

# Revista de la Facultad de Medicina

Volumen  
Volume **48**

Número  
Number **5**

Septiembre-Octubre  
September-October **2005**

*Artículo:*

Validación clínica de un método inmunoanalítico de tamiz en la detección de cáncer mamario: Un estudio piloto

Derechos reservados, Copyright © 2005:  
Facultad de Medicina, UNAM

Otras secciones de  
este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



**medigraphic.com**

## Artículo original

# Validación clínica de un método inmunoanalítico de tamiz en la detección de cáncer mamario: Un estudio piloto

Gregorio Pérez-Palacios,<sup>1</sup> Hernando Miranda,<sup>2</sup> Jaime Carreón<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Investigación, Enseñanza y Comunicación en Salud Reproductiva, Depto. de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM/Hospital General de México.

<sup>2</sup> Clínica de Cáncer Mamario, Servicio de Oncología, Hospital General de México.

<sup>3</sup> Laboratorios Columbia, SA de CV.

## Resumen

Con el objetivo de determinar la utilidad de un método inmunoanalítico para la cuantificación simultánea en plasma de dos enzimas estrógeno-dependientes, como prueba de tamiz en la detección de cáncer mamario, se realizó un estudio piloto, abierto, en el que participaron 60 mujeres, 18 en quienes se estableció el diagnóstico de cáncer mamario y 42 mujeres normales o con patología mamaria benigna de la mama de acuerdo al estudio anatopatológico. La concentración plasmática de NDP-cinasa y Leucina-aminopeptidasa se determinó por un inmunoanálisis enzimático en serie (ELISA), utilizando anticuerpos monoclonales específicos y los resultados se expresaron como unidades de ligando unido (ULU)  $\times 10^2/\text{mL}$  (media  $\pm$  EE). Los resultados indican que la media de la concentración plasmática de las dos enzimas en pacientes con cáncer mamario fue de  $1289.0 \pm 81.4 \text{ ULU} \times 10^2/\text{mL}$ , mientras que en mujeres normales o con patología mamaria benigna fue de  $929.0 \pm 70.7$ . El punto de corte se estableció por el método ROC en  $990.0 \pm 20.0$ . Los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 88.8% y 69.0%, mientras que los valores predictivos positivo y negativo del método fueron de 55.1% y 93.5% respectivamente. Los resultados del estudio piloto son alentadores, sugiriendo que este método podría ser utilizado como prueba de tamiz, para discriminar a las mujeres sanas de las que tienen patología mamaria, aunque para su uso en población abierta, aún requiere de validación clínica amplia, a través de la conducción de estudios adicionales, ciegos y multicéntricos.

**Palabras clave:** Cáncer mamario, NDP-cinasa, Leucina-aminopeptidasa.

## Summary

To assess whether the simultaneous determination of two estrogen-dependent enzymes in blood, may serve as screening test for breast cancer, a pilot, open study was conducted in 60 volunteer women. Mammography was used as the gold

standard in the recruitment process; diagnosis of breast cancer or benign breast diseases was established by histological examination of breast biopsies. NDP-kinase and Leucine-aminopeptidase blood concentrations were determined using a tandem ELISA with specific monoclonal antibodies, and the results were expressed as ligand bound units (LBU)  $\times 10^2/\text{mL}$  (mean  $\pm$  SEM). One group included 18 women with diagnosis of breast cancer, while the second group was integrated by 42 volunteers either normal or with benign breast diseases. The enzymes plasma content in women with breast cancer was  $1289.0 \pm 81.4 \text{ LBU} \times 10^2/\text{mL}$ , while in women with no malignancy was  $929.0 \pm 70.7 \text{ LBU} \times 10^2/\text{mL}$ . Clinical sensitivity and specificity of the method were 88.8% and 69.0% respectively, while the positive predictive value was 55.1%, and the negative predictive value was 93.5%. The overall data suggest that this immunoassay could be used as a screening test to discriminate healthy women from those who have breast cancer, yet still require of a wide clinical validation through additional, blind, multicenter studies.

**Key words:** Breast cancer NDP-Kinase, Leucine-aminopeptidase.

## Introducción

El cáncer mamario representa un reto de salud pública a nivel mundial.<sup>1</sup> En México, el cáncer de mama constituye la segunda causa de muerte por enfermedades neoplásicas en mujeres de 25 años y más.<sup>2</sup> Debido a la naturaleza multifactorial de esta neoplasia maligna, la investigación biomédica contemporánea se ha orientado al desarrollo de métodos diagnósticos o de tamiz que permitan su detección temprana.

La identificación de genes, oncogenes y factores de crecimiento,<sup>3</sup> activados o expresados inadecuadamente en el cáncer mamario invasivo, estimuló el desarrollo de procedimientos diagnósticos de alta complejidad metodológica y por consiguiente poco prácticos para la identificación y detección de mujeres con cáncer de mama en el ámbito poblacional.<sup>4,5</sup>

Debido al origen multifactorial, dependiente de hormonas esteroideas sexuales<sup>6,7</sup> recientemente se inició la búsqueda de biomarcadores sensibles a estímulos hormonales prolongados, donde el papel de los estrógenos, en el inicio y progresión del cáncer de mama, ha sido bien documentado.<sup>8</sup> Se estima que la mayor parte de tumores malignos de la mama (~ 95%), ya sea que ocurra durante la vida reproductiva de la mujer o en la etapa posmenopáusica, son inicialmente estrógeno-sensibles y estrógeno-dependientes.

Gupta y cols.<sup>9,10</sup> fueron de los primeros en informar la sobre-expresión de la actividad de la leucina-aminopeptidasa (EC 3.4.11.1) en cáncer mamario y en otros cánceres estrógeno-dependientes de la mujer, señalando que la cuantificación de la actividad de esta enzima podría ser un indicador sensible en estas neoplasias malignas. Recientemente varios grupos de investigadores<sup>11</sup> han demostrado que la expresión de otra enzima, la NDP-cinasa (EC 2.7.4.6) se incrementa en las células malignas de carcinomas mamarios aunque su correlación con el potencial metastásico de los tumores ha sido muy controvertida. La NDP-cinasa es producto del gene Nm 23-H1 y se le ha relacionado con la actividad metastásica de tumores sólidos.<sup>12</sup>

Tomando ventaja de que ambas enzimas entran a la circulación sistémica y su concentración puede ser cuantificada, se desarrolló y patentó un método inmunoanalítico acoplado (en tandem) que permite cuantificar simultáneamente la concentración de NDP-cinasa y leucina-aminopeptidasa (LA-peptidasa) en muestras plasmáticas.<sup>13</sup> El inmunoanálisis utiliza anticuerpos monoclonales, altamente específicos contra las dos enzimas, que se producen en hibridomas de líneas celulares de bazo de ratones inmunizados, fusionados con células de mieloma.<sup>14,15</sup>

Con el propósito de validar la utilidad clínica de la cuantificación plasmática de NDP-cinasa y LA-peptidasa como un método de tamiz en la detección de cáncer mamario, se realizó un estudio piloto, abierto, cuyo objetivo puntual fue el establecer la sensibilidad y especificidad clínica, los valores predictivos y el valor de corte de este método inmunoanalítico.

## Material y métodos

### Población de estudio

El protocolo del estudio clínico piloto fue revisado y aprobado por los Comités de Investigación y Etica del Hospital General de México. Un total de 60 mujeres de la consulta externa y del Servicio de Oncología del hospital decidieron participar en el estudio y firmaron el formato de consentimiento informado. Las edades de las participantes estuvieron comprendidas entre 35 y 69 años y ninguna de ellas estaba embarazada o en periodo de lactancia, y no estaban bajo tra-

tamiento con quimioterapia, agentes citotóxicos, radioterapia, antiestrógenos o moduladores selectivos de receptores de estrógenos. A todas las mujeres participantes se les realizó historia clínica, incluyendo identificación de factores de riesgo, exploración de glándulas mamarias, y se obtuvieron imágenes de mastografía que se interpretaron en los Servicios de Imagenología y Oncología del hospital. En todos los casos con imagen tumoral mamaria, el diagnóstico final se estableció por el examen histológico de biopsias mamarias, obtenidas por aspiración con aguja fina.

Con base en los resultados de mastografía y de examen histopatológico, las participantes se asignaron a dos grupos: Grupo 1 se integró con 18 mujeres con cáncer de mama, y Grupo 2 incluyó a 42 mujeres normales o con patología mamaria benigna.

### Obtención de muestras y cuantificación enzimática:

En las 60 mujeres participantes se obtuvieron por punción venosa, muestras de sangre (8 mL) en tubos de vidrio (Vacutainer, Becton Dickinson) que contenían como solución anticoagulante citrato trisódico 22 g/L, ácido cítrico 8.0 g/L y dextrosa 24.5 g/L. Las muestras se codificaron acorde al procedimiento diseñado para este estudio, se mantuvieron a temperatura ambiente y se enviaron, dentro de las primeras 72 horas, a Canbreal Theragnostics (Ottawa, Canadá) para su procesamiento.

Todas las muestras de sangre se centrifugaron y su contenido plasmático de NDP-cinasa y LA-peptidasa se determinó por un método inmunoanalítico (ELISA) utilizando los anticuerpos monoclonales desarrollados contra las dos enzimas, así como un anticuerpo secundario. La evaluación de las reacciones antígeno-anticuerpo se determinó por fluorometría utilizando un espectrómetro, Modelo Spectra Max (Molecular Devices) y la concentración de los ligandos se calculó de curvas estándar dosis-respuesta, de seis puntos, con cinco concentraciones crecientes de la dos enzimas purificadas<sup>13,16</sup> y el testigo. Los datos se procesaron utilizando el programa de cómputo Sofá-Max Pro-software. Los resultados se expresan como unidades de ligando unido (ULU) X 10<sup>-2</sup>/mL de plasma (media ± EE). La sensibilidad del método inmunoanalítico, informada por el laboratorio canadiense fue de 0.008 ULU X 10<sup>-2</sup>/mL de plasma y su coeficiente de variación fue < 4%.

### Análisis estadístico

En análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, de estadística no-paramétrica<sup>17</sup> y la significancia de las diferencias entre grupos se estableció por medio de la prueba de Dunn.<sup>18</sup> El punto de corte óptimo de los resultados de la cuantificación enzimática se determinó por el método de curvas, denominado ROC por sus siglas en inglés (Receiving Operating Characteristics).<sup>19</sup> La sensibilidad y especificidad clínica del método y los valo-

res predictivos positivo y negativo se obtuvieron utilizando metodología estadística internacionalmente aceptada.<sup>20</sup>

## Resultados

El examen de las mastografías mamarias bilaterales realizadas en las 60 mujeres participantes en el estudio reveló que 28 mujeres presentaban imágenes anormales (tumoraciones o lesiones difusas) y 32 mujeres presentaban imágenes normales de las glándulas mamarias. El examen histológico de las muestras de biopsia obtenidas en las 28 mujeres con anomalías en la mastografía mamaria, permitió establecer el diagnóstico de cáncer mamario en 18 mujeres y de enfermedad benigna de la mama en 10 mujeres. Los casos de cáncer mamario incluían carcinomas ductales o canaliculares *in situ*, en estadios tempranos ( $n = 9$ ) y carcinomas infiltrantes en estadios avanzados ( $n = 9$ ), mientras que los casos de patología benigna incluían fibroadenomas mamarios ( $n = 7$ ), quistes benignos de la mama ( $n = 2$ ) y mastopatía fibroquística ( $n = 1$ ).

La concentración plasmática de NDP-cinasa y LA-peptidasa inmunodetectadas por el método de ELISA en tandem, en pacientes con cáncer mamario ( $n = 18$ ) fue de  $1289.0 \pm 81.4$  ULU X  $10^{-2}$ /mL de plasma (media  $\pm$  EE). No se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.520$ ) en los valores en pacientes con carcinoma mamario infiltrante en estadios avanzados. De manera similar, no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.715$ ) en las concentraciones plasmáticas de las dos enzimas, entre las mujeres normales y aquéllas con patología mamaria benigna.

La correlación de los datos clínicos, incluyendo los hallazgos imagenológicos e histopatológicos, con los valores de la concentración plasmática de NDP-cinasa y LA-peptidasa, utilizando el valor óptimo de corte, permitió la identificación de 16 valores positivos verdaderos y 29 valores negativos verdaderos, así como 13 valores falsos positivos y dos falsos negativos. El análisis estadístico reveló que la sensibilidad clínica del método inmunoanalítico en estudio fue de 88.8%, mientras que la especificidad clínica fue de 69.0%. Los valores de predicción positiva y negativa del método, utilizándolo como prueba de tamiz fueron de 55.1% y 93.5% respectivamente.

## Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio piloto demostraron que las concentraciones circulantes, inmunorreactivas de NDP-cinasa y LA-peptidasa en pacientes con cáncer de mama son significativamente diferentes de las de mujeres normales, o con tumores o procesos patológicos benignos de la glándula mamaria. En el universo poblacional del estudio ( $n = 60$ ), se encontró una adecuada correlación entre los hallazgos clínicos y los resultados del método inmunoanalítico en 45 participantes, con 13 valores de laboratorio falsos posi-

tivos y únicamente dos valores falsos negativos. Estos datos confirman y amplían observaciones previas que indican una sobre-expresión de la actividad de las dos enzimas estudiadas en tumores malignos de mama y posiblemente en otras neoplasias estrógeno-dependientes. El hallazgo de que la concentración plasmática de NDP-cinasa y LA-peptidasa se encuentra incrementada en pacientes con cáncer mamario, sugiere que la cuantificación de estas enzimas pudiera utilizarse como marcador en la detección de esta neoplasia maligna. Debe señalarse sin embargo que concentraciones incrementadas de estos biomarcadores se esperarían en mujeres con otras neoplasias malignas estrógeno-dependientes, como el cáncer endometrial y el cáncer ovárico, lo que amerita estudios adicionales de investigación.

La sensibilidad clínica del método obtenida en el estudio, indica que el 88.9% de mujeres con cáncer mamario en quienes se realice la prueba, tendrán concentraciones de las enzimas  $> 990.0 \pm 20.0$  ULU X  $10^{-2}$ /mL de plasma (prueba positiva), mientras que la especificidad clínica indica que el 69.0% de las mujeres sin cáncer mamario, en quienes se realice la prueba tendrán concentraciones de los marcadores  $< 990.0 \pm 20.0$  ULU X  $10^{-2}$ /mL de plasma (prueba negativa). El valor predictivo positivo del método obtenido en el estudio indica que el 55.1% de las muestras con valores  $> 990.0 \pm 20.0$  ULU X  $10^{-2}$ /mL de plasma corresponderán a mujeres con cáncer mamario, mientras que el valor predictivo negativo señala que el 93.5% de valores  $< 990.0 \pm 20.0$  ULU X  $10^{-2}$ /mL de plasma corresponderán a mujeres sin cáncer mamario.

Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas en pacientes con cáncer mamario en diferentes estadios de progresión, una observación que apoyaría el concepto de que el incremento en la concentración y actividad de estas enzimas en neoplasias hormono-dependientes es el resultado de estímulos estrogénicos acumulados, que se asocia al origen de estas neoplasias malignas.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencias que indican que la cuantificación inmunoanalítica de las concentraciones plasmáticas de NDP-cinasa y LA-peptidasa, a través de un método innovador, sencillo, no invasivo pueden ser utilizados como una prueba de tamiz que logre discriminar a las mujeres sin evidencia de malignidad de las que tengan cáncer de mama. Los resultados obtenidos en el estudio piloto son alentadores y justifican la conducción de estudios adicionales ampliados de validación clínica, multicéntricos, particularmente por el alto impacto que una prueba de tamiz, como la aquí descrita, tendría en términos de salud de la mujer, al contribuir a la detección y manejo oportuno del cáncer mamario, reduciendo tasas de mortalidad por esta causa en mujeres de 25 y más años.

## Agradecimientos

El estudio fue parcialmente financiado por Laboratorios Columbia, SA de CV (Méjico, D.F.). Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Gabriel Pulido-Cejudo, Canbreal Therodiagnostics Inc. (Ottawa, Canada) por el procesamiento de las muestras. Se agradece además el apoyo de la Dra. Marcela Vela, QFB Sandra Martínez y Dra. Elsa Sarti.

## Referencias

1. Parkin M. Global cancer statistics in the year 2000. *The Lancet* 2001; 2: 533-542.
2. Pérez-Palacios G, Varela Y, Catalán A, Vega A, Garza-Flores J. Programa de Reforma del Sector Salud 1995-2000: Indicadores de Salud Reproductiva. *Gac Med Mex* 2000; 136 Supl 1: 23-53.
3. Pasqualini R, Katzenellenbogen BS. Hormona-dependent cancer, New York, Marcel Dekker Inc, 1996.
4. Rebbeck TR. Genetic heterogeneity in hereditary breast cancer: Role of BRCA-1 and BRCA-2. *Amer J Hum Gen* 1996; 59: 547-553.
5. Bernstein JL, López-Carrillo L, Wang L. The epidemiology of Her-2/neu and p53 in breast cancer. *Salud Pub Mex* 1999; 41: S114-S123.
6. Lippman ME, Dickson RB, Bates S et al. Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1986; 7: 59-70.
7. Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 1988; 48: 246-253.
8. Girdler F, Brotherick I. The oestrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and their role in breast cancer: A review. *The Breast* 2000; 9: 194-200.
9. Gupta SK, Aziz M, Kahan AA. Serum leucine aminopeptidase stimulation: A sensitive prognostic indicator of invasiveness in breast carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 1989; 32: 301-305.
10. Gupta SK, Aziz M, Kahn AA. Moshin S. Significance of serum leucine aminopeptidase in tumours of female genital tract. *J Indian Med Assoc* 1989; 87: 68-70.
11. Lacombe ML, Sastre-Garau X, Lascau I et al. Overexpression of nucleoside diphosphate kinase (Nm 23) in solid tumors. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1302-1307.
12. Sastre-Garau X, Lacombe ML, Jouve M, veron M, Magdelenat H. Nucleoside diphosphate kinase/Nm 23 expression in breast cancer: lack of correlation with lymph-node metastasis. *Int J Cancer* 1992; 50: 533-538.
13. Tandem immunoassay for cancer. Canadian Patent, Serial Number 2 303 598, File 08-8863 63Ca, june 2000. Canbreal Therodiagnostics.
14. Leucine-aminopeptidase monoclonal antibody, Canadian Patent, Serial Number CA 2303505, File 2267481, march 2000. Canbreal Therodiagnostics.
15. NDP-kinase monoclonal antibody, Canadian Patent, Serial Number CA2108533, File 07/962238, October 2002, Canbreal Therodiagnostics.
16. Pulido-Cejudo G, Gagnon J, Leclerc JM, Jamison K, Gordon J, Campione-Piccardo J. Measurement of nucleoside diphosphate-kinase-nm 23 activity by ion exchange high performance liquid chromatography. *J Chrom B* 1994; 660: 37-47.
17. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments, Belmont Va, Wiley, 1991.
18. Stevenson W. Estadística para Administración y Economía, México DF, Editorial Harla, 1982.
19. Chol CK. Slopes of a receiver operating characteristics curves and likelihood ratios for a diagnostic test. *Amer J Epidemiol* 1991; 48: 128-132.
20. Editorial Resource Corner (Glossary). *ACPJ Club* 2000; 133: A-21.

