for oncodevelopmental Biology and Medicine. Freiburg, Sept 1989:18-22.
- 119.- **GONZALEZ FDEZ A, ALLENDE MT, VIZOSO F Y RUIBAL A.** Comportamiento de la glucoproteina asociada a tumores (TAG-72), definida por el monoclonal B72.3 en el suero de pacientes con patologças no tumorales. Rev Clin Esp 1990; 186: 362-363.
- 120.- **HEPTNER G, DOMSCHKE S, DOMSCHKE W.** Comparison of CA 72.4 with CA 19.9 and carcinoembryonic antigen in the serodiagnosis of gastrointestinal malignancies. Scand J Gastroenterol 1989; 24: 745-750.

- 121.- **OHUCHI N, MATOBA N, TAIRA Y ET AL.** Levels of circulating tumor-associated glycoprotein (TAG-72) in patients with carcinoma using a novel tumor marker, CA72-4. *Gan To Kagaku Ryoho* 1988; 15: 2767-2772.
- 122.- **OHUCHI N, TAKAHASHI K, MATOBA N ET AL.** Comparison of serum assays for TAG-72, Ca19-9 and CEA in gastrointestinal carcinoma patients. *Jpn J Clin Oncol* 1989; 19: 242-248.
- 123.- **SAGREDO E, SORIANO A, VIVANCO FJ, RUIBAL A.** Incremento de la eficacia diagnóstica del antígeno carcinoembrionario (CEA) en los cánceres gástricos mediante la dosificación simultánea del CA 72.4. *Rev. Clin.Esp* 1989; 184: 336-337.
- 124.- **BYRNE DJ, BROWNING MCK, CUSCHIERI A.** CA 72.3: A new tumour marker for gastric cancer. *Br J Surg*,1990; 77: 1010-1013.
- 125.- **MOTOO Y, SATOMURA Y, KAWAKAMI H, WATANABE H, OHTA H, OTAI T, SAWABU N.** Serum levels of Tumor-Associated Glycoprotein (TAG-72) in digestive cancers. *Oncology* 1990; 47: 456-462.
- 126.- **GERO EJ, COLCHER D, FERRONI P ET AL.** CA 72.3 radioimmunoassay for the detection of the TAG-72 carcinoma associated antigen in serum of patients. *J Clin Lab Anal* 1989; 3: 360-369.
- 127.- **BUDA F, ARAGONA P, GIANI G ET AL.** Pretreatment evaluation of CA72-4 in patients with carcinoma of the stomach (O-IV stage) versus CEA, TPA, CA19-9, FER. *G Ital Oncol* 1989; 9: 67-72.

- 128.- **FILELLA X, MOLINA R, JO J ET AL.** Tumor-Associated Glycoprotein-72 (TAG-72) levels in patients with non-malignant and malignant disease. *Bull Cancer Paris* 1992; 79: 271-277.
- 129.- **PIANTINO P, TACCONE W, FUSARO A.** Significance of CA 72-4 serum levels in gastrointestinal diseases. *Int J Biol Markers* 1990; 5: 77-80.
- 130.- **GUADAGNI F, ROSELLI M, AMATO T.** The CA72.4 assay as a novel serum marker in the management of gastrointestinal carcinoma. *J Tumor Marker Oncol* 1991; 6:31
- 131.- **TAKAHASY Y, MAI M.** Significance of CA72.4 as a follow-up of recurrent gastric cancer comparison with CEA and CA 19.9. *Gan to Kogaku Ryoho* 1992; 19: 515-518.
- 132.- **ROBERTS PJ, HAGLUND C, ONALI M, KUUSELA P.** Tumor markers in gastric cancer. *Ann Chir Gynaecol* 1989; 78: 38-40.
- 133.- **THOMPSON DMP, KUPREY J, FREEDMAN SOP.** The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Aca Sci USA* 1969; 64: 161-170.
- 134.- **AMADORI D, RAVAIOLI A, BISERNI R ET AL.** CEA levels in gastric juice in precancerous conditions and cancer. *Int J Biol Markers* 1987; 2.121: 101-104.
- 135.- **SHIMIZU N, WAKATSUKI T, MURAKAMI A ET AL.** Carcinoembryonic antigen in gastric cancer patients. *Oncology* 1987; 44: 240-244.
- 136.- **BURTIN P, SABINE MC, CHAVANEL G.** A comparative study of the localization of CEA and NCAZ in cancerous and normal gastrointestinal tissue. *Int J Cancer* 1977; 19: 634-641.

- 137.- 14th International Cancer Congress (UICC). Budapest 1986. Abstracts of Lectures, Symposia and Free Communications. Vol I,II y III.
- 138.- **STAAB HJ, ANDERER FA, BRUMMENDORF T, HORNUNG A, FISHER R.** Pronostic value of preoperative serum CEA level compared to clinical staging. II. Stomach cancer. Br J Cancer 1982; 45: 718-727.
- 139.- **RUIBAL MORELL A.** Marcadores Tumorales y Cáncer gástrico. En: Cáncer Gástrico Actualizaciones. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina Universidad de Navarra, 1988:46-52.
- 140.- **TATSUTA M, ITOH T, OKUDA S, YAMAHURA H, BABA M, TAMURA H.** Carcinoembryonic antigen in gastric juice as an aid in diagnosis of early gastric cancer. Cancer 1980; 46: 2686-2692.
- 141.- **MARTIN EW, KIBBEY WE, DE VECCHIA ET AL.** Carcinoembryonic antigen: Clinical and Historical aspects. Cancer 1976; 37: 62-81.
- 142.- **ELLIS DJ, SPEIRS C, KINSTON RD, BROOKES VS, LEONARD J, DYKES PW.** Carcinoembryonic antigen levels in advanced gastric carcinoma. Cancer 1978; 42: 623-625.
- 143.- **SAKAMOTO J, NAKAZATO H, TOGE T, MAI M ET AL.** The preoperative and postoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging and prognosis of gastric cancer. Tumor Marker Committee, Japanese Foundation for Multidisciplinary Treatment of Cancer. Nippon Gan Chiryō Gakkai Shi 1990; 25: 1095-1104.

- 144.- **HAMAZOE R, MAETA M, MATSUI T.** CA 72.4 compared with carcinoembryonic antigen as a tumour marker for gastric cancer. *Eur J Cancer* 1992; 28A: 1351-1354.
- 145.- **PARKIN DM, RTJERNSWARS J, MUIR CS.** Estimates for the world-wide frequency of twelve major cancers. *Bull WHO* 1984; 62: 163-182.
- 146.- **PIEDROLA G, DOMINGUEZ M, CORTINA P ET AL.** *Medicina Preventiva y Salud Pública.* Barcelona. Ed.Salvat.1988.
- 147.- **SUGARBAKER PH.** Surgical decision making for large bowel cancer metastatic to the liver. *Radiology* 1990; 174: 621-626.
- 148.- **LAMIQUIZ-VALLEJO A.** Interés clínico del CEA monoclonal y del CA19.9 en el diagnóstico y seguimiento del cáncer gastrointestinal. *Cirugía Esp.* 1988; 43: 56-61.
- 149.- **PORTER D, TUTTLE S, BUCCI D ET AL.** Bistribution of B72.3 antigen in primary and matastatic colorectal carcinoma. *Lab Invest* 1987; 56:61A.
- 150.- **LISTROM MB, LITTLE JV, MC KINLEY M, FENOGLIO-PREISER CM.** Inmunoreactivity of Tumor-Associated glycoprotein (TAG-72) in normal, hiperplastic and neoplastic colon. *Hum Pathol* 1989; 20: 994-1000.
- 151.- **WOLF BD, D'EMILIA JC, SALEM RR ET AL.** Detection of the Tumor-associated glycoprotein antigen (TAG-72) in premalignan lesions of the colon. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1913-1917.
- 152.- **GUADAGNI F, ROSELLI M, AMATO T ET AL.** Clinical evaluation of serum Tumor-associated Glycoprotein-72 as a novel

- tumor marker for colorectal cancer patients. *J Surg Oncol-suppl* 1991; 2:16-20.
- 153.- **FLETCHER RH.** Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med* 1986; 104: 66-73.
- 154.- **BEATTY JD, ROMERO C, BROWN PW ET AL.** Clinical value of carcinoembryonic antigen. Diagnosis, Prognosis and follow-up of patients with cancer. *Arch Surg* 1977; 114: 563-567.
- 155.- **MOERTEL CH G, O'FALLON JR, GO VL ET AL.** The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58: 603-610.
- 156.- **MIRIDI G, AMANTI C, CONSORTI F ET AL.** Usfulness of preoperative CEA levels in the assesment of the colorectal cancer patients. *J Surg Oncol* 1983; 22: 257-260.
- 157.- **GO VLW, ZAMNCHEK N.** The role of tumor markers in the management of colorectal cancer. *Cancer* 1982; 50: 2618-2623.
- 158.- **WOLMARK N, FISCHER B, WIEAND H ET AL.** The prognostic significance of preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal cancer. *Ann Surg* 1984; 199: 375-381.
- 159.- **WANEBO HJ, RAO H, PINSKY CM ET AL.** Preoperative carcinoembryonic level as a indicatos prognostic in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1978; 299: 448-451.
- 160.- **LEWI H, BLUMGART LH, CARTER DC ET AL.** Preoperative carcinoembryonic antigen and survival patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 1984; 71: 206-208.

- 161.- **FILELLA X, MOLINA R Y BALLESTA AM.** Marcadores tumorales asociados al cáncer colorrectal. *Neoplasia* 1992; 9: 24-28.
- 162.- **GOSLIN R, O'BRIEN MJ, STEELE G ET AL.** Correlation of plasma CEA and CEA tissue staining in poorly differentiated colorectal cancer. *Am J Ned* 1981; 71: 246-249.
- 163.- **DENK H , TAPPEINER G, ECKERSTOFER R ET AL.** Carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal and extra-gastrointestinal tumors and its relation ship to tumor-cell differentiation. *Int J Cancer* 1972; 10: 262-272.
- 164.- **STEELE GJR, ELLEMBARG S, RAMMIN GK ET AL.** CEA monitoring among patients in multi-institutional adjuvant GI therapy protocols. *Ann Surg* 1982; 196: 162-169.
- 165.- **SUÑOL L, BIANCHI A, MOTOS J, BADIA A, UBACH M.** Valoración de la cifra de CEA preoperatorio como factor pronóstico en la supervivencia del cáncer colorrectal. *Acta Chir Catal.* 1990: 11: 103-105.
- 166.- **GOSLIN R ET AL.** The use of preoperative plasma CEA levels for the stratification of patients after curative resection of colorectal cancers. *Ann Surg* 1980; 192: 747-751.
- 167.- **IMPERATO JP, SENER SF, CHINIEL J ET AL.** Colorectal cancer in Illinois. Demographic, treatment results and prognostic indicators in 7.792 patients treated between 1976-78. *Proc ASCO* 1988;7:353.
- 168.- **MARCUELLO E.** Marcadores tumorales en el cáncer colorrectal: valor pronóstico del CEA preoperatorio y utilidad en el second-look. Ponencia al Primer Simposium Internacional sobre Biología y Utilidad Clínica de los Marcadores Tumorales. Barcelona, Febrero 1986.

- 169.- **SZYMENDERA JJ, MAREK DSC, NOWACKI P.** Predictive value of plasma CEA levels: preoperative prognosis and posoperative monitoring of patients with colorectal carcinoma. *Dis Col & Rectum* 1982; 25: 46-52.
- 170.- **MINTON JP, MARTIN EW.** The use of serial CEA determinations to predict recurrence of colon cancer and when to do a second-look operation. *Cancer* 1978; 42: 1422-1427.
- 171.- **HINE RK, DYKES PW.** Serum CEA testing in posoperative surveillance of colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1984; 49: 689-693.
- 172.- **MAYER RJ, GARNIC MB, STEELE GD ET AL.** Carcinoembryonic antigen as a monitor of chemotherapy in disseminated colorectal cancer. *Cancer* 1978; 42: 1428-1433.
- 173.- **NORTON J.** Carcinoembryonic antigen: New applications for an old marker. *Ann Surg* 1991; 231: 95-97.
- 174.- **MARTIN BELTRAN A ET AL.** Mortalidad por cáncer de esófago en España (1951-1983). *Oncología* 1989; 12: 32-37.
- 175.- **EARLAM R, CUNHA-MELO JR.** Oesophageal squamous cell carcinoma:II. A critical review of surgery. *Br J Surg* 1980; 67: 381-457.
- 176.- **FERGUSON MK, LITTLE AG AND SKINNER DB.** Barrett's esophagus. *Adv Surb* 1978; 21: 127-134.
- 177.- **WICHULIS AR, WOOLAM GL, ANDERSON HA ET AL.** Achalasia and carcinoma of the esophagus. *JAMA* 1971; 215:1638-1641.

- 178.- **TAKASAKI H, TEMPERA MA, UCHIDA E. ET AL.** Comparative studies on the expression of tumor-associated glycoprotein (TAG-72), CA 19-9 and DU-PAN-2 in normal, benign and malignant pancreatic tissue. *Int J Cancer* 1988; 42: 681-686.
- 179.- **LAN MS, BAST RC JR, COLHAGHI MI ET AL.** Co-expression of human cancer associated epitopes on mucin molecules. *Int J Cancer* 1987; 39: 68-72.
- 180.- **ALLUM WH.** Radioimmunolocalization of tumours of the pancreas and biliary tree. *Baill Clin Gastroenterol* 1990; 4: 853-867.
- 181.- **LYUBSKY S, MADARIAGA J, LOZOWSKI M ET AL.** A Tumor-Associated in carcinoma of the pancreas defined by Monoclonal Antibody B72.3. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 160-167.
- 182.- **FITZGERALD PJ, FORTNER JG, WATSON RC ET AL.** The value of diagnostic aids in detecting pancreas cancer. *Cancer* 1978; 41: 868-879.
- 183.- **BARKIN JJ, KALSER MH, KAPLAN R ET AL.** Initial levels of CEA and their rate of change in pancreatic carcinoma following surgery, chemotherapy and radiation therapy. *Cancer* 1978; 42: 1472-1476.

## **ABREVIATURAS**

- **AM** : Anticuerpo Monoclonal
- **DAC** : Dintel de Actividad Clínica
- **IRC** : Insuficiencia Renal Crónica
- **LSN** : Límite Superior de Normalidad
- **MFQ** : Mastopatía Fibroquística
- **MT** : Marcador Tumoral
- **RIA** : Radioinmunoanálisis
- **TLE** : Supervivencia Libre de Enfermedad
- **TAA** : Antígeno Asociado a Tumores
- **TAG** : Glucoproteína Asociada a Tumores