

La cuantificación de antiproteasas séricas como marcador en neoplasias. Estudio crítico de su utilidad

J. Millán, A. Senra, A. Lorenzo y J.J.B. López Sáez

Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz

Para intentar valorar la reacción orgánica frente a las proteasas tumorales, estudiamos los niveles de las principales antiproteasas séricas, alfa₁-antitripsina y alfa₂-macroglobulina, en 273 y 103 enfermos tumorales, respectivamente; los resultados se compararon con los encontrados en 180 y 96 personas normales, respectivamente. Las diferencias encontradas fueron significativas en ambos casos ($p < 0,0005$). Se ha analizado la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de cada una de las pruebas, para niveles superiores a la media más dos desviaciones estándar del grupo control y se ha encontrado una especificidad superior al 90 % para cualquiera de las pruebas y un valor predictivo positivo del 95 % para la alfa₁-antitripsina y del 83 % para la alfa₂-macroglobulina.

El estudio de la distribución porcentual de los valores así como la relación entre verdaderos positivos y falsos positivos para los distintos niveles de cada una de las antiproteasas (ROC curves), evidencia que la alfa₁-antitripsina puede ser utilizada como marcador biológico más propiamente que la alfa₂-macroglobulina.

The quantification of serum antiproteases as markers of neoplasia. A critical study of its usefulness

In an attempt to evaluate the organic reaction to tumour proteases we have studied the levels of the main serum antiproteases (alpha₁-antitrypsin and alpha₂-macroglobulin) in 273 and 103 patients with neoplasia, respectively, and we have compared the results with those from 180 and 96 normal individuals, respectively. The differences were significant in both instances ($p < 0.0005$). We have analyzed the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of each test for levels higher than the mean plus two standard deviations of the control group. The specificity was higher than 90 % for all tests, and the positive predictive value was 95 % for alpha₁-antitrypsin and 83 % for alpha₂-macroglobulin.

The study of the percent distribution of values, as well as the relation between true and false positives for the different levels of each antiprotease (ROC curves), disclosed that alpha-1-antitrypsin can be more adequately used as a biological marker than alpha-2-macroglobulin.

Med Clin (Barc) 1988; 90: 195-198

Correspondencia: Dr. J. Millán. Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. 11002 Cádiz

Manuscrito aceptado el 23-6-1987

Aunque ciertos marcadores biológicos tienen una especificidad muy elevada en algún caso particular de tumores, como ocurre con el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la alfafetoproteína (AFP)^{1,2}, lo cierto es que no es fácil encontrar un ideal y único marcador específico de cáncer en el suero de pacientes con neoplasias³.

Probablemente, la razón para ello reside en la propia naturaleza de los marcadores que, la mayoría de las veces, son productos de la biología celular. En muchas ocasiones, se han estudiado proteínas celulares, pero existe un gran espectro de proteínas que pueden ser sintetizadas en la célula, máxime si ésta no tiene una clara diferenciación, tal y como ocurre en el caso de la célula tumoral³. Esto ha motivado el estudio de numerosas proteínas, las cuales han mostrado una escasa especificidad como marcadores biológicos de cáncer.

La posibilidad de que una prueba pueda detectar la presencia de todos los tipos de cáncer o al menos de la mayoría, radica en el supuesto de que la neoplasia origina un cambio único y común a todos los tipos⁴. Este cambio puede tener lugar en la composición de algún líquido biológico o puede ser un fenómeno de respuesta del huésped. En ocasiones, el fenómeno de respuesta del huésped se traduce en la composición de los líquidos biológicos especialmente en el suero, por lo que el estudio de ciertas proteínas, denominadas de fase aguda, se ha considerado útil como ayuda al diagnóstico^{5,6} aunque también con escasa especificidad⁷.

La mayoría de las llamadas proteínas de fase aguda, o reactantes de fase aguda, son glucoproteínas. Nosotros hemos estudiado alguna de estas glucoproteínas, en particular aquellas componentes del suero con capacidad antiproteásica, con objeto de demostrar si su cuantificación puede ser utilizada como marcador biológico de cáncer⁸, habida cuenta de que sus modificaciones en el suero pueden ser el reflejo de la existencia de proteasas en las células tumorales, aspecto éste que ha quedado suficientemente demostrado⁹⁻¹¹.

Sin embargo, por todo lo expuesto previamente, es lógico pensar que en el mo-

mento actual no es posible analizar exclusivamente el comportamiento cuantitativo de una prueba biológica, para evaluar su posible utilidad como marcador. Es preciso valorar una serie de indicadores cualitativos matemáticos que informen de su eficacia real, que de otra forma podría parecer engañosa. En este trabajo pretendemos dar respuesta al problema planteado de si las principales antiproteasas séricas (alfa₁-antitripsina y alfa₂-macroglobulina) pueden ser consideradas y utilizadas como marcadores biológicos, mediante el estudio de sus modificaciones bajo distintos aspectos.

Material y método

Se han estudiado los niveles de alfa₁-antitripsina sérica en un grupo de 273 enfermos afectados de tumores de distintas localizaciones, todos ellos con verificación histológica (varones 45 % y mujeres 54,9 %; con una edad media de 57,8 años) y en un grupo de 180 individuos normales, voluntarios sanos o donantes de sangre (varones 68,3 % y mujeres 31,6 %, con una edad media de 34,5 años).

Paralelamente, se han estudiado los niveles de alfa₂-macroglobulina sérica en un grupo de 103 pacientes neoplásicos (varones 51,4 % y mujeres 48,5 %, con una edad media de 60,01 años) y en una población de 96 personas normales (varones 62,5 % y mujeres 37,5 %, con una edad media de 34,5 años).

La técnica de determinación ha sido la inmunodifusión radial simple¹² y los resultados se han expresado en mg/dl. Se han utilizado discos de inmunodifusión radial Partigen (Instituto Behring).

Se han comparado las cifras medias encontradas en los distintos grupos mediante la prueba de la t de Student.

Para valorar la utilidad diagnóstica real, se han analizado parámetros de dispersión y centralización, en particular el intervalo admisible para la cifra media (IA_{x̄}) y desviación estándar (IA_{DS}) del grupo control, calculados para un nivel de fiabilidad del 99 %, y, respectivamente, a partir de los errores típicos de la cifra media (S_{x̄}) y de la desviación estándar (S_{DS}), y de los correspondientes errores máximos por azar (E_{x̄} y E_{DS})¹³ de acuerdo con las fórmulas $S_{x̄} = \frac{DS}{\sqrt{n-1}}$

$E_{x̄} = 2,6 \times S_{x̄}$, $IA_{x̄} = \bar{x} \pm E_{x̄}$ para la cifra media, y $S_{DS} = 0,707 \times S_{DS}$, $E_{DS} = 2,6 \times S_{DS}$, $IA_{DS} = DS \pm E_{DS}$ para la desviación estándar.

Se ha calculado la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de cada prueba, a partir de las fórmulas basadas en el teorema de Bayes¹⁴. La sensibilidad es la probabilidad de que un enfermo tenga la prueba positiva [(enfermos con prueba positiva / n° total de enfermos) × 100], mientras que la especificidad es la probabilidad de que una persona no enferma tenga la prueba negativa [(no enfermos con prueba negativa / n° total de no enfermos) × 100]; por otra parte, el valor predictivo positivo es la probabilidad de que un individuo con prueba positiva padezca la enfermedad [(enfermos con prueba positiva / n° total de individuos con prueba positiva) × 100] y el valor predictivo negativo, la probabilidad de que un individuo con prueba negativa no padezca la enfermedad [(no enfermos con prueba negativa / n° total de individuos con prueba negativa) × 100].

Se han comparado los resultados obtenidos en el grupo de personas sanas y neoplásicas, considerando la distribución del porcentaje de individuos (sanos o enfermos) que presentan los distintos niveles de antiproteasas, lo que de acuerdo con los trabajos de Weinstein y Fineberg¹⁵ permite valorar gráficamente la posible utilidad al aplicar una prueba cuantitativa. Por último, se ha construido la ROC curve (receiving operating characteristics curve) a partir de los resultados verdaderos positivos y falsos positivos para distintos niveles séricos de las proteínas, lo que permite valorar gráficamente la capacidad de discriminación de una prueba cuantitativa¹⁵.

TABLA 1

Concentraciones de alfa₁-antitripsina (A1AT) y alfa₂-macroglobulina (A2M) expresadas en mg/dl (X̄ ± DE), en los grupos estudiados

	Grupo control	Intervalo admisible*		Pacientes neoplásicos	Significación estadística (p)**
		X̄	DE		
A1AT	341,00 ± 110,7	319,48 ± 362,52	95,53 - 125,96	626,74 ± 326,51	< 0,0005
A2M	317,65 ± 105,4	289,53 ± 345,76	85,52 - 125,27	414,96 ± 211,62	< 0,0005

* Nivel de fiabilidad del 99 %
** Prueba t de Student

Resultados

La cifra media de alfa₁-antitripsina (A1AT) sérica en el grupo control fue 341 ± 110,7 mg/dl, mientras que en el grupo tumoral resultó ser 626,74 ± 326,51 mg/dl. La diferencia entre ambos grupos mostró una elevada significación estadística (p < 0,0005). En lo que se refiere a la alfa₂-macroglobulina (A2M), la cifra media encontrada en las personas nor-

males fue 317,65 ± 105,40 mg/dl, mientras que 414,96 ± 211,62 mg/dl, fue la que se encontró en los pacientes neoplásicos. La diferencia entre ambos grupos fue, asimismo, estadísticamente significativa (p < 0,0005) (tabla 1). Analizando el intervalo admisible para la cifra media del grupo control (IA_{x̄}), en un nivel de fiabilidad del 99 %, su límite superior resultó ser 362,52 mg/dl para la A1AT y 345,76 mg/dl para la A2M; así

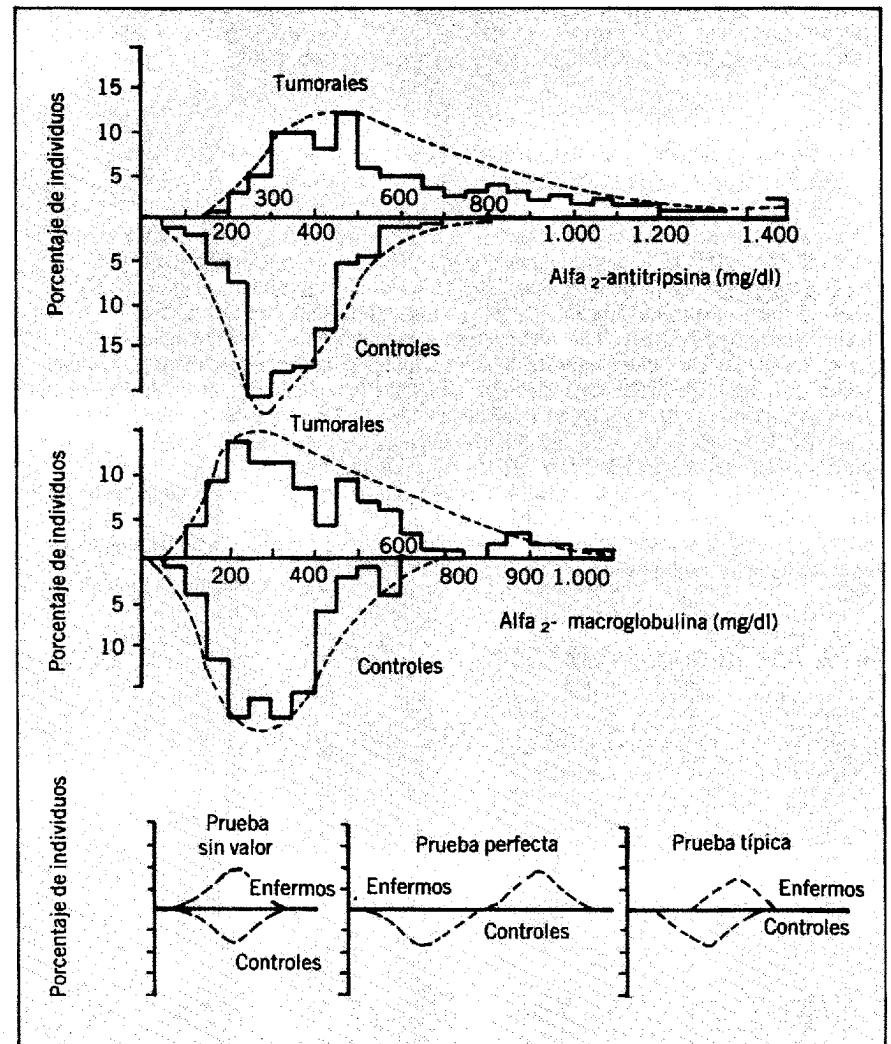


Fig. 1. Distribución porcentual de las cifras de alfa₁-antitripsina y alfa₂-macroglobulina en los grupos estudiados. En la parte inferior se representan tres tipos de distribución gráfica para valorar la utilidad de una prueba diagnóstica (tomada de Weinstein y Fineberg¹⁵).

pues, las cifras medias del grupo tumoral fueron superiores: 626,74 mg/dl y 414,96 mg/dl, respectivamente (tabla 1).

Al considerar el intervalo admisible para la desviación estándar del grupo control (IA_{95}), con el mismo nivel de fiabilidad, resultó un límite superior de 125,96 para la A1AT y 125,27 para la A2M, cifras inferiores a las encontradas en los pacientes neoplásicos (326,51 y 211,62, respectivamente), lo que demuestra una mayor dispersión de los resultados en estos últimos grupos (tabla 1).

Para calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de cada prueba, se han considerado dos niveles a la hora de calificar la prueba como positiva: cifras superiores al intervalo admisible para la cifra media del grupo control y cifras superiores a la suma de la cifra media \pm dos desviaciones estándar del grupo control. Como se observa en la tabla 2, donde se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo para cada uno de estos niveles y para cada una de las antiproteasas, a medida que la especificidad es mayor, la sensibilidad es menor y viceversa. Debe destacarse que la especificidad supera el 90 % para ambas pruebas cuando consideramos cifras notoriamente elevadas; llega al 96,66 % para la A1AT y al 94,79 % para la A2M. El valor predictivo positivo también es muy aceptable para ambas pruebas: 95,08 % para la A1AT y 83,33 % para la A2M.

En función de la distribución porcentual de los individuos, de acuerdo con las cifras encontradas en la población normal y en la tumoral, se puede observar (fig. 1) que, en el caso de la A1AT, la distribución es característica del comportamiento de lo que podemos denominar prueba «típica», mientras que la A2M parece tener un valor inferior.

Cuando estudiamos los resultados verdaderos positivos y los falsos positivos para los distintos niveles séricos (considerando intervalos de 50 mg/dl) se puede construir para la A1AT y para la A2M la *receiving operating characteristics curve (ROC curve)* (fig. 2), la cual pone de manifiesto que la determinación de A1AT puede ser más útil que la de A2M, cuyo valor para el diagnóstico positivo es menor.

Discusión

Las dos proteínas estudiadas forman parte del grupo de proteínas de fase aguda y reúnen las condiciones para ello¹⁶; sin embargo, su comportamiento es distinto en algunos aspectos. Este hecho se interpreta a la luz de la distinta estructura y rasgos biológicos, aun cuando su común denominador sea la capacidad de inhibición de proteasas, mediante la for-

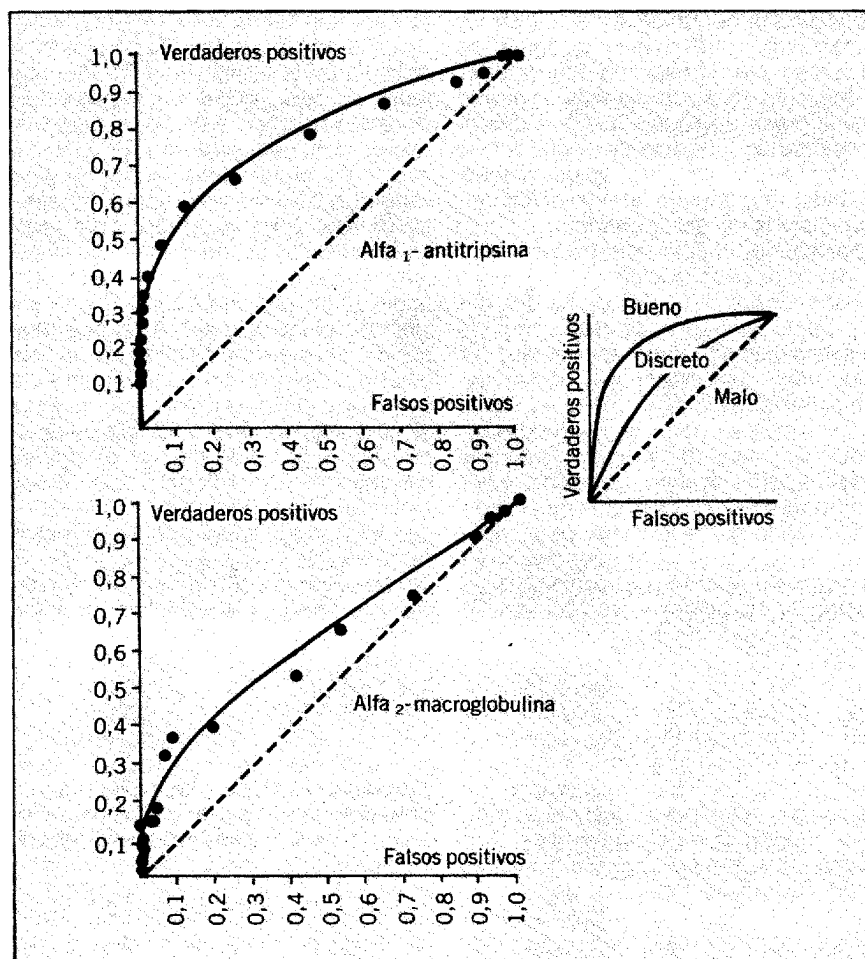


Fig. 2. Representación gráfica de los índices de verdaderos positivos y falsos positivos para distintos niveles de antiproteasas (ROC curve). A la derecha se representan los modelos de curva patrón para valorar la utilidad de una prueba diagnóstica (tomada de Weinstein y Fineberg¹⁵).

TABLA 2

Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VP +) y valor predictivo negativo (VP -) de las determinaciones de alfa₁-antitripsina (A1AT) y alfa₂-macroglobulina (A2M) en pacientes neoplásicos, para dos concentraciones distintas (elevaciones moderadas o notorias)

	S (%)	E (%)	VP + (%)	VP - (%)
Concentraciones de A1AT				
> IA_{95} (362,52 mg/dl)	80,95	63,33	77,00	68,67
> $\bar{X}_N + 2DE_N$ (562,52 mg/dl)	42,49	96,66	95,08	52,56
Concentraciones de A2M				
> IA_{95} (345,76 mg/dl)	54,36	58,33	58,33	54,36
> $\bar{X}_N + 2 DE_N$ (528,45 mg/dl)	24,27	94,79	83,33	53,84

IA_{95} límite superior del intervalo admisible para la cifra media del grupo control (nivel de fiabilidad del 99 %); \bar{X}_N cifra media del grupo control; DE_N desviación estándar del grupo control.

mación de un complejo proteasa-inhibidor. Como es conocido, los complejos proteasa-inhibidor son distintos en función de la proteasa inhibida, y mientras la A1AT es más específica para la elastasa, la A2M lo es para otras proteasas como la plasmina¹⁷. Además, la misma formación de los complejos sigue una cinética distinta en cada caso¹⁸. No se han descrito variaciones de la A1AT con respecto a la edad y el sexo de

personas normales^{19,20}; no obstante, la A2M sí puede guardar relación con el sexo y la edad de estos individuos^{8,18,21}. Esta influencia parece perderse por la existencia de un tumor maligno; así, la elevación de A1AT y A2M que se encuentra en los enfermos tumorales es independiente de la edad y el sexo, como ya se ha descrito previamente⁸. Este factor debe ser tenido en cuenta a la hora de su utilización clínica.

La elevación sérica de A1AT y A2M es claramente significativa en los enfermos tumorales y las diferencias son notables desde todos los puntos de vista, lo mismo que la mayor dispersión de cifras que se encuentra en los pacientes neoplásicos, como pone de manifiesto una desviación estándar muy superior al intervalo admisible para la del grupo control.

Estos hechos obligan a otras consideraciones para poder incluir estas pruebas como marcadores biológicos, ya que deben reunir una serie de requisitos^{22,23}. Nosotros hemos tenido oportunidad de demostrar²⁴ que existen diferencias significativas entre la A1AT sérica encontrada en personas normales, enfermos no tumorales (infecciones agudas y crónicas y hepatopatías agudas y crónicas) y enfermos tumorales, por lo que, en este aspecto, pueden considerarse como marcador biológico. Sin embargo, esta prueba no reúne el criterio de especificidad de órgano afecto por el tumor³ aunque esto no la invalida como marcador inespecífico.

Otro criterio importante debe ser su proporcionalidad al estadio clínico, que ha sido puesta de manifiesto por nosotros⁸ para la A1AT pero no así para la A2M, en cuyo caso, las cifras encontradas en pacientes con enfermedad local, locorregional y metastásica no difieren entre sí, aun cuando son siempre significativamente superiores a las del grupo control.

Nuestros resultados al analizar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, apoyan la idea de que la A1AT es más útil como prueba biológica de ayuda al diagnóstico clínico de cáncer, que la A2M. Para ambas pruebas, el porcentaje de falsos positivos es bajo cuando se consideran cifras notoriamente elevadas (superiores a la suma de la cifra media + dos desviaciones estándar del grupo control): 3,3 % de falsos positivos para la A1AT y 5,20 % para la A2M. En el caso de la A1AT, el porcentaje de falsos negativos es también bajo, aun considerando cifras sólo moderadamente elevadas (por encima del límite superior del intervalo admisible para la cifra media del grupo control), como lo demuestra una sensibilidad del 80 %, aproximadamente. Estos resultados pueden mejorar, indudablemente, si se emplean ambas pruebas conjuntamente, lo que aboga por la utilidad de estudios multiparamétricos, como ya ha sido demostrado²⁵.

En la actualidad no se puede afirmar que exista una prueba cuantitativa perfecta que permita diferenciar claramente la población normal de la tumoral considerada en su conjunto. Por el contrario, en la mayoría de estos tipos de pruebas se encuentran cifras que pueden presentarse tanto en los individuos normales como en los afectados de tumores, pero esto no las

invalida por cuanto, en definitiva, depende de la sensibilidad y especificidad que tenga la prueba para una cifra en particular, es decir, depende del porcentaje de falsos positivos y de falsos negativos que se encuentre para un nivel determinado de la prueba. Una prueba sin valor sería aquella que mostrara una superposición total entre las cifras encontradas en la población control y en la que es objeto de estudio. Si se analiza el comportamiento en este sentido (fig. 1), es posible comprobar que la A1AT se comporta como una prueba típica de ayuda al diagnóstico, mientras que la A2M muestra una mayor superposición de cifras entre las personas normales y los pacientes tumorales, a pesar de que un porcentaje considerable de enfermos cancerosos presentan cifras elevadas, lo que hace que las cifras medias difieran estadísticamente.

Cuando enfrentamos los índices de verdaderos positivos y de falsos positivos para todos los posibles valores de cada prueba por separado (*ROC curve* para A1AT y A2M) podemos encontrarnos con un criterio positivo de diagnóstico en función del punto de la curva que ocupe un caso particular. Como es notorio, para el caso de la A1AT, cuando se consideran cifras muy elevadas, el índice de falsos positivos (falsos positivos/falsos positivos + verdaderos negativos) es muy bajo, con un elevado índice de verdaderos positivos (verdaderos positivos/verdaderos positivos + falsos negativos). A medida que consideramos cifras progresivamente decrecientes, el índice de falsos positivos aumenta más rápidamente de lo que lo hace el índice de verdaderos positivos (fig. 2).

La A2M muestra un comportamiento distinto, ya que el índice de falsos positivos y de verdaderos positivos guardan una linealidad mayor, aspecto éste que la desvaloriza en gran medida para su utilización como marcador biológico (fig. 2).

Una vez considerados todos los indicadores empleados y a los que hemos hecho referencia, se puede concluir que la A1AT reúne mejores condiciones de marcador biológico de cáncer que la A2M, si bien los niveles de esta última son también superiores en los enfermos tumorales con respecto a los controles. Ello parece indicar que no sólo tiene que ser considerado el resultado aislado de una prueba, sino que su auténtica utilidad debe valorarse considerando una serie de indicadores que informen de su eficacia real. Sin un estudio pormenorizado no puede considerarse una prueba como marcador biológico, sobre todo al tener en cuenta lo escasamente probable que puede resultar que un único marcador sea el ideal para todas las aplicaciones que se le puede pedir: cribaje, diagnóstico positivo, pacientes ya diagnosticados

y en seguimiento, detección de recidivas o de progresión de la enfermedad y otras⁴.

BIBLIOGRAFIA

1. Begent RHJ. The value of carcinoembryonic antigen in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 1984; 21: 231-236.
2. Abelev GI. Alpha-fetoprotein as a marker of embryo-specific differentiations in normal and tumor tissues. *Transplant Rev* 1974; 20: 3-10.
3. Borek E. Toward a universal tumour marker. *Tumour Biol* 1984; 5: 1-14.
4. Bagshawe KD. Tumour markers-Where do we go from here? *Br J Cancer* 1983; 48: 167-175.
5. Coombes RC. Biochemical markers in human breast carcinoma. *Invest Cell Pathol* 1978; 1: 347-362.
6. Pettingale KW, Tee DEH. Serum protein changes in breast cancer: a prospective study. *J Clin Pathol* 1977; 30: 1.048-1052.
7. Macbeth RAL, Bekesis JG. Plasma glycoproteins in various disease states including carcinoma. *Cancer Res* 1964; 22: 1.170-1.176.
8. Lorenzo Peñuelas A. Utilización clínica de los inhibidores séricos de proteasas en los enfermos tumorales. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz, 1986.
9. Dabbous MK, Roberts AN, Brinkley B. Collagenase and neutral protease activities in cultures of rabbit VX-2 carcinoma. *Cancer Res* 1977; 37: 3.537-3.540.
10. Steven FS, Itzhaki S. Evidence for a latent form of collagenase extracted from rabbit tumour cells. *Biochim Biophys Acta* 1977; 496: 241-247.
11. Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2.268.
12. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 2: 235-254.
13. Domènech Massons IJM. Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores. Barcelona: Ed. Herder, 1982.
14. Ransohoff DV, Feinstein A. Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic test. *N Engl J Med* 1978; 299: 926-931.
15. Weinstein MC, Fineberg HV. *Clinical Decision Analysis*. Filadelfia: Saunders, 1980.
16. Whicher J, Westacott C, Dieppe P. Defective acute phase responses: disease mechanisms and consequences. Abstracts of the XXXIV Annual Colloquium Protides of the Biological Fluids. Bruselas, 1-3 mayo 1986; 46.
17. Jeesson JO. Structure of alpha-1-antitrypsin. Abstracts of the XXXIV Annual Colloquium Protides of the Biological Fluids. Bruselas, 1-3 mayo 1986; 95.
18. Van Leuven F. Human alpha-2-macroglobulin: structure and function. *Trend Biochem Sci* 1982; 7: 185-187.
19. Sharp HL. Current status of alpha-1-antitrypsin, a protease inhibitors in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1976; 70: 611-621.
20. Morse JO. Alpha-1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1978; 299: 1.045-1.048, 1.099-1.105.
21. Van Leuven F, Cassiman JJ, Van Der Berghe H. Uptake and degradation of alpha-2-macroglobulin-protease complexes in human cells in culture. *Exp Cell Res* 1978; 117: 273-282.
22. Herberman RB. Immunodiagnosis and its applicability for cancer screening. *Antibiot Chemother* 1978; 22: 59-66.
23. Newlands ES. Management of cancer patients. En: Simington T, Williams AE, ed. *Cancer*. Edimburgo, Churchill Livingstone 1980.
24. Millán J, Lorenzo A, Rodríguez P, Gallurt P, Romero J, Senra A. Variations of major acute phase alpha-1-protein response in normal, non-malignant and malignant states. En: Peeters H, ed. *Protides of the Biological Fluids*. Oxford, Pergamon Press 1986; 34: 427-430.
25. Lamoureux G, Mandeville R, Poisson R, Legault-Poisson S, Jolicœur R. Biologic markers and breast cancer: a multiparametric study. I. Increased serum protein levels. *Cancer* 1982; 49: 502-512.