



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Antígeno Prostático Específico Libre:
Determinación del Rango de Referencia y Punto de
Corte para el Porcentaje de Antígeno Prostático
Específico Libre.

T E S I S

Que para obtener el Diploma de:

ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA

P r e s e n t a

Q. F. B. VIRGINIA CAMPOS CABRERA

A s e s o r :

DRA. PATRICIA E. BAZ GUTIERREZ

México, D. F. 1999

DE QUÍMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio Clínico del Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México, bajo la supervisión de la Doctora Patricia E. Baz Gutiérrez, Jefe de la División de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Tratamiento; con mi más sincero agradecimiento a ella por haberme brindado su apoyo en la realización de este trabajo.

También de forma muy especial agradezco el apoyo, amistad y confianza al Dr. Miguel Angel Jiménez Ríos y al Dr. Pedro Martínez del Servicio de Urología del Instituto; así como a Blanquita, Saúl y David del Laboratorio Clínico del área de Marcadores Tumorales por su paciencia, amistad y por haber compartido conmigo sus conocimientos. A todos los que laboran en el Laboratorio Clínico del Instituto gracias por su amistad.

Al Dr. José Pedraza Chaverri, Dra. Rebecca Franco Bourland, Dra. Victoria Valles Sánchez, Q.F.B. Eva Hilda González López y Q.F.B. Esp. B.Q. Romelia Velasco Ortiz, por sus consejos y colaboración en este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios; porque sabiendo que estabas conmigo, nunca me dejaste caer y así poder seguir adelante.

A mis papás José Luis y Virginia, por haberme brindado la oportunidad y el apoyo para seguir superándome. Los quiero mucho. ¡Gracias!

A mis hermanos Goyo, Anilú, Nadia[†] y Chavo por sus palabras de ánimo.

A mis tíos René y Aurora, a mis primas Yáneca y Yanemín, por darme apoyo en mi estancia en la Ciudad de México. Ustedes fueron parte esencial en mi preparación.

A mis Abuelitas, Tíos y Primos.

A Mercedes Palao por su gran apoyo y por ser mi guía en la realización de mis estudios de posgrado. Muchas gracias.

A todos mis compañeros y amigos.

Fe de Erratas:

El término Rango, es una palabra empleada en nuestro idioma para describir alguna jerarquía o posición social.

Para este trabajo, el término correcto es Intervalo que define a los valores límite superior e inferior en un procedimiento de medición.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	i
INDICE DE TABLAS.....	ii
INDICE DE GRAFICAS.....	iii
CAPITULO I. RESUMEN.....	2
CAPITULO II. INTRODUCCION.....	4
CAPITULO III. ANTECEDENTES.....	7
III.1. Anatomía de la próstata.....	7
III.2. Histología de la próstata.....	8
III.3. Función de la próstata.....	8
III.4. Hiperplasia prostática.....	9
III.5. Cáncer de próstata.....	10
III.6. Elementos para el diagnóstico diferencial.....	10
III.7. Estudios epidemiológicos del cáncer de próstata en México.....	12
III.8. El descubrimiento del Antígeno Prostático Específico.....	13
III.9. Características biomoleculares del Antígeno Prostático Específico...13	
III.10. Función biológica del Antígeno Prostático Específico.....	15
CAPITULO IV. ANTIGENO PROSTATICO ESPECIFICO LIBRE.....	17
IV.1. Generalidades	17
IV.1.1. APE y cáncer de próstata vs. hiperplasia prostática.....	17
IV.1.2. Formas moleculares de APE.....	17
IV.1.3. La utilidad clínica de la medición de las diferentes.....	20
formas moleculares del APE sérico.	
IV.2. Técnicas para la medición del APE.....	20
IV.2.1. Inmunodetección de las diferentes formas de APE.....	21
en suero.	
IV.2.2. Inmunoensayos.....	22
Ensayo Radioinmunológico.....	22
Ensayo Radioinmunométrico.....	23
Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas.....	24
Ensayo Inmunofluorescente con sustrato marcado.....	26
IV.3. Investigaciones tempranas del APE libre.....	26
IV.4. Uso del porcentaje de APE libre.....	28
IV.5. Determinación del porcentaje de APE libre.....	28
IV.5.1. Uso del porcentaje de APE libre con APE normal.....	29
IV.5.2. Uso del porcentaje de APE libre con valores de APE.....	29
entre 4.1 y 10.0 ng/ml..	

CAPITULO V. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	32
V.1. Hipótesis.....	32
V.2. Objetivos.....	32
V.2.1. Objetivo general.....	32
V.2.2. Objetivos específicos.....	32
CAPITULO VI. MATERIAL Y METODOS	34
VI.1. Material.....	34
VI.2. Método.....	35
VI.2.1. Principios de la reacción MEIA.....	35
VI.2.2. Reactivos de MEIA.....	37
VI.2.3. Reacción MEIA para el ensayo de APE libre.....	37
VI.2.4. Principios de la calibración del ensayo de APE libre.....	40
VI.2.5. Controles.....	41
VI.2.6. Control de calidad.....	41
VI.2.7. Parámetros estadísticos empleados.....	42
CAPITULO VII. RESULTADOS Y DISCUSION	46
VII.1. Calibración.....	46
VII.2. Controles.....	48
VII.3. Control de calidad.....	48
VII.4. Determinación del intervalo de referencia de APE libre.....	51
VII.5. Punto de corte para el porcentaje de APE libre.....	54
CAPITULO VIII. CONCLUSIONES	58
CAPITULO IX. BIBLIOGRAFIA	60

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 Anatomía de la próstata.....	7
Figura No. 2 Zonas de la próstata.....	8
Figura No. 3 Algoritmo diagnóstico.....	11
Figura No. 4 Estructura primaria del APE.....	14
Figura No. 5 Representación esquemática de las formas..... moleculares del APE.	19
Figura No. 6 Mapa de los epítomos de la molécula de APE.....	21
Figura No. 7 Representación esquemática en la inmunodetección..... de las formas del APE.	21
Figura No. 8 Ensayo Radioinmunológico (RIA).....	23
Figura No. 9 Ensayo Radioinmunométrico (IRMA).....	24
Figura No. 10 Prueba ELISA.....	25
Figura No. 11 Barreras prostáticas.....	27
Figura No. 12 Matriz de fibra de vidrio.....	36
Figura No. 13 El complejo antígeno-anticuerpo se une a las..... fibras de vidrio de la matriz.	37
Figura No. 14 Secuencia esquemática de una reacción MEIA.....	39

INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Formas moleculares del APE.....	18
Tabla No. 2 Diversos estudios para mejorar la detección..... temprana del cáncer de próstata.	30
Tabla No. 3 Pacientes que acudieron al servicio de urología.....	35
Tabla No. 4 Resultados de la calibración estándar.....	46
Tabla No. 5 Resultados de la calibración principal.....	46
Tabla No. 6 Concentraciones establecidas para los controles de APE libre....	48
Tabla No. 7 Control de calidad de APE libre.....	49
Tabla No. 8 Estadística del control de calidad de APE libre.....	49
Tabla No. 9 Estadística para la población de referencia.....	52
Tabla No. 10 Estadística descriptiva para los grupos estudiados.....	52
Tabla No. 11 Estadística descriptiva para la población urológica..... tomando en cuenta todos los valores de APE total.	53
Tabla No. 12 Estadística descriptiva para aquellos pacientes que..... presentaron valores de APE total entre 4.0 a 10.0 ng/ml.	53
Tabla No. 13 Puntos de corte propuestos.....	55

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica No. 1	Lecturas obtenidas para la calibración estándar.....	47
Gráfica No. 2	Lecturas obtenidas para la calibración principal.....	47
Gráfica No. 3	Control de calidad concentración baja.....	50
Gráfica No. 4	Control de calidad concentración media.....	50
Gráfica No. 5	Control de calidad concentración alta.....	51
Gráfica No. 6	Valores de APE libre para la población estudiada.....	54
Gráfica No. 7	Valores del porcentaje de APE libre con todos los valores de APE total.....	55
Gráfica No. 8	Valores del porcentaje de APE libre con valores de APE total entre 4.0 a 10.0 ng/ml.....	56

CAPITULO I

I. RESUMEN

ANTECEDENTES: El cáncer de próstata ha aumentado su frecuencia entre la población masculina con edades desde los 50 años en adelante y México no es la excepción. Es por eso que se han desarrollado nuevas herramientas para mejorar la detección de este padecimiento.

Una de estas herramientas es el ensayo del antígeno prostático específico libre y su porcentaje en suero. Se tenía el conocimiento de que este antígeno se producía en la próstata y su concentración se elevaba en el suero de pacientes con cáncer prostático, así que la medición del APE se empleó como marcador para cáncer de próstata. Pronto existió gran confusión sobre la utilidad del APE ya que su concentración en suero se elevaba también en padecimientos benignos como la hiperplasia prostática y la prostatitis. En estudios recientes se describió que el APE está presente en el suero en varias formas moleculares, esto es, la molécula del APE está unida a varias proteínas y está también en forma libre. Se estudiaron estas formas moleculares del APE y se determinó que el porcentaje de APE libre es más bajo en pacientes con cáncer de próstata que en pacientes con hiperplasia prostática.

OBJETIVO: Determinar el intervalo de referencia para el ensayo de APE libre sérico y proponer un punto de corte para el porcentaje de APE libre, siendo una prueba de apoyo diagnóstica para detectar tempranamente el cáncer de próstata.

MATERIAL Y METODO: La población de estudio fueron 50 donadores de sangre sin antecedentes de patologías prostáticas. Se incluyó un grupo de 33 pacientes que acudieron al servicio de urología del Instituto Nacional de Cancerología, los cuales tienen un diagnóstico final de cáncer de próstata, hiperplasia o prostatitis. El intervalo de referencia se obtuvo por estadística descriptiva y el porcentaje de APE libre se determinó analizando varios puntos de corte, la sensibilidad y especificidad resultante para comparar cuántos casos de cáncer se detectarían del grupo de los 33 pacientes de urología. Se utilizó la tecnología de Inmunoensayo Enzimático de Micropartículas (MEIA), realizando un control de calidad interno para la validación del ensayo.

RESULTADOS: El intervalo de referencia calculado fue de 0.0 a 0.411 ng/ml. El punto de corte propuesto para el porcentaje de APE libre es del 21%. Logrando con este punto de corte detectar el 86% de los casos de cáncer de próstata de los pacientes del servicio de urología.

CONCLUSIONES: El porcentaje de APE libre provee la información que puede ayudar a la diferenciación entre padecimientos prostáticos benignos del cáncer de próstata, y de esta manera, junto con otros exámenes como el examen dígito rectal y el ultrasonido transrectal, se detectará tempranamente el cáncer prostático que puede ser potencialmente curable y que cada vez va acupando un lugar muy importante en nuestro país.

CAPITULO II

II. INTRODUCCION

Los marcadores tumorales han tenido un papel muy importante en la evaluación y el manejo del cáncer de próstata desde la descripción de la fosfatasa ácida por Gutman y Gutman en 1938 (1).

La fosfatasa ácida había sido considerada como prueba estándar y utilizada extensamente por urólogos e internistas para el diagnóstico y estadificación del cáncer de próstata, así como para monitorizar la respuesta a la terapia. La dificultad que ha persistido con este marcador ha sido la habilidad para medir la concentración sérica real de las diferentes isoenzimas producidas por el tejido prostático sin la interferencia de las enzimas generadas por otros órganos del cuerpo (2).

Un gran hueco quedó entre la necesidad de un marcador tumoral más útil para el cáncer de próstata y su obtención, hasta el aislamiento del antígeno prostático específico (APE) del plasma seminal, tejido prostático y finalmente del suero (1).

Fue en los inicios de los 1960's cuando varios investigadores reportaron la existencia de un antígeno de la glándula prostática. Más tarde, estudios específicos de tejido confirmaron la presencia de este antígeno en la glándula normal, hiperplásica y maligna (3).

Aunque la utilidad principal del APE inicialmente fue para monitorizar a pacientes que se sabía tenían cáncer de próstata, trabajos subsecuentes llevaron al mejor entendimiento del papel de este marcador para la detección del cáncer de próstata (1).

Hoy, el APE es ampliamente utilizado como marcador tumoral para el cáncer de próstata (CaP) (4). Pero como el APE es órgano específico y no específico de cáncer, existe un considerable entrecruzamiento en los valores del APE de pacientes con cáncer de próstata y pacientes con condiciones benignas, tales como la hiperplasia prostática y la prostatitis. Además, del 38 al 48% de pacientes con cáncer de próstata tiene valores normales de APE (5), y entre el 30 y 50% de los pacientes con hiperplasia prostática tienen elevada la concentración sérica del APE (4).

Estudios recientes han demostrado que el APE está presente en el suero en varias formas moleculares. Estas incluyen, una forma libre o no unida y otras que forman complejos con la alfa₁-antiquimotripsina y con la alfa₂-macroglobulina; además de escasas cantidades con la alfa₁-antitripsina, el inhibidor inter-alfa tripsina y otros.

De estas formas, la más importante clínicamente es el complejo formado entre el APE y la alfa₁-antiquimotripsina, quien es la forma predominante en suero, y la forma libre, que está presente en una pequeña concentración en suero (5).

Diversas investigaciones han ilustrado los beneficios potenciales de usar estas formas moleculares del APE para aumentar la utilidad clínica de la prueba del APE para detectar tempranamente el cáncer de próstata (6). Estos estudios también sugieren que la habilidad para medir las formas específicas del APE, ya sean las formas unidas o la libre, en suero pueden mejorar la capacidad del APE para distinguir entre los pacientes con cáncer de próstata de aquellos con padecimientos benignos (6).

Las metas para mejorar la prueba de APE son dos: aumentar la sensibilidad (incrementar la detección de cáncer) y mejorar la especificidad (eliminar costos y las biopsias de próstata que muestran resultados negativos) (6).

CAPITULO III

III. ANTECEDENTES

III.1. ANATOMIA DE LA PROSTATA

La próstata es una glándula en forma de cono truncado, en donde su base descansa en la cara inferior de la vejiga y su vértice en el diafragma pélvico. La uretra penetra en la parte central y base de la próstata recorriéndola por 2.5 cm hasta la porción anterior de su vértice (Fig.1).

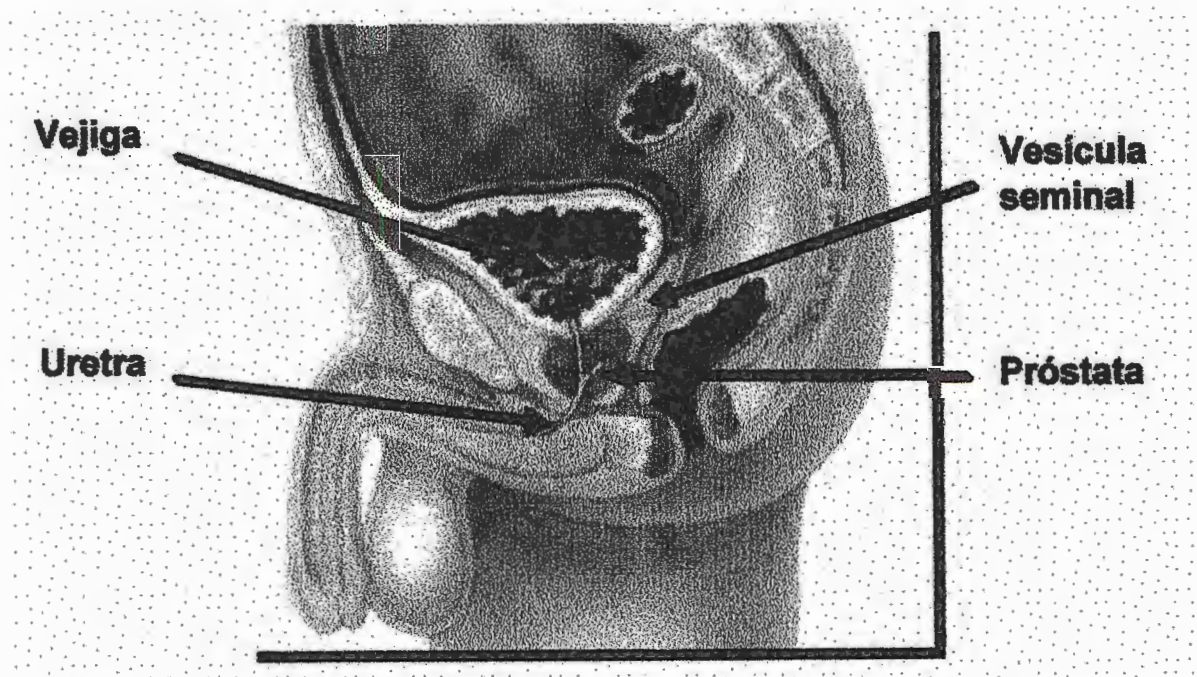


Fig.1 Anatomía de la próstata

La próstata se divide en tres zonas: la zona transicional en donde se origina la hiperplasia, zona periférica origen del adenocarcinoma y una zona central (Fig. 2). Su peso en la infancia es alrededor de 4 gramos y de la pubertad hasta los 20 años llega a su madurez tanto en volumen como en funcionamiento (7).

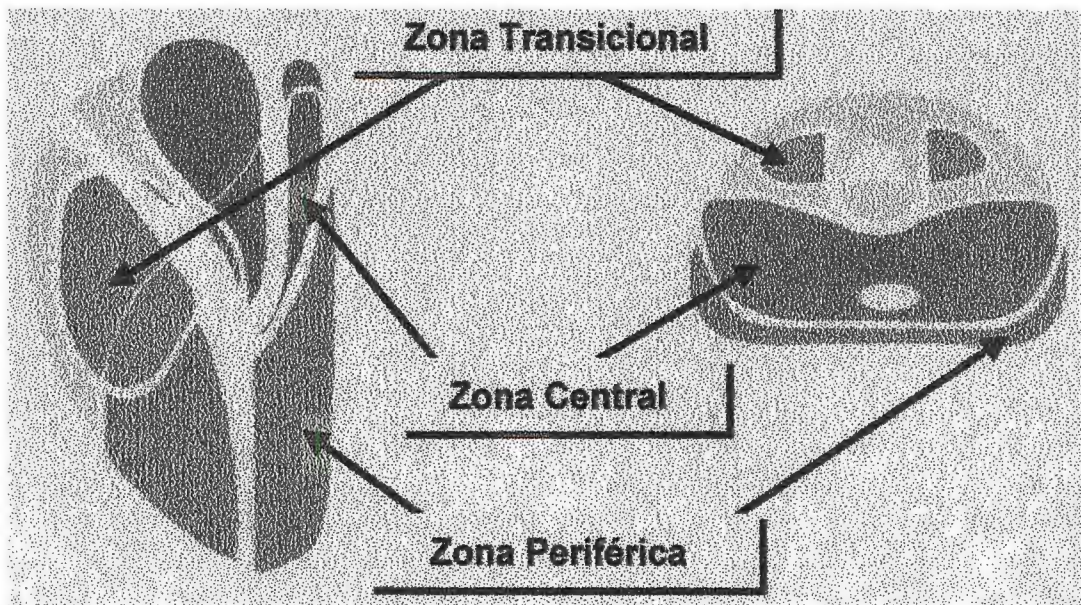


Fig. 2 Zonas de la próstata.

III.2. HISTOLOGIA DE LA PROSTATA

Histológicamente, la próstata es una glándula tubuloalveolar compuesta que, al corte, presenta espacios glandulares de tamaño variable revestidos de epitelio cilíndrico que varía en altura. Es característico que el epitelio consista en una capa de células, pero a veces se observan pequeñas células cuboides basales a lo largo de la membrana basal que producen el aspecto de estratificación. En muchas áreas se aprecian pequeñas prolongaciones vellosas o invaginaciones papilares del epitelio. Todas las glándulas poseen membrana basal definida y están separadas por mucho estroma fibromuscular (8).

III.3. FUNCION DE LA PROSTATA

La glándula prostática secreta un fluido delgado y lechoso que contiene ácido cítrico, calcio, fosfatasa ácida, espermina, potasio y zinc. Durante la emisión, la cápsula de la glándula prostática se contrae simultáneamente con las contracciones de los vasos deferentes para que este fluido de la glándula prostática se adicione al semen para complementarlo.

La ligera característica alcalina del fluido prostático puede ser importante para la fertilización exitosa del óvulo ya que el fluido de los vasos deferentes es relativamente ácido debido a la presencia del ácido cítrico y los productos metabólicos finales del espermatozoide y que consecuentemente, ayuda a inhibir la fertilización. Además, las secreciones vaginales de la mujer son ácidas (pH de 3.5 a 4.0).

Entonces el espermatozoide no sería óptimamente móvil hasta que el pH de los fluidos se eleve hasta 6.0 a 6.5. De esta manera, es probable que el fluido prostático ayude a neutralizar la acidez de estos fluidos después de la eyaculación y así aumentar la movilidad y fertilidad de los espermatozoides (9).

III.4. HIPERPLASIA PROSTATICA

El desarrollo de la hiperplasia prostática es en su mayoría un fenómeno universal en hombres adultos (10). Este padecimiento afecta a hombres que rebasan los 45 años de edad e incrementa su frecuencia con la edad, así que para la octava década más del 90% de hombres tendrán hiperplasia prostática.

A pesar de la frecuencia en hombres mayores de 80 años, sólo el 5 al 10% necesitan tratamiento quirúrgico para aliviar la obstrucción uretral (8), ya que como se mencionó, la próstata rodea a la uretra y su crecimiento es una causa potencial de obstrucción urinaria (10).

La edad media de la aparición de los síntomas es a los 65 años. Estos síntomas se encuentran directamente relacionados con la hiperplasia del lóbulo medio o de los lóbulos laterales, ya que éstos van a producir una compresión mayor de la uretra prostática y en consecuencia un aumento de la resistencia al paso de la orina de la vejiga a la uretra distal. La vejiga, para compensar el aumento de la presión, sufre una hipertrofia del músculo y los síntomas que se presentan son retardo en la iniciación de la micción, disminución del chorro miccional y nicturia (7).

A medida que aumenta la obstrucción aparecen otros síntomas como la polaquiuria, goteo terminal y en ocasiones puede llegar a una retención urinaria aguda (7), también se presenta disuria (micción dolorosa). Además de estas dificultades para orinar, el aumento de volumen de la próstata impide vaciar completamente la vejiga, de manera que al terminar la micción, queda un volumen importante de orina residual. Esta orina es un líquido estático susceptible de infección llegando a producir u originar cistitis e infección del riñón (8).

Es probable que la hiperplasia prostática no sea un factor predisponente al desarrollo de cáncer de próstata (10).

III.5. CANCER DE PROSTATA

El cáncer de próstata es la tercera causa de muerte en el hombre de edad adulta (7). Se advierte en la necropsia en el 14 al 46% de los hombres que pasan de los 50 años. Sin embargo, la mayor parte de los casos se descubre casualmente al efectuar la necropsia o al examinar una pieza quirúrgica extirpada por otros motivos. En casi todos estos casos la lesión es pequeña y sin importancia clínica. Por otra parte, puede descubrirse como una neoplasia clínicamente agresiva o invasora que cause la muerte (8).

El cáncer de próstata rara vez se observa en sujetos jóvenes. La edad media de la enfermedad clínicamente patente es de 70 años. Existe una gran discrepancia entre la frecuencia de cáncer de próstata como causa de enfermedad clínica, o muerte, y la frecuencia como lesión anatómica. Sin embargo, la forma clínicamente importante del cáncer es lo bastante frecuente para explicar que ocupe el tercer lugar entre las causas de muerte por cáncer en los varones, excedida únicamente por los carcinomas broncogénos y colorrectales (8).

Tanto el cáncer de próstata en etapa temprana como en etapa avanzada, pueden ser asintomáticos al tiempo del diagnóstico. En sujetos sintomáticos, los síntomas más comunes son disuria, dificultad para evacuar, incremento de la frecuencia urinaria y una retención urinaria completa, además de dolor en la espalda o en la cadera y hematuria. Complicaciones adicionales de la enfermedad avanzada incluyen compresión del cordón espinal por metástasis, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar (10).

III.6. ELEMENTOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial entre hiperplasia prostática y cáncer de próstata se debe hacer con examen dígito rectal (DRE) y antígeno prostático específico (APE). Este marcador tumoral (APE) se debe hacer en sujetos mayores de 45 años. Si el APE y el DRE son normales, se recomienda hacer una revisión anual con examen rectal.

Si el APE se encuentra por arriba de 4.0 ng/ml y el DRE es normal hacer biopsias guiadas por ultrasonido de las zonas sospechosas o al azar. Si el APE es normal, pero el DRE anormal, se toman biopsias de las zonas sospechosas encontradas en el tacto.

El ultrasonido transrectal (TRUS) de la próstata se debe hacer en sujetos con sospecha de cáncer ya sea por elevación del APE o porque el DRE tiene zonas induradas (7) (Fig.3).

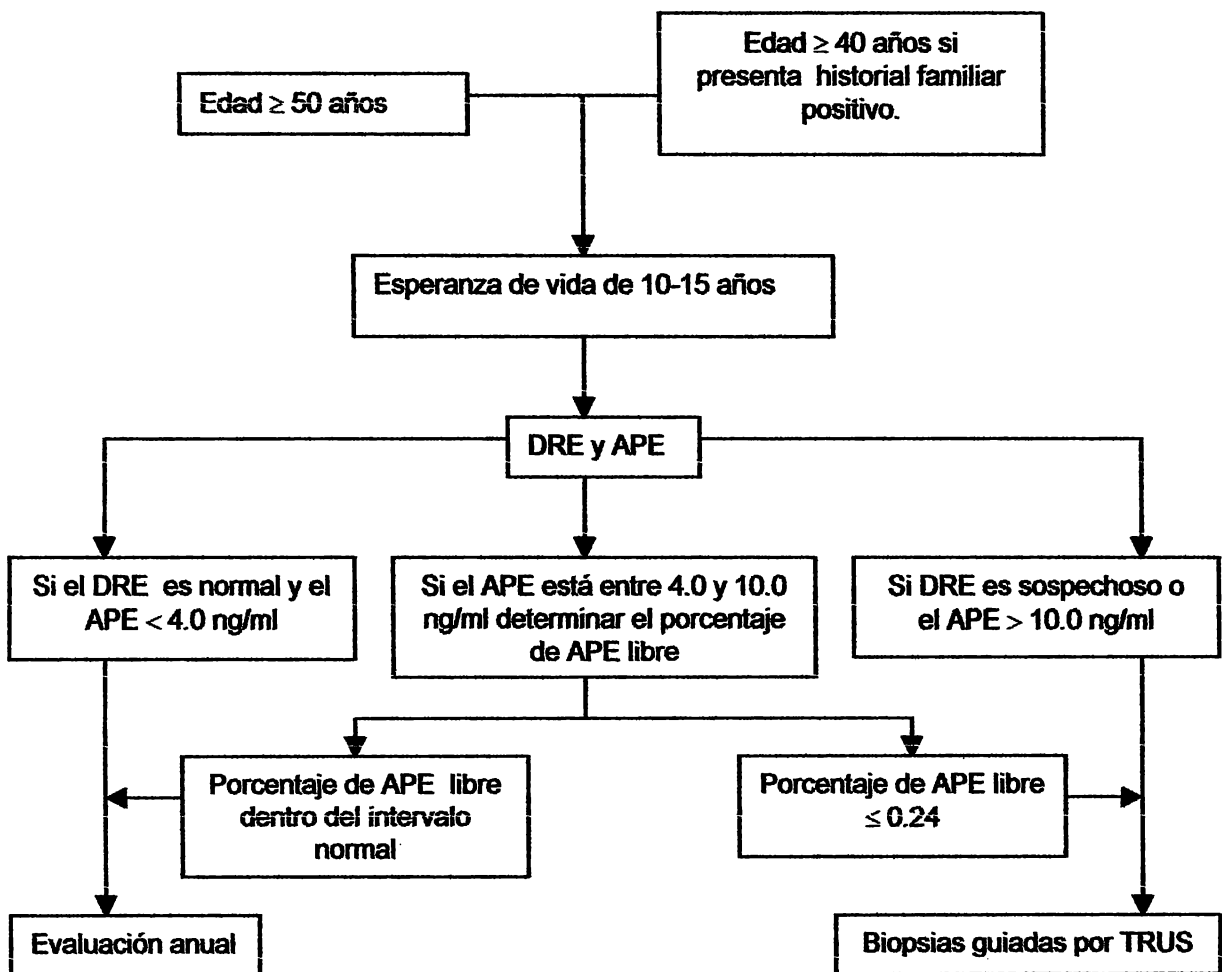


Fig. 3 Algoritmo diagnóstico para la detección del cáncer de próstata (6).

III.7. ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS DEL CANCER DE PROSTATA EN MEXICO

Según la Subsecretaría de Planeación de la Dirección General de Estadística e Informática, para la distribución porcentual de tumores malignos para el año de 1996, los tumores traqueo-pulmonares ocupan un 12.0%, los tumores de estómago un 9.9%, tumores del cuello del útero 9.1%, tumores de próstata 6.5%, tumores de mama en la mujer 6.2%, leucemias 5.8% y el resto del porcentaje se distribuye en otros tumores teniendo el 50.5%.

Así vemos que el cáncer de próstata ocupa el cuarto lugar respecto la localización de estos tumores, y entre la población masculina ocupa el tercer lugar.

También en el año de 1996, la distribución del cáncer de próstata como causa de muerte por entidad federativa se encuentra en primer lugar el Distrito Federal con 386 defunciones, en segundo lugar está Jalisco con 324 defunciones y en tercer lugar lo ocupa el Estado de México con 237 defunciones. El estado con menor número de muertes fue Baja California Sur con sólo 10 defunciones. En total, en todo el país se reportaron 3,247 defunciones.

Por grupos de edad, se distribuye este padecimiento: menor de un año 0 casos; de 1 a 4 años, 0 casos; de 5 a 14 años, 1 caso; de 15 a 64 años, 409 casos, y de 65 años en adelante con 2,826 casos. Por lo que se observa que la incidencia del cáncer de próstata se encuentra en los grupos de edad avanzada (11).

En el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México, en 1996 se diagnosticaron 90 casos, excedido por tumor de testículo con 112 casos, y en 1997, 102 casos se diagnosticaron también excedido por tumor de testículo con 117 casos. Estas cifras no revelan la incidencia real en el país ya que muchos pacientes no son derivados a este Instituto (12).

III.8. EL DESCUBRIMIENTO DEL ANTIGENO PROSTATICO ESPECIFICO

En 1979, Wang y col. (13) aislaron un antígeno del tejido prostático, lo purificaron y demostraron su especificidad con este tejido. Además de que fue identificado en todo tipo de tejido prostático (normal, hiperplásico y maligno), no se encontró en otro tejido humano. Con filtración en gel y electroforésis, se demostró que tiene un peso molecular de 33,000 a 34,000 daltons y tiene un sólo punto isoeléctrico que es de 6.9, además de que existe como monómero. Por su asociación única al tejido prostático se denominó ANTIGENO PROSTATICO ESPECIFICO (APE). Finalmente, Papsidero y col. (14) fueron capaces de identificar al APE en suero humano y verificar que esta molécula era idéntica a la purificada directamente del tejido prostático.

III.9. CARACTERISTICAS BIOMOLECULARES DEL APE

Bioquímicamente, el APE es una cadena sencilla glicoproteica que contiene 93% de aminoácidos y 7% de carbohidratos (2). Aunque algunos reportes publicados sugieren un péptido con una secuencia de 240 aminoácidos, análisis recientes reportan una longitud de 237 aminoácidos con varios enlaces sulfuro en su estructura (15). Hay evidencias que sugieren que una cadena lateral de carbohidratos unida al grupo N (amino) está en el aminoácido 45 (asparagina) y que otras cadenas de carbohidratos unidas al O (oxidrilo) están sobre los aminoácidos 69 (serina), 70 (treonina) y 71 (serina). El aminoácido N-terminal (amino-terminal) es isoleucina y el residuo C-terminal (carboxi-terminal) es prolina (2).

La cadena sencilla del APE manifiesta una actividad enzimática proteolítica. El sitio activo contiene una triada catalítica característica de aminoácidos que son esenciales para la reacción enzimática que lleva a cabo. Esta triada catalítica corresponde a la His₄₁, Asp₉₆ y Ser₁₈₉ (16) (Fig. 4).

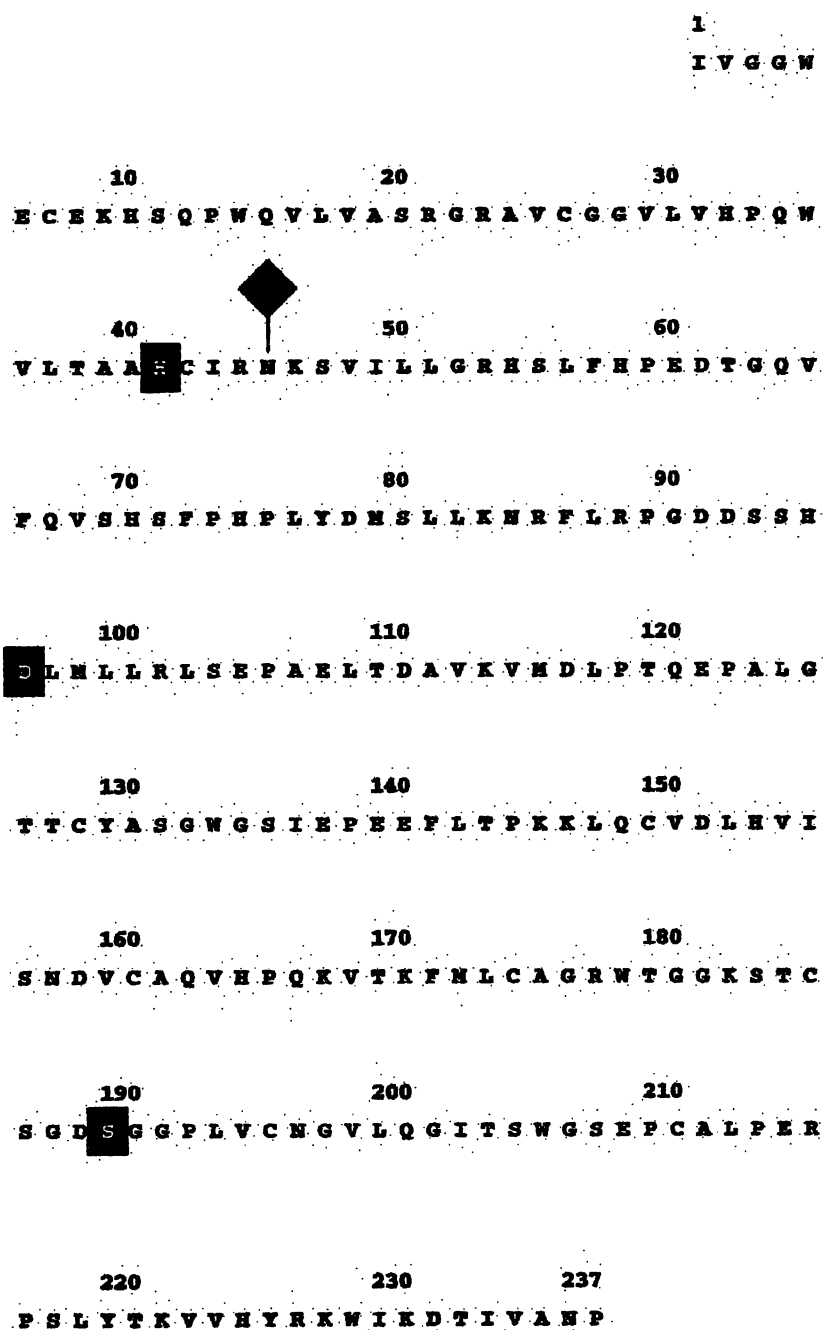
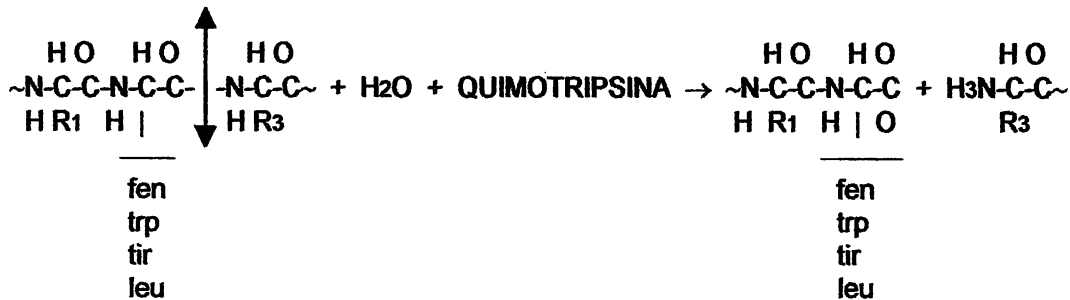


Fig. 4 Estructura primaria del APE representada por el código de una letra según la IUPAC para los aminoácidos. La unión de una cadena de carbohidratos en la Asn45 se marca con un rombo. La triada catalítica de His41, Asp96 y Ser189 se marca con los cuadros negros (16).

La actividad proteolítica del APE es similar a la de la quimotripsina, esto es, el APE rompe aquellos enlaces cuyo grupo -CO (carbonilo) es donado por aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano y tirosina), y en menor medida por leucina (16).



El gen completo que codifica al APE ha sido identificado y localizado en el cromosoma 19. Se encontró que el gen tiene aproximadamente 6 kilobases de tamaño y está compuesto por 4 intrones y 5 exones; dos sitios de iniciación de la transcripción también se han identificado (2).

III.10. FUNCION BIOLOGICA DEL APE

El APE secretado desde el lumen de la próstata, entra al fluido seminal y pasa a través de la próstata. En el fluido seminal hay proteínas que forman un gel. primordialmente la semenogelina I, semenogelina II y fibronectina, las cuales son producidas en las vesículas seminales. Estas proteínas son el componente principal del coágulo seminal que se forma en la eyaculación y funciona para atrapar a los espermatozoides (3). Se ha demostrado que el APE es el responsable de la disolución de este gel. La proteólisis del gel por el APE genera varios fragmentos de semenogelina I y semenogelina II solubles incluyendo fragmentos de fibronectina solubles. Con la licuefacción del coágulo seminal se produce la liberación progresiva de los espermatozoides (17).

El APE llega al suero desde el lumen de los ductos prostáticos pasando por vía exocitosis al fluido seminal y finalmente por difusión desde las células luminales a través de la membrana epitelial y del estroma prostático, donde puede pasar a través de la membrana basal capilar y células epiteliales o hacia el sistema linfático (3).

CAPITULO IV

IV. ANTIGENO PROSTATICO ESPECIFICO LIBRE

IV.1. GENERALIDADES

IV.1.1. APE Y CANCER DE PROSTATA VS. HIPERPLASIA PROSTATICA

El APE es órgano específico y como resultado, es producido por el tejido prostático normal, hiperplásico y canceroso. El APE puede ser detectado en el suero en hombres jóvenes con próstatas pequeñas no hiperplásicas, en hombres adultos con hiperplasia prostática y hombres con cáncer de próstata localizado o con metástasis.

Como se mencionó anteriormente, el APE no es específico de cáncer de próstata, sino que es específico del tejido prostático y por eso muchas condiciones benignas de la próstata pueden influenciar en la concentración sérica del APE. Además, numerosos estudios sugieren que no todos los cánceres prostáticos producen una elevación detectable del nivel de APE sérico (2).

Cuando se contempla el uso del APE para la detección temprana del cáncer de próstata o como herramienta de monitoreo, varios criterios deben ser impuestos: 1) la prueba usada debe ser segura y no cara para que tenga una amplia aceptación, 2) el padecimiento que se está evaluando debe ser común a la población que se está investigando y 3) el tratamiento efectivo debe ser disponible para la etapa temprana del padecimiento para que exista un decremento en la morbilidad y mortalidad por el proceso de la enfermedad (2).

IV.1.2. FORMAS MOLECULARES DEL APE

El descubrimiento de que el APE existe en el suero en varias formas moleculares representa un avance nuevo y excitante para mejorar la utilidad clínica de la prueba del APE (6). La existencia de estas formas moleculares se reportó en 1991 (18).

Estas formas moleculares incluyen una forma no unida o libre, y otras formas unidas del APE con inhibidores de las serín-proteasas como la alfa₁-antiquimotripsina (ACT) y la alfa₂-macroglobulina (AMG), ésta última indetectable con inmunoensayos. El APE total es una combinación de todas las formas inmunodetectables en suero, principalmente el APE libre y el APE-ACT (6).

Otros inhibidores de las proteasas que interactúan con el APE que han sido estudiados incluyen: alfa₁-antitripsina, antitrombina III y el inactivador C₁; los cuales forman complejos no estables (19). Tabla 1.

TABLA 1. Formas moleculares del APE (6).

NOMBRE FORMAL	NOMBRE COMUN	DESCRIPCION
APE Total	APE-T	Todas las formas inmunodetectables en suero, principalmente APE-L y APE-ACT.
APE Libre	APE-L	Forma no unida del APE.
Complejos de APE	APE-ACT	APE covalentemente unido al inhibidor alfa ₁ -antiquimotripsina, sinónimo de APE unido; es la forma inmunodetectable en suero.
	APE-AMG	APE covalentemente unido y encapsulado por la alfa ₂ -macroglobulina, no detectable por inmunoensayos; sinónimo de APE oculto.
	APE-AT	APE covalentemente unido a la alfa ₁ -antitripsina, es un componente traza del suero.
	APE-IT	APE covalentemente unido al inhibidor inter-alfa-tripsina, es un componente traza del suero.

Abrahamsson y col (18) mostraron que el APE unido a la ACT constituía la forma inmunorreactiva predominante del APE sérico, contando aproximadamente el 85% del APE-ACT, con la forma libre o no unida como el resto (Fig. 5).

APE EN SUERO

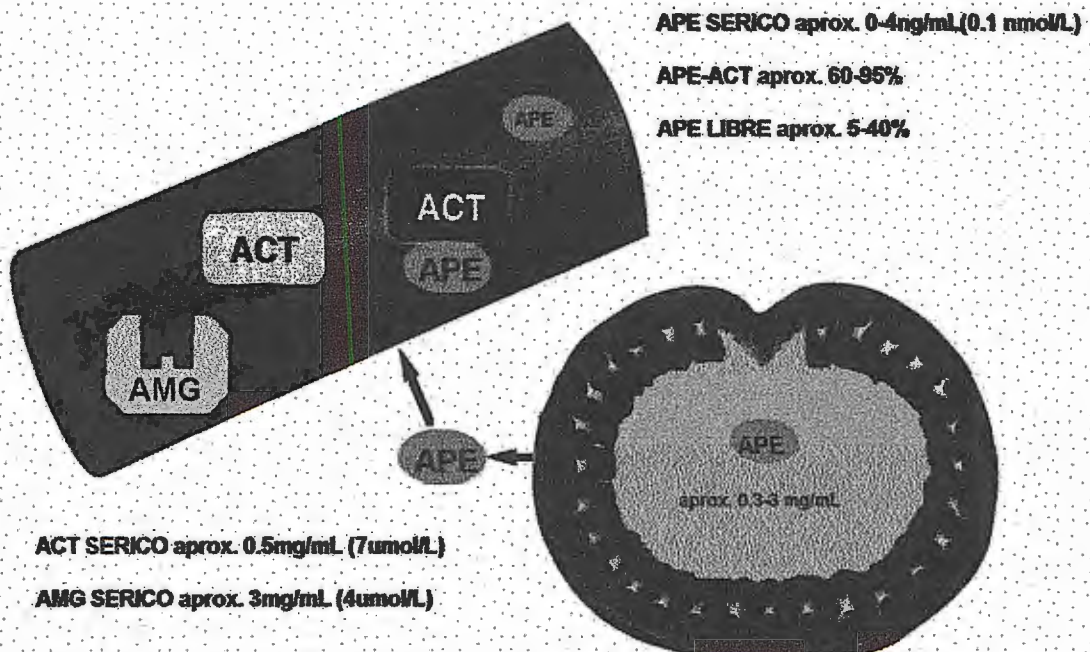


Fig.5 Representación esquemática de las diferentes formas moleculares del APE que existen en el fluido seminal y en el suero. La concentración aproximada de la ACT y la AMG se expresa en unidades de masa y unidades molares (16).

IV.1.3. LA UTILIDAD CLINICA DE LA MEDICION DE LAS DIFERENTES FORMAS MOLECULARES DEL APE SERICO

En 1991, Stenman y col. (20) mostraron que la proporción del APE unido con la ACT es más alta en pacientes con cáncer de próstata que en pacientes con hiperplasia prostática. Ellos propusieron que la proporción de APE-ACT a APE total podría distinguir mejor entre padecimientos prostáticos y reducir el índice de falsos positivos a la mitad.

Subsecuentemente, Lilja y col. (17) determinaron la concentración sérica de estas formas del APE en pacientes con hiperplasia prostática y con cáncer de próstata. La proporción de APE libre a APE total fue significativamente más baja en los paciente con cáncer que en aquellos con hiperplasia prostática.

Las mediciones de la proporción libre a total en suero, en lugar de la sola medición del APE total, reportan el incremento de la habilidad del ensayo del APE para la diferenciación del cáncer de próstata de la hiperplasia prostática de un 53 a un 73% sin comprometer la sensibilidad. Estos datos indican que el conocimiento de las concentraciones y proporciones de las diferentes formas moleculares del APE pueden dar una diferenciación más veraz entre la hiperplasia prostática y el cáncer de próstata potencialmente curable (18).

IV.2. TECNICAS PARA LA MEDICION DEL APE

Dependiendo del inmunoensayo que se use para medir el APE en suero, varias cantidades de APE libre y APE unido son reconocidos, y contribuyen a la medición total del APE (21).

La forma unida a la AMG no puede ser detectada por los anticuerpos preparados contra el APE ya que ésta encapsula al APE y así no pueden ser reconocidos los epítomos de la molécula de APE. Así pues, de las tres formas más grandes del APE, sólo el APE libre y el APE-ACT son inmunodetectables por los ensayos comerciales actuales (22).

IV.2.1. INMUNODETECCION DE LAS DIFERENTES FORMAS DEL APE EN SUERO

Las diferentes características de unión de los epítomos antigénicos distribuidos sobre la molécula de APE proveen el requisito para el diseño de una gran cantidad de inmunoensayos para la medición de las diferentes formas del APE (18) (Fig.6 y Fig.7).

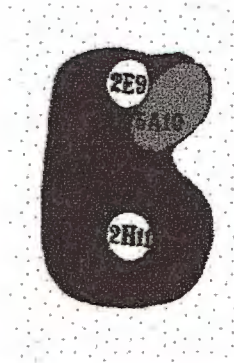


Fig.6 Mapa de los epítomos de la molécula de APE basados en un estudio inmunológico. Los epítomos 2E9 y 2H11 reconocen al APE libre y al APE unido a la ACT. El epítomo 5A10 reconoce solamente la forma libre y no conoce a la forma unida del APE con la ACT (18).

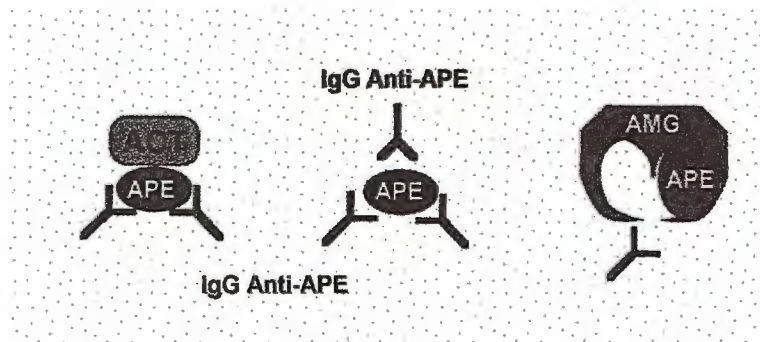


Fig.7 Representación esquemática de las diferencias en la inmunodetección de las formas del APE. La IgG anti-APE monoclonal que se ilustra en la parte de arriba de la figura reconoce selectivamente la estructura del epítomo de la forma libre y es completamente inaccesible para el APE-ACT o APE-AMG. Dos IgG's monoclonales anti-APE ilustradas abajo en la figura se une independientemente a las estructuras de los diferentes epítomos que se encuentran accesibles tanto a la forma libre como a la unida. Sin embargo, estas IgG's anti-APE no tienen acceso a ninguno de los epítomos del APE cuando está unido a la AMG (16).

IV.2.2. INMUNOENSAYOS

Los inmunoensayos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes "específicos". El principio de estos análisis es que se produce un enlace reversible específico entre un antígeno y el anticuerpo correspondiente, y esta interacción da lugar a un complejo que puede diferenciarse del ligando enlazado o libre. Para medir esta interacción o formación de complejos, se aparean diversos marcadores en forma covalente a ligandos, lo que permite detectar y cuantificar la molécula de interés (23).

ENSAYO RADIOINMUNOLOGICO

El ensayo radioinmunológico (RIA) es una técnica inmunológica en la que se utilizan radioisótopos para detectar antígenos o anticuerpos en líquidos biológicos.

En este ensayo se incorpora una reacción de enlace competitivo, en la cual una cantidad fija de antígeno marcado radiactivamente y antígeno de la muestra compiten por un número limitado de sitios de enlace específicos con el anticuerpo. Tanto el antígeno marcado como el no marcado se enlazan con el anticuerpo y forman complejos precipitables. Los antígenos marcados radiactivamente, tanto libres como enlazados se separan y a continuación se determina la radiactividad del radioisótopo enlazado.

El porcentaje de antígeno marcado radiactivamente que se precipita disminuye a medida que la concentración de antígeno no marcado en la muestra aumenta. Por tanto, la concentración de antígeno en la muestra problema se relaciona inversamente con la cantidad de radiactividad de la fracción enlazada (23) (Fig.8).

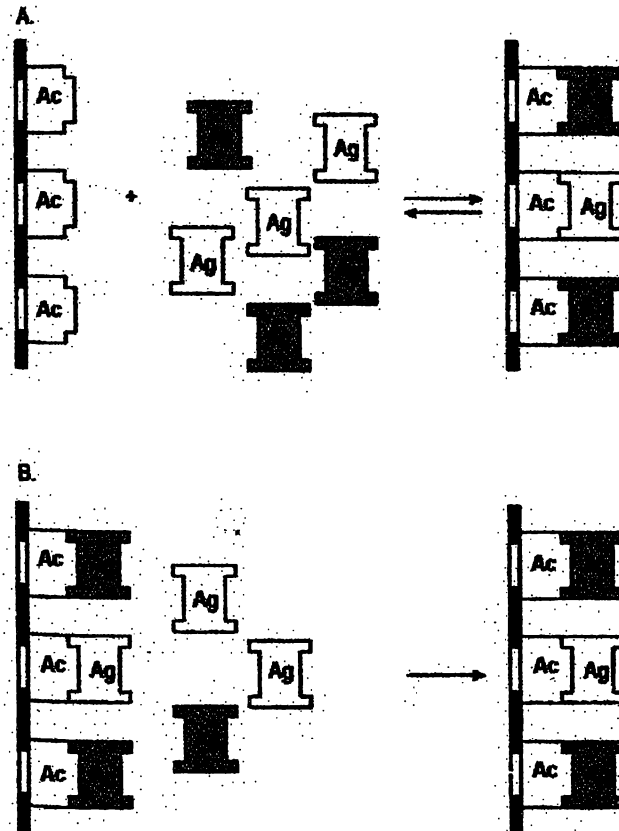


Fig.8 Ensayo radioinmunológico por enlace en fase sólida. A. Antígeno marcado radiactivamente (sombreado) y estándares, controles o muestras que contienen antígeno (Ag) se agregan a tubos recubiertos con anticuerpo (Ac). Los antígenos marcados y no marcados compiten por un número limitado de sitios de enlace Ac y forman complejos. B. Se retiran los antígenos marcados radiactivamente que quedan libres y se determina la radiactividad de la fracción enlazada (23).

ENSAYO RADIOINMUNOMETRICO

El principio en que se basa el ensayo radioinmunométrico (IRMA) es el uso de un anticuerpo marcado radiactivamente para determinar la presencia de un antígeno en líquidos biológicos. En el ensayo IRMA se utiliza un exceso de anticuerpo marcado radiactivamente para detectar todo el antígeno presente, por lo cual es un análisis no competitivo. Se requiere de un paso de separación para diferenciar entre los anticuerpos marcados radiactivamente y enlazados con el antígeno y el marcador libre. A continuación se determina con un contador gamma la radiactividad del marcador enlazado. El IRMA es similar al RIA porque utiliza moléculas marcadas radiactivamente para detectar reacciones antígeno-anticuerpo.

Sin embargo, en el IRMA la molécula marcada es el anticuerpo, en comparación con el antígeno marcado radiactivamente en el RIA. Además todo el antígeno no marcado se enlaza por el exceso de anticuerpo, por lo cual el análisis de IRMA es más sensible que el RIA (23) (Fig.9).

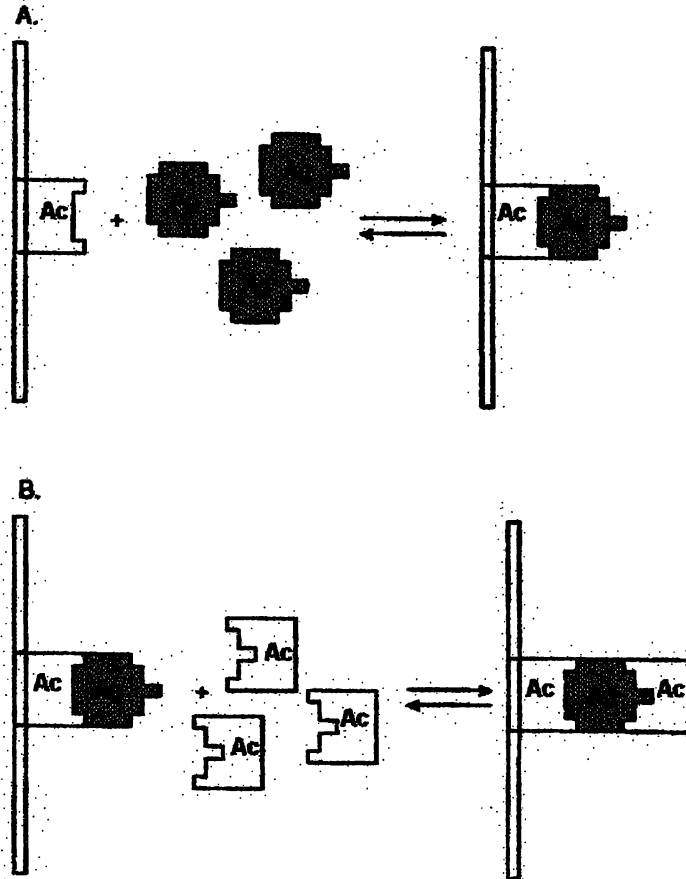


Fig.9 Ensayo radioinmunométrico en dos sitios en fase sólida. A. Las muestras, controles y estándares que contienen antígeno (Ag) se agregan a tubos recubiertos de anticuerpos (Ac) y se forman complejos Ag-Ac. B. Se agrega un segundo Ac marcado radiactivamente (sombreado), el cual reconoce y se enlaza con un sitio único en el mismo Ag, formando un complejo de gran tamaño. A continuación se retira el segundo Ac marcado libre y se determina la radiactividad (23).

ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS

En el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se utiliza un marcador enzimático en vez de un marcador radioisotópico para medir la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario.

En las pruebas de ELISA se requiere un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Para esto último, se añade sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato. Por sus propiedades catalíticas, las enzimas son marcadores muy sensibles y versátiles. Una sola proteína enzimática puede transformar en algunos minutos un gran número de moléculas de sustrato en una cantidad igualmente abundante de producto final produciendo un cambio de color amplificado y que se detecta con facilidad (23) (Fig. 10).

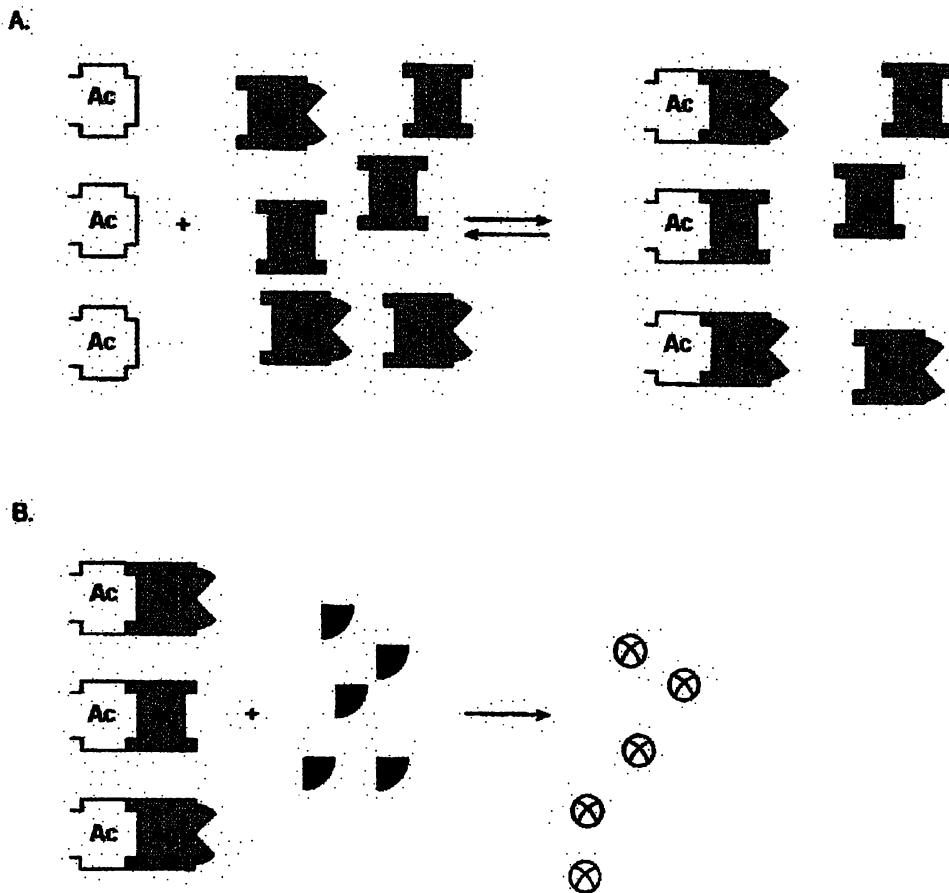


Fig. 10 Prueba ELISA. A. Se hace reaccionar un número limitado de moléculas de anticuerpo (Ac) unidas a perlas de poliestireno con antígeno (Ag) y antígeno conjugado con enzima (Ag-Enz). Estos antígenos compiten por el sitio de enlace y forman complejos. B. Las perlas se lavan para retirar el antígeno no enlazado, se agrega sustrato enzimático (S) y el antígeno conjugado con enzima, que se encuentra enlazado transforma el sustrato en un producto colorido susceptible a medición (P).

ENSAYO INMUNOFLORESCENTE CON SUSTRATO MARCADO

El ensayo inmunofluorescente con sustrato marcado (SLFIA) es un ensayo inmunológico enzimático en el que no se requiere separación. En este análisis se utiliza un sustrato enzimático fluorescente como marcador y una reacción enzima-sustrato para detectar complejos anticuerpo-antígeno. El ensayo SLFIA se basa en una reacción de enlace competitivo entre un ligando fluorescente y un ligando no marcado por un número limitado de sitios de enlace específicos para anticuerpos y los complejos correspondientes que se forman. Cuando los anticuerpos se enlazan a la porción de ligando fluorescente, éste deja de ser sustrato para la enzima; por tanto, la forma libre del marcador emite fluorescencia, mientras que el marcador enlazado con el anticuerpo no. Se añade enzima después de que se forman los complejos correspondientes. No se requieren pasos de separación para distinguir entre el marcador libre y enlazado con el anticuerpo, porque sólo el marcador libre sirve como sustrato enzimático y genera un producto fluorescente. El producto fluorescente se mide con un fluorímetro (23).

IV.3. INVESTIGACIONES TEMPRANAS DEL APE LIBRE

Se ha sugerido que las formas moleculares del APE en particular el APE libre puede dar información extra que ayudará a la discriminación de padecimientos prostáticos benignos y malignos.

Aunque las bases biológicas para estas investigaciones no están claras, muchos investigadores han confirmado que la proporción de APE libre a APE total es mayor en padecimientos benignos de la próstata y más baja en pacientes con cáncer prostático.

Se ha especulado que este incremento podría deberse a las diferencias mecánicas entre las células normales o benignas y las malignas en la producción de ACT o en la liberación del APE a la circulación general asociada a la pérdida de la arquitectura del tejido en el cáncer (24).

En otras palabras, parece ser que hay una producción prostática local de ACT, y que se localiza en el epitelio glandular. La transcripción de ACT y la proteína de ACT expresada son detectadas en la mayoría de las células tumorales de los cánceres prostáticos. En contraste, la transcripción de ACT y la proteína de ACT expresada son escasas en el epitelio productor de APE en los nódulos hiperplásicos.

De aquí que, estos hallazgos aún no explican porqué el porcentaje de APE libre es significativamente mayor en hombres sanos y sin cáncer de próstata detectable.

Pero por otra parte, otra posible explicación sería de que las barreras prostáticas están mejor preservadas en el tejido normal que en el canceroso, previniendo al complejo APE-ACT que escape del sistema ductal prostático y subsecuentemente permite que el porcentaje de APE libre en el suero sea proporcionalmente mayor en pacientes normales que en aquellos con cáncer prostático (18) (Fig. 11).

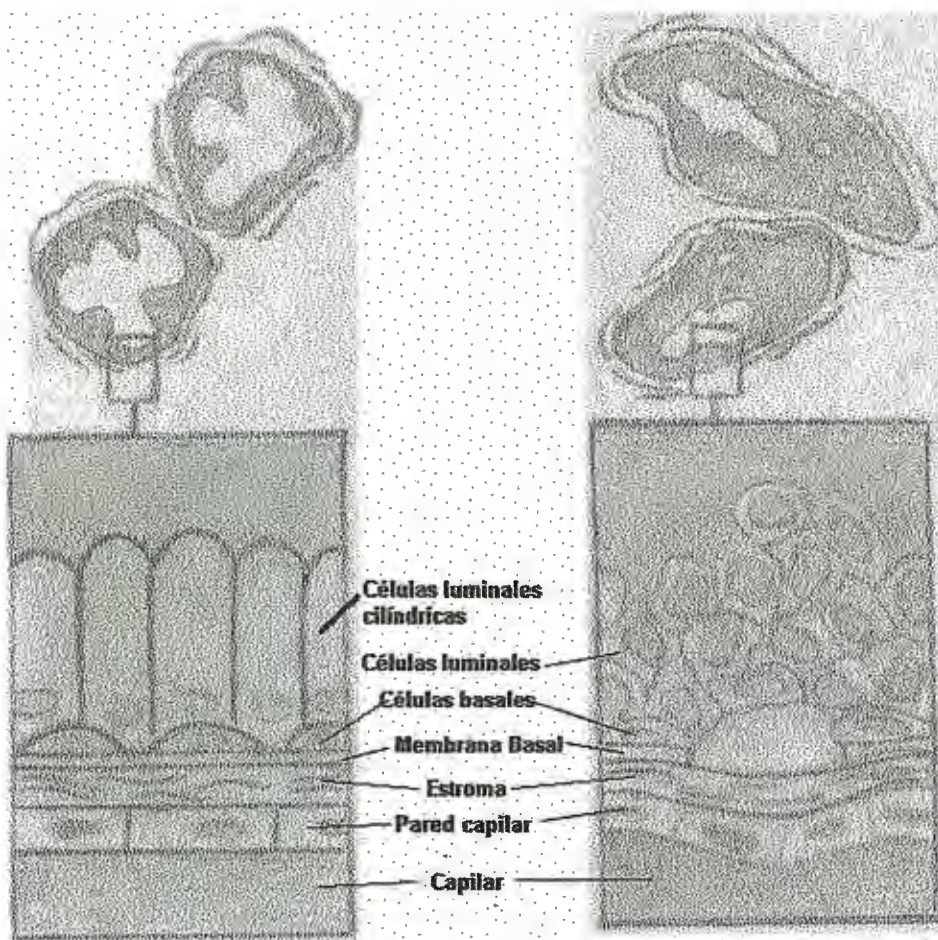


Fig.11 Normalmente existen las barreras de diferentes tejidos entre el lumen de la glándula prostática y los capilares. En el cáncer, estas barreras están comprometidas (25).

IV.4. USO DEL PORCENTAJE DE APE LIBRE

El APE es producido por las células prostáticas malignas y no malignas. Así pues, hay un entrecruzamiento en los niveles del APE total entre hombres con hiperplasia prostática y aquellos con cáncer de próstata (26). Es por eso que se dice que el APE no es específico para cáncer de próstata; un valor sérico elevado no siempre indica cáncer de próstata, y un valor dentro del intervalo de referencia no siempre indica que hay ausencia del mismo (27).

La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata y ligera elevación de la concentración del APE tienen el padecimiento en etapa temprana y donde más de la mitad de los pacientes con concentraciones arriba de 10.0 ng/ml tienen el padecimiento en etapa avanzada. Es por eso que la medición de la forma libre del APE y su porcentaje en suero es un camino potencial para mejorar la detección del cáncer de próstata (28).

IV.5. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE APE LIBRE

La mayoría de las investigaciones del porcentaje de APE libre han incluido pacientes con un incremento mínimo en el valor del APE total y se han enfocado en la capacidad del porcentaje de APE libre para mejorar la especificidad. La definición de un incremento mínimo en la concentración sérica del APE ha sido arbitrario, sin embargo, han variado desde 4.1 ng/ml hasta 10.0 ó 20.0 ng/ml. Además el porcentaje de APE libre puede mejorar también la sensibilidad en pacientes con valores de APE dentro del intervalo normal.

Entonces, ¿cómo usar mejor la información que el porcentaje de APE libre proporciona? La respuesta aún es controversial. Un método que ha sido ampliamente utilizado es el de proponer un punto de corte que corresponda a una sensibilidad clínica entre el 90 y 95% y así calcular la especificidad resultante. Con un intervalo de sensibilidad de 90 a 95% , puntos de corte de 14 a 18% de porcentaje de APE libre reportan intervalos de especificidad de 19 a 64% correspondientemente (22).

IV.5.1. USO DEL PORCENTAJE DE APE LIBRE CON APE NORMAL

Cuando el APE total está en el intervalo normal, es decir, hasta 4.0 ng/ml, el objetivo es incrementar la detección de cáncer (sensibilidad) con un aumento en el número de biopsias realizadas. En una investigación hecha por Vashi y col. (6) determinaron que un punto de corte del porcentaje de APE libre de 0.19 (o menor) detectó el 90% de todos los cánceres en el subgrupo de valores de APE total de 3.0 a 4.0 ng/ml.

El estudio de Catalona y col. (28) sostienen también la capacidad del porcentaje del APE libre para mejorar la detección de cáncer cuando el valor está dentro del intervalo normal. Estos investigadores tomaron a 120 hombres con valores de APE total entre 2.8 y 4.0 ng/ml. Con el uso del punto de corte de 0.21, el 91% de los cánceres fueron detectados. Así pues, el porcentaje de APE libre puede aumentar significativamente la detección de cáncer cuando el APE total está en el límite superior del valor normal.

IV.5.2. USO DEL PORCENTAJE DE APE LIBRE CON VALORES DE APE ENTRE 4.1 Y 10.0 NG/ML

Con el intervalo de APE total entre 4.1 y 10.0 ng/ml, el objetivo es eliminar las biopsias prostáticas innecesarias (mejorar la especificidad) sin comprometer la detección de cáncer. En un muestreo, Keetch y col. (29) determinaron que un 20% de hombres con el valor de APE total entre 4.1 y 10.0 ng/ml tuvieron cáncer. Entonces se determinó que el punto de corte apropiado para el porcentaje de APE libre es 0.24, esto es, todos los pacientes con valores de porcentaje menores o igual de 0.24 deberían realizarse biopsia, y aquellos con valores mayores de 0.24 no deberían de tener biopsia. Este punto de corte mantiene el 95% de sensibilidad para la detección de cáncer.

Catalona y col. (28) determinaron que un punto de corte de 0.234 mantiene el 90% de sensibilidad. En un estudio de 57 pacientes, Luderer y col. (21) examinaron la utilidad del porcentaje del APE libre entre el intervalo de 4.1 y 10.0 ng/ml y reportaron que un punto de corte de 0.25 detecta todos los cánceres. Aunque ellos sugieren un punto de corte de 0.20, el cual tiene un 88% de sensibilidad y un 50% de especificidad.

A continuación se muestran en forma resumida varios estudios donde se sugieren intervalos de sensibilidades del 90 al 95%, puntos de corte de 0.14 a 0.28 de APE libre y especificidades que varían desde 19 hasta un 64% (24). Tabla 2.

Tabla 2. Diversos estudios para mejorar la detección temprana del cáncer de próstata.

Referencia	APE total ng/ml	Cáncer/No cáncer (población)	% APE libre punto de corte	% sensibilidad	% especificidad
Christensson y col.	4.0-20.0	No disponible	18	71	95
Luderer y col.	4.0-10.0	25/32	25	100	31
Catalona y col.	4.0-10.0	63/50	20	90	38
Bangma y col.	4.0-10.0	33/107	28	91	19
Chen y col.	2.5-20.0	165/263	25	95	26
Prestigiacomo y col.	4.0-10.0	20/28	14	95	64
			15	95	56
Elgamal y col.	3.0-15.0	37/48	18	95	40
Van Cangh y col	2.0-30.0	154/266	25	90	38
	2.0-10.0	90/205	25	90	38
Catalona y col.	2.6-4.0	52/232	26	90	24
Partin y col.	4.0-10.0	139/78	20	95	29

Con el avance de estos estudios se podrá relacionar aún mejor los factores que pueden influenciar en la aparición de una hiperplasia prostática o un cáncer de próstata, y cómo tomar mejores decisiones sobre el uso del porcentaje de APE libre.

De esta manera, el porcentaje de APE libre será un marcador adicional que, junto con otras metodologías, lograrán un mejor diagnóstico en el cáncer de próstata.

CAPITULO V

V. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

V.1. HIPOTESIS

La implementación de una nueva prueba de laboratorio como el APE libre, servirá para mejorar la detección del cáncer de próstata, en lugar de usar solamente la medición del APE total. Además será de gran ayuda para el médico en el establecimiento del diagnóstico final del paciente.

V.2. OBJETIVOS

V.2.1. OBJETIVO GENERAL

Proporcionar toda la información posible para el uso del APE libre y comprobar si realmente será una prueba de apoyo diagnóstica para detectar tempranamente el cáncer de próstata.

V.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer el intervalo de referencia para la prueba de APE libre.
- Proponer un punto de corte para el porcentaje de APE libre.

CAPITULO VI

VI. MATERIAL Y METODO

VI.1. MATERIAL

Estudio prospectivo transversal de 50 varones donadores de sangre con edades desde los 30 años hasta los 50 años presentando buen estado general y sin presentar antecedentes de patologías prostáticas.

Las muestras fueron recolectadas por punción venosa obteniendo aproximadamente 5 ml de sangre, se separó el suero del paquete celular y las muestras de suero se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su procesamiento.

A las 50 muestras se les realizó la prueba de APE total y APE libre para que con estos parámetros calcular la proporción de APE libre a total y de aquí el porcentaje de APE libre. Estos cálculos, el instrumento a utilizar, los puede hacer automáticamente denominando como razón a la proporción de APE libre a total, o bien, se puede hacer de forma manual como sigue:

$$\frac{\text{APE libre (ng/ml)}}{\text{APE total (ng/ml)}} = \text{proporción libre/total}$$

$$\text{Proporción libre/total} \times 100 = \text{porcentaje de APE libre (\%)}$$

También se incluye a un grupo de 33 pacientes que presentaron elevaciones en el nivel sérico tanto de APE total y APE libre, y que acudieron al servicio de urología del INCan por un diagnóstico de cáncer de próstata; o que no tenían elevación del APE pero presentaban la sintomatología característica de un padecimiento prostático. Se tomaron como datos las concentraciones de APE total y APE libre, así como el porcentaje de APE libre, además se clasificaron de acuerdo al padecimiento que presentaron y el grado histológico de acuerdo al sistema Gleason, que se basa en el grado de diferenciación de las células tumorales. Así, el paciente que presente un Gleason elevado, el tumor estará caracterizado por células tumorales indiferenciadas. El pronóstico empeora progresivamente con la pérdida de la diferenciación glandular. Tabla 3.

Tabla 3. Pacientes que acudieron al servicio de urología.	
n = número	
<u>Cáncer de próstata</u>	
Grado Histológico	
Gleason 5	n = 1
6	n = 2
7	n = 6
8	n = 6
9	n = 3
Metástasis Oseas	n = 3
No determinado	n = 7
<u>Padecimiento benigno</u>	
Hiperplasia prostática	n = 2
Prostatitis	n = 3
TOTAL	33
	Pacientes

Se comparó esta población con los valores obtenidos de la población sana para mostrar la diferencia que puede existir entre los valores de ambas poblaciones.

VI.2. METODO

La medición del APE total y APE libre se realizó usando el sistema automatizado AxSYM de ABBOTT, el cual es un analizador de acceso continuo y aleatorio. Se utilizó la tecnología de Inmunoensayo Enzimático de Micropartículas (MEIA, Microparticles Enzyme Immunoassay) para ambos ensayos, así como para las calibraciones y controles. El ensayo de APE total reconoce tanto al APE libre como al APE unido. La sensibilidad de estos ensayos es de 0.1ng/ml (28).

VI.2.1. PRINCIPIOS DE LA REACCION MEIA

La tecnología MEIA utiliza una solución de partículas suspendidas del tamaño de un submicrón para medir a los antígenos de interés. Las partículas están cubiertas con un anticuerpo específico para el antígeno que se va a medir, que es el APE libre

El área de superficie efectiva incrementa la reacción del ensayo y así decrece el tiempo de incubación. Esto permite al ensayo MEIA alcanzar el equilibrio en menos tiempo que otros inmunoensayos.

En el centro de muestras, los reactivos y las muestras se transfieren a una celdilla de reacción. Esta celdilla de reacción es transferida al centro de procesamiento donde la muestra y los reactivos se incuban para permitir que lleguen a la temperatura de reacción.

Los reactivos y la muestra se combinan y la mezcla de reacción se transfiere a una matriz de fibra de vidrio inerte. La unión irreversible de las micropartículas provoca que el complejo antígeno-anticuerpo sea retenido por las fibras de vidrio mientras la mezcla de reacción fluye rápidamente a través de los grandes poros de la matriz. (Fig.12).

Un conjugado marcado con fosfatasa alcalina se adiciona a la matriz de fibra de vidrio antes de la adición del 4-metil-umbeliferil fosfato (MUP). El conjugado cataliza la hidrólisis del MUP a metil-umbeliferona (MU). La medición del MU fluorescente que se genera en la matriz es proporcional a la concentración del antígeno en la muestra a ensayar (28).

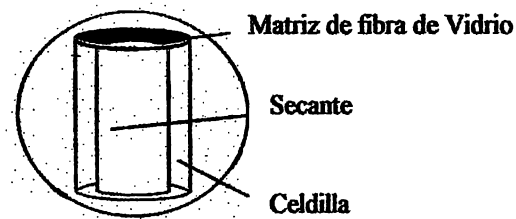


Fig. 12 Matriz de fibra de vidrio

VI.2.2. REACTIVOS DE MEIA

Los reactivos para el ensayo APE libre son:

- Micropartículas cubiertas con un anticuerpo de captura anti-APE.
- Solución 1-sustrato fluorescente 4-metil-umbeliferil fosfato (MUP).
- Fosfatasa alcalina-conjugado marcado (anti-APE libre).

VI.2.3. REACCION MEIA PARA EL ENSAYO DE APE LIBRE

1. El antígeno se une a las micropartículas.

La muestra y las micropartículas se combinan e incuban a una temperatura de reacción. Durante este periodo de incubación, el APE libre se une a las micropartículas creando un complejo antígeno -anticuerpo

2. El complejo antígeno-anticuerpo se une a la matriz de fibra de vidrio.

La cánula procesadora aspira la mezcla de reacción del pocillo de incubación de la celdilla de reacción y la dispensa a la celdilla matriz. El complejo antígeno-anticuerpo se une irreversiblemente a la matriz de fibra de vidrio. Un lavado de esta matriz remueve los materiales no unidos. Este complejo está retenido en las fibras de vidrio mientras el exceso de la mezcla de reacción fluye a través de los poros de la matriz (Fig. 13).



Fig. 13 El complejo antígeno-anticuerpo se une a las fibras de vidrio de la matriz.

3. **Un conjugado complementa al complejo antígeno-anticuerpo.**
La cánula procesadora transfiere a la fosfatasa alcalina-conjugado marcado anti APE libre de la celdilla de reacción a la celdilla matriz. El conjugado se une al complejo antígeno-anticuerpo para completar el "sandwich" de anticuerpo-antígeno-conjugado. La matriz se lava de nuevo.

4. **El MUP se convierte en MU.**
El dispensador de la solución 1 añade el sustrato 4-metil-umbeliferil fosfato (MUP) a la celdilla matriz. El conjugado de fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del MUP a 4-metil-umbeliferona (MU).

5. **La generación de MU es proporcional a la concentración del antígeno.**
La óptica MEIA mide la velocidad a la cual MU, el producto fluorescente, es generado en la matriz de fibra de vidrio. La velocidad con que MU es generada en la matriz es proporcional a la concentración del APE libre en la muestra a ensayar (28).

En la figura 14 se ilustra la secuencia de una reacción MEIA, donde:

- A. Las micropartículas recubiertas con anti-APE se unen al APE libre contenido en la muestra formándose un complejo antígeno-anticuerpo.
- B. Se adiciona el conjugado fosfatasa alcalina- anti APE libre
- C. Se añade el sustrato 4-metil-umbeliferil fosfato para producir un producto fluorescente.

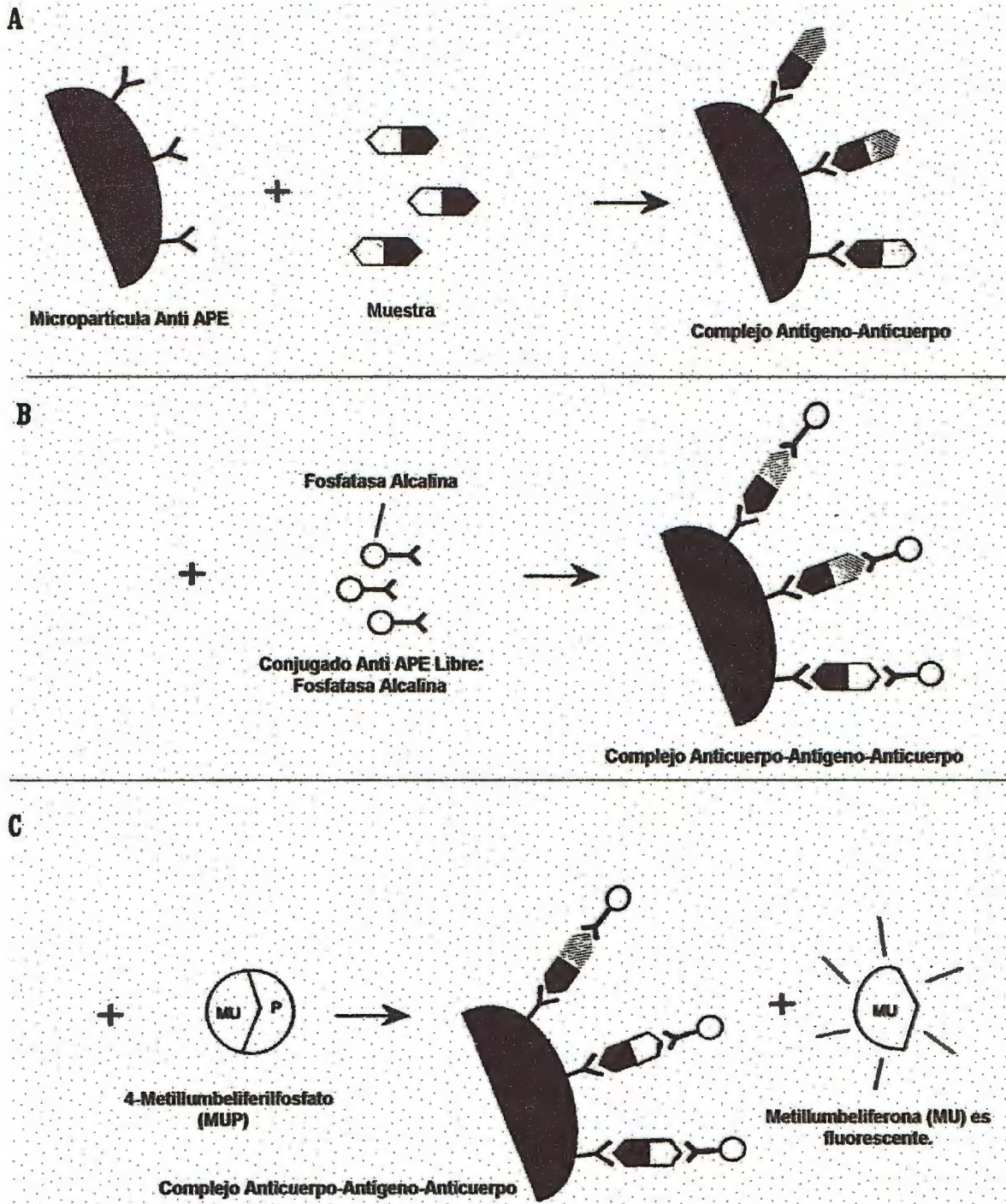


Fig. 14 SECUENCIA ESQUEMATICA DE UNA REACCION MEIA

VI.2.4. PRINCIPIOS DE LA CALIBRACION DEL ENSAYO APE LIBRE (30)

Una curva de calibración es definida cuando se ensaya un conjunto de muestras con concentraciones conocidas del analito, en este caso, de APE libre. Estas muestras llamadas calibradores, son específicas para el APE libre y cubren un amplio intervalo de valores.

Interpolando el valor medido contra la concentración de este grupo de calibradores se crea la curva de calibración. Esta curva es almacenada en el sistema. Cuando se efectúa un ensayo, ya sea de controles y/o muestras, el sistema calcula el valor de estos controles o muestras de la curva de calibración almacenada.

Para el ensayo de APE libre se utilizaron 2 tipos de calibración según la casa comercial ABBOTT:

- Curva de calibración principal (Master calibration curve):

En este caso, se ensayan dos calibradores con concentraciones ya establecidas etiquetados como Calibrador Principal 1 (M-Cal1) y Calibrador Principal 2 (M-Cal2). El sistema utiliza los dos calibradores y la curva principal se almacena. (Revisar tabla 5, pág 44).

- Curva de calibración estándar (Standard calibration curve):

Se tiene la opción de realizar una calibración estándar en lugar de realizar la calibración principal. Se utilizan 6 calibradores de diferentes concentración etiquetados de la A a la F. Este tipo de calibración se realiza generalmente cuando un nuevo lote de reactivo es usado. (Tabla 4, pág 44)

ALMACENAMIENTO DE LA CURVA

Si la calibración pasa los criterios, el instrumento almacena la calibración como una curva activa para ese lote del ensayo. Cuando se calibra un nuevo lote de reactivo, esta calibración es la nueva curva activa y la curva anterior es eliminada.

Si alguno de los valores difiere de la concentración predeterminada para el ensayo, la calibración se clasifica como una curva inválida. Esta curva se almacena sólo hasta que se realiza otra calibración del ensayo y quede como curva activa.

VI.2.5. CONTROLES (30)

Los controles, son muestras de concentración conocida de un intervalo establecido para el APE libre. Estos controles, por lo general, tienen una concentración del APE libre diferente a la de los calibradores y representan valores críticos para el ensayo específico. Los controles se presentan en tres niveles de concentración; bajo, medio y alto.

Generalmente, se ensayan tres controles inmediatamente después de los calibradores para probar la nueva curva de calibración almacenada.

VI.2.6. CONTROL DE CALIDAD

Se aplicó el requisito de control de calidad recomendado para el ensayo AxSYM APE libre, el cual consiste en el análisis de una muestra de todos los niveles de los controles de APE libre en distintos días (30).

La carta de control de Levy-Jennings ha sido empleada para representar las observaciones de los controles en función del tiempo. Los resultados de los controles son expresados en el eje de las ordenadas con respecto al tiempo en el eje de las abscisas. Esta carta muestra el valor medio esperado mediante una línea horizontal en el centro y los valores límite del control aceptables se delimitan mediante líneas horizontales arriba y debajo de la línea media. La interpretación de esta carta de control consiste en considerar que la prueba está controlada cuando los valores se encuentran dentro de estos límites y se encuentra fuera de control cuando un resultado supera tales límites.

Para construir estas cartas se traza una horizontal que representa la media del valor de la muestra control. Se determinan los límites control superior e inferior para esa media, sumando y restando dos desviaciones estándar (31).

VI.2.7. PARAMETROS ESTADISTICOS EMPLEADOS (23, 32)

- **MEDIA ARITMETICA O PROMEDIO.** Es un valor típico o representativo de un conjunto de datos. Indica el centro de la distribución. Se simboliza con la letra X.

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}$$

Donde \bar{X} = media aritmética o promedio
 $\sum x$ = suma de los valores individuales de la serie
 n = tamaño de la muestra

- **Desviación estándar (DE).** Mide la extensión de la distribución expresando qué tanto se agrupan los datos alrededor de la media.

$$DE = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

El significado de DE, es que cuanto más pequeña es la desviación estándar, tanto más agrupados están los datos alrededor de la media.

- **Coefficiente de variación (CV).** Es la desviación estándar calculada como porcentaje de la media.

$$CV = \frac{DE}{\bar{X}} \times 100$$

- **Positivo verdadero (PV).** Resultado positivo para pacientes que padecen la enfermedad.
- **Negativo verdadero (NV).** Resultado negativo para pacientes que no tienen la enfermedad.
- **Positivo falso (PF).** Resultado positivo para pacientes que no tienen la enfermedad.
- **Negativo falso (NF).** Resultado negativo para pacientes que tienen la enfermedad.

Lo ideal sería que todos los resultados positivos fueran positivos verdaderos y todos los negativos, negativos verdaderos; sin embargo, no siempre ocurre así, y en general, existe un cierto equilibrio entre positivos y negativos verdaderos, y positivos y negativos falsos que deben tenerse en cuenta en todas las nuevas pruebas.

- **Sensibilidad.** La sensibilidad diagnóstica es la probabilidad de que el resultado de una prueba sea positivo cuando está presente la enfermedad que la prueba detecta. Compara el número de resultados positivos verdaderos con todas las pruebas de pacientes que debieron haber dado resultados positivos en el estudio.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{PV}}{\text{PV} + \text{NF}} \times 100$$

- **Especificidad** Es la probabilidad de que el resultado de una prueba sea negativa cuando la enfermedad que dicha prueba detecta no está presente. Compara el número de negativos verdaderos con todas las muestras de pacientes cuyos resultados debieron ser negativos.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{NV}}{\text{NV} + \text{PF}} \times 100$$

- **Eficacia diagnóstica (ED)**. Se expresa por la suma de la especificidad y sensibilidad para diferenciar entre sujetos sanos y enfermos.

$$ED = \frac{PV + NV}{\text{Total de enfermos} + \text{Total de sanos}} \times 100$$

CAPITULO VII

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

VII.1. CALIBRACION

Para la calibración del ensayo APE libre, se realizaron las curvas principal y estándar para así evaluar al instrumento y a la calibración del ensayo.

En la curva estándar, se ensayaron los 6 calibradores de la A a la F. Tabla 4. Las concentraciones de los calibradores se introdujeron manualmente al sistema, dando las lecturas de MEIA como resultado. La medición del producto fluorescente (MU) se utiliza para generar la curva de calibración usando las concentraciones de los calibradores.

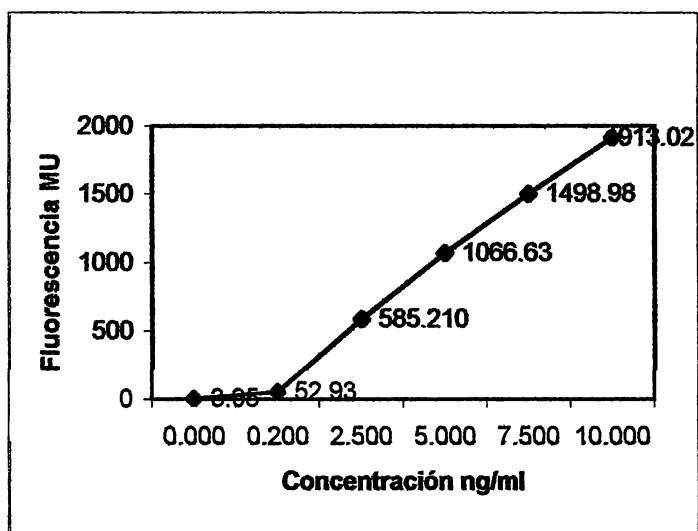
Tabla 4. Resultados de la calibración estándar.

Calibrador	Concentración ng/ml	Lectura MEIA
A	0.000	3.95
B	0.200	52.93
C	2.500	585.210
D	5.000	1066.63
E	7.500	1498.98
F	10.000	1913.02

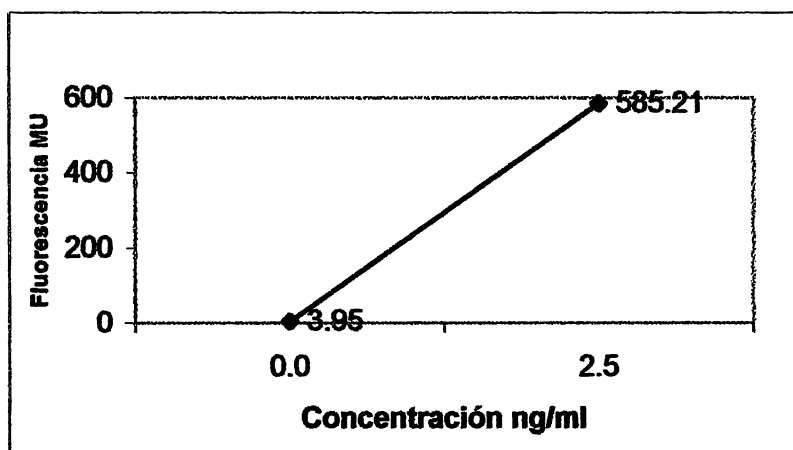
Y para la calibración principal se ensayaron los dos calibradores M-Cal1 y M-Cal2 para obtener dos puntos. Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la calibración principal

Calibrador	Concentración ng/ml	Lectura MEIA
M-Cal 1	0.0	3.95
M-Cal 2	2.5	585.21



Gráfica 1. Lecturas obtenidas para la calibración estándar.



Gráfica 2. Lecturas obtenidas para la calibración principal.

Al terminar estas calibraciones, el instrumento aceptó las curvas, ya que cumplieron con las especificaciones designadas a los parámetros de validez que seleccionamos, estos son que la reacción sea lineal hasta la concentración de 10.0 ng/ml; y que correspondan las lecturas a las concentraciones que se introdujeron manualmente.

VII.2. CONTROLES

Después de aceptadas ambas curvas de calibración, se analizaron los controles en sus tres niveles de concentración. Tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones establecidas para los controles de APE libre

	Concentración ng/ml	Intervalo ng/ml
APE libre Bajo	0.373	0.3-0.5 (0.4)
Medio	0.932	0.8-1.2 (1.0)
Alto	6.18	5.6-8.4 (7.0)

Y así evaluamos la calibración del ensayo, la cual es aceptable porque los controles están dentro del intervalo establecido.

VII.3. CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad se llevó a cabo ensayando durante 15 días a los controles en sus tres niveles para de esta manera evaluar la precisión del ensayo y para verificar también el desempeño del instrumento. Tabla 7.

Tabla 7. Control de calidad APE libre

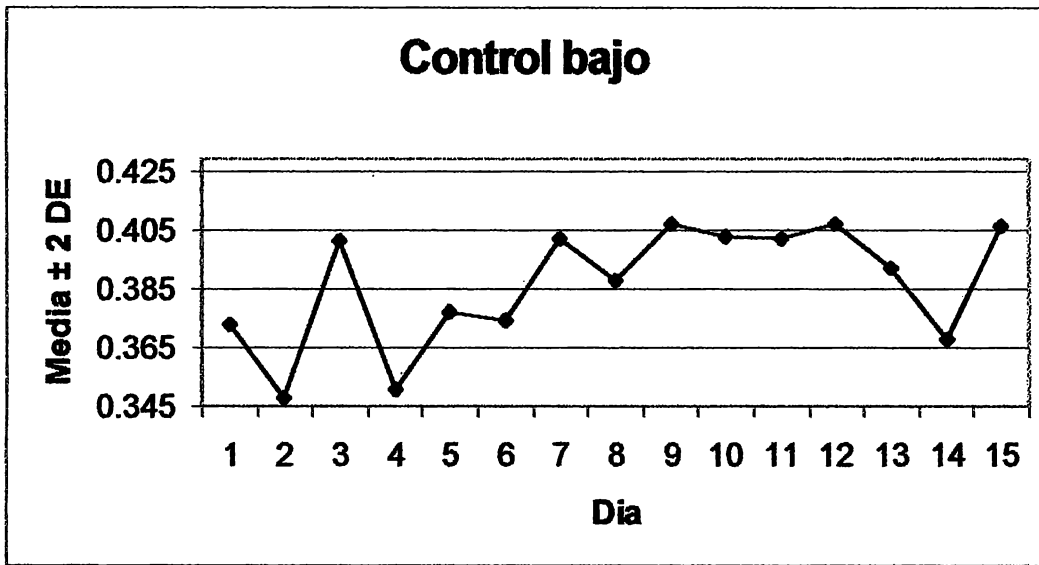
Día	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
	ng/ml	ng/ml	ng/ml
1	0.373	0.932	7.386
2	0.348	0.946	6.900
3	0.401	0.953	7.474
4	0.351	0.920	6.892
5	0.377	0.994	6.949
6	0.374	0.984	6.953
7	0.412	1.072	6.867
8	0.388	1.006	7.211
9	0.407	1.060	7.030
10	0.403	1.020	7.174
11	0.402	0.946	7.066
12	0.407	1.018	6.980
13	0.392	1.051	7.462
14	0.368	0.998	6.996
15	0.406	0.967	6.792

Se calculó la media, la desviación estándar para establecer los límites superior e inferior en las cartas de Levy-Jennings, así como el coeficiente de variación de cada control. Tabla 8.

Tabla 8. Estadística del Control de Calidad de APE libre

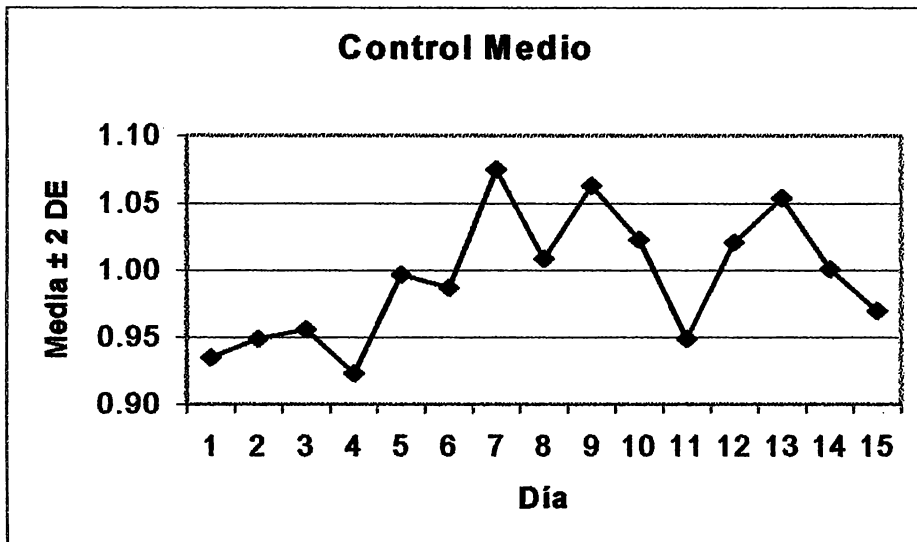
Control	n	Media	DE	% CV
Bajo	15	0.387	0.021	5.42
Medio	15	0.991	0.047	4.74
Alto	15	7.075	0.219	3.10

Se graficaron los valores de cada control en diferentes cartas de Levy-Jennings para ver la distribución que presentaron estos controles. Gráficas 3, 4 y 5.



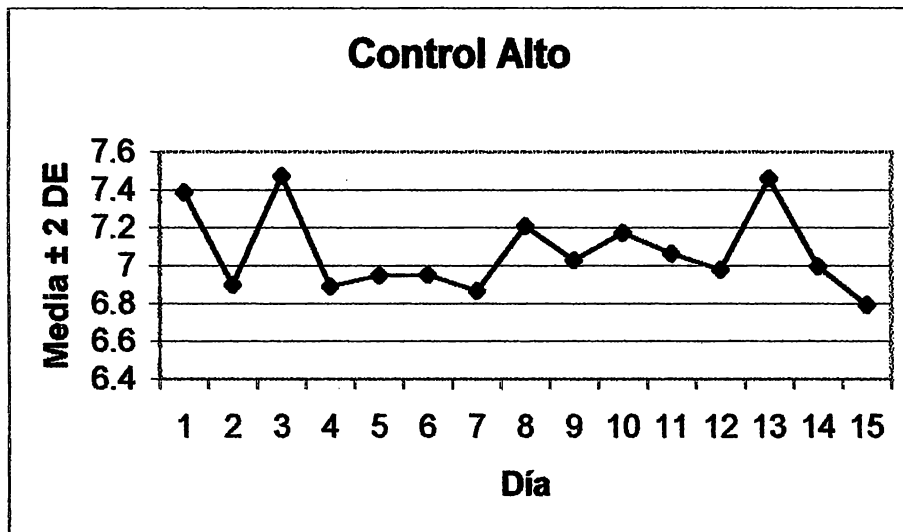
Gráfica 3. Control de calidad concentraciónl baja

MEDIA	0.387
L. INFERIOR	0.345
L.SUPERIOR	0.429



Gráfica 4. Control de calidad concentración media

MEDIA	0.991
L. INFERIOR	0.897
L.SUPERIOR	1.085



Gráfica 5. Control de calidad concentración alta

MEDIA	7.075
L. INFERIOR	6.637
L.SUPERIOR	7.513

VII.4. DETERMINACION DEL INTERVALO DE REFERENCIA DE APE LIBRE

Se ensayaron los 50 sueros de los pacientes para APE total y APE libre y poder calcular la proporción de APE libre a APE total para posteriormente calcular el porcentaje de APE libre.

Los resultados son: de una población n igual a 50, se tiene una suma total de los valores individuales de APE de 11.139 ng/ml, calculando la media (\bar{x}) da un valor de 0.221 ng/ml. De estos datos, se calculó la desviación estándar (DE), dando un valor de 0.095, para determinar el intervalo de referencia que ocupará el 95.5% de confianza entre la población estudiada, para esto, calculamos $\pm 2DE$ a partir de la media obteniéndose el intervalo de 0.031 a 0.411. Estos datos se agrupan en la tabla 9.

Tabla 9. Estadística descriptiva para la población de referencia

n	50
x total	11.139 ng/ml
X	0.221 ng/ml
DE	0.095
CV	43%
+2DE	0.411 ng/ml
-2DE	0.031 ng/ml

Como el ensayo tiene una detectabilidad de 0.01 ng/ml, o sea, que es la mínima concentración detectable de APE libre, se puede partir de una concentración de 0.0 ng/ml.

Entonces el intervalo de referencia que se propone para el nuevo ensayo de APE libre de 0.000 hasta 0.411 ng/ml.

Obteniendo este intervalo, comparamos los valores de APE total y APE libre, así como el porcentaje de APE libre del grupo de pacientes sanos y de los 33 pacientes que acudieron al servicio de urología. Tabla 10.

Tabla 10. Estadística descriptiva para los grupos estudiados.

	Donadores no. (%)	Cáncer no. (%)	Benignos no. (%)
Total de muestras	50(100)	28 (100)	5 (100)
APE total (ng/ml)			
< 4.0	50 (100)	8 (28)	4 (80)
4.0-10.0	0(0)	5 (18)	1 (20)
> 10.0	0(0)	15 (54)	0 (0)
APE libre (ng/ml)			
< 0.411	46(92)	7 (25)	3 (60)
> 0.411	4(8)	21 (75)	2 (40)
% APE libre			
< 15	4(8)	19 (68)	1 (20)
15.1 – 20	9(18)	4 (14)	2 (40)
20.1 – 25	6(12)	2 (7)	2 (40)
> 25	31(62)	3 (11)	0 (0)

Con los resultados obtenidos para este ensayo, se calculó la probabilidad por medio de la Exacta de Fisher y Yates siendo de 0.002, así el ensayo es significativo para la detección temprana del cáncer de próstata.

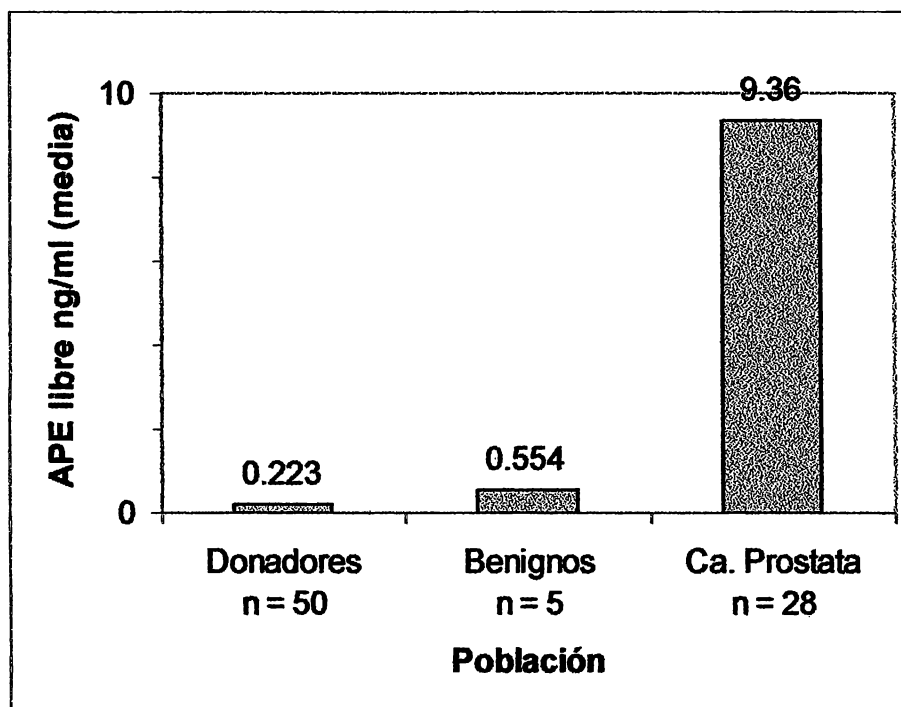
Con el intervalo establecido para el ensayo de APE libre, se calculó la sensibilidad y la especificidad del ensayo para el grupo de pacientes con cáncer de próstata y con padecimientos benignos; tanto para cualquier valor de APE total, tabla 11; como para valores de APE total entre 4.0 y 10.0 ng/ml que es donde existe la mayor confusión para discriminar entre los padecimientos benignos y el cáncer, tabla 12.

Tabla 11. Estadística descriptiva para la población urológica tomando en cuenta todos los valores de APE total.

Todos los valores de APE total	
Parámetros Estadísticos	APE libre 0.0 - 0.411 ng/ml
Sensibilidad	75%
Especificidad	60%
Eficacia diagnóstica	72%

Tabla 12. Estadística descriptiva para aquellos pacientes que presentaron valores de APE total entre 4.0a 10.0 ng/ml.

Valores de APE total 4.0-10.0ng/ml	
Parámetros Estadísticos	APE libre 0.0 - 0.411 ng/ml
Sensibilidad	80%
Especificidad	100%
Eficacia diagnóstica	83%



Gráfica 6. Valores de APE libre para la población estudiada.

En la gráfica 6, se muestran los valores medios de toda la población estudiada, donde se observa que los pacientes con cáncer de próstata presentan valores de APE libre por arriba del límite superior del intervalo de referencia, y donde los pacientes con padecimientos benignos presentan una ligera elevación en la concentración del APE libre.

VII.5. PUNTO DE CORTE PARA EL PORCENTAJE DE APE LIBRE

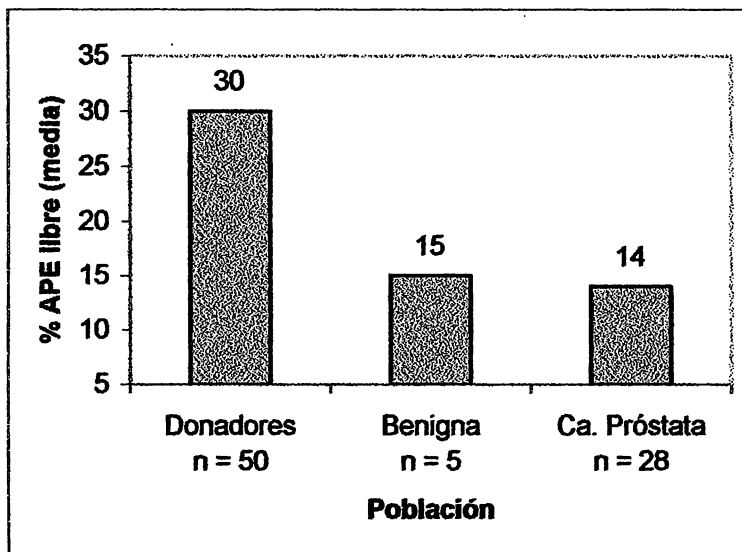
Se analizaron varios puntos de corte para el porcentaje de APE libre y se determinó la sensibilidad y especificidad de cada uno; también se determinó cuántos casos positivos se detectarían y cuántos no, para de esta manera concluir cual sería el punto de corte óptimo. Tabla 13.

Tabla 13. Puntos de corte propuestos.

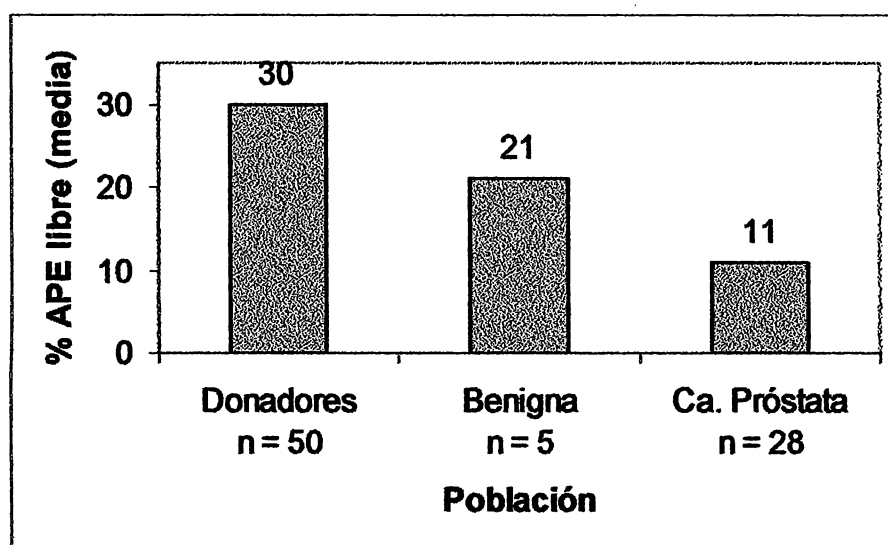
Punto de corte (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Cáncer detectado no. (%)	Cáncer no detectado No. (%)
15	67	80	19 (68)	9 (32)
16	71	40	20 (71)	8 (29)
17	75	40	21 (75)	7 (25)
19	78	40	22 (79)	6 (21)
20	82	40	23 (82)	5 (18)
21	86	20	24 (86)	4 (14)

De acuerdo a la tabla, un punto de corte de 21% detectaría el 86% de los cánceres, aunque el 14% no los detectaría. Un punto de corte más alto sacrificaría a la especificidad.

En la gráfica 7 observamos la distribución de los valores de % de APE libre tomando en cuenta a todos los valores de APE total, y en la gráfica 8 tomando en cuenta sólo a los valores entre 4.0 a 10.0 ng/ml donde existe el entrecruzamiento para los pacientes con cáncer prostático y con padecimientos benignos.



Gráfica 7. Valores del porcentaje de APE libre con todos los valores de APE total.



Gráfica 8. Valores del porcentaje de APE libre con valores de APE total entre 4.0 a 10.0 ng/ml

De acuerdo a los resultados obtenidos, para aquellos pacientes que tienen un porcentaje de APE libre mayor de 21% tendrán la probabilidad de presentar un padecimiento benigno, ya sea una prostatitis o una hiperplasia; en cambio aquellos pacientes con un porcentaje de APE libre menor de 21% tendrán la probabilidad de padecer cáncer prostático.

La bibliografía hace mayor énfasis en el porcentaje de APE libre, ya que esta proporción es la que mejor ilustra la capacidad para poder discriminar entre el cáncer de próstata de los padecimientos benignos. Se han mencionado varios puntos de corte, que varían desde el 14% hasta el 28%. Aunque en este trabajo se incluyó a un grupo reducido de pacientes, con el punto de corte propuesto, existe similitud con el estudio de Catalona y col. (28) quienes reportan un punto de corte de 20% con una sensibilidad y una especificidad de 90% y 38% respectivamente. También revisando el estudio de Vashi y Oesterling (6) se menciona un punto de corte de 22%, teniendo una sensibilidad de 90% y una especificidad de 19%.

CAPITULO VIII

VIII. CONCLUSIONES

El intervalo establecido para el APE libre fue de 0.0 a 0.436 ng/ml, y el punto de corte propuesto es de 21% de APE libre.

El presente trabajo muestra semejanza con la bibliografía internacional para la propuesta de un punto de corte del porcentaje de APE libre, por lo que se cumplen las expectativas establecidas.

La determinación del APE libre es una prueba sencilla y junto con la determinación del APE total se podrá mejorar la detección temprana del cáncer de próstata. Aunque con un valor de APE total por arriba de 10.0 ó hasta 20.0 ng/ml ya se estará sospechando mayormente de un cáncer de próstata; un valor de APE total de 3.0 ó quizá hasta 10.0 ng/ml, cabría la posibilidad de una prostatitis o una hiperplasia, en estos casos, sí sería útil la determinación del APE libre y su correspondiente porcentaje de APE libre.

Esta prueba, podría decir, que no es definitiva, sino que se debería realizar en conjunto con otros exámenes, como el examen digito-rectal y el ultrasonido transrectal; ya que sirve para guiar al médico en el establecimiento del diagnóstico. Tomando en cuenta que anteriormente se ha hecho la historia clínica del paciente a tratar.

Pero aún queda mucho por estudiar de esta patología que ocupa un lugar preocupante entre la población masculina.

CAPITULO IX

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Cooner WH. Definition of the ideal tumor marker. *Urol Clin North Am* 1993; 20(4):575-579.
2. Oesterling JE. Prostate specific antigen: A critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J. Urol* 1991; 145:907-923.
3. Sokoll LJ, Chan DW. Prostate specific antigen. Its discovery and biochemical characteristics. *Urol Clin North Am* 1997; 24(2):253-259
4. Demura T, Shinohara N, Tanaka M, et al. The proportion of free to total prostate specific antigen. A method of detecting prostate carcinoma. *Cancer* 1996; 77(6):1137-1143.
5. Vashi AR, Wojno KJ, Henricks W. Determination of the "reflex range" and appropriate cutpoints for percent free prostate specific antigen in 413 men referred for prostatic evaluation using the AxSYM system. *Urol* 1997; 49(1):19-27.
6. Vashi AR, Oesterling JE. Percent free prostate specific antigen: Entering a new era in the detection of prostate cancer. *Mayo Clin Proc.* 1997; 72:337:344.
7. Gabilondo F, Torres BA. Padecimientos de la próstata. En Uribe Misael. *Tratado de Medicina Interna*, (2ª. Ed.) México: Editorial Médica-Panamericana. 1995:1652-1656. Tomo 2.
8. Cotran RS, Kumar V, Collins T. The male genital tract. Prostate. En *Robbins Pathology Basis of Disease*. (6ª. Ed.) USA. Saunders Company. 1999:1025-1033.
9. Guyton AC, Hall Je. Funciones reproductoras y hormonales del varón (y la glándula pineal). Función de la glándula prostática. En *Tratado de Fisiología Médica* (9ª. Ed.)México. Editorial Interamericana-Mc Graw Hill. 1997:1103.
10. Sagalowky A. Wilson JD. Hiperplasia and carcinoma of the prostate. En Wilson JD. Brawnwald E. Isselbacher KJ. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (12ª. Ed.) USA. Editorial Mc. Graw hill. 1991:1629-1632. Vol. 2.

11. Mortalidad 1996. Subsecretaría de Planeación. Dirección General de Estadística e Informática. México. 44, 45, 80, 181, 182, cuadro 11.8 gráfica 12 y 13.
12. Departamento de Bioestadística. Instituto Nacional de Cancerología. México.
13. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, et al. Purification of human prostatic specific antigen. *Invest. Urol.* 1979; 17: 159-163.
14. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, et al. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res* 1980; 40:2428-2432.
15. Vesella RL, Lange PH. Issues in the assessment of PSA immunoassays. *Urol Clin North Am* 1993; 20(4):607-619.
16. Oesterling JE, Lilja H. Prostate specific antigen: The value of molecular forms and age specific reference ranges. *PSA and Prostate cancer. Update* 1995.
17. Lilja H. Significance of different molecular forms of serum PSA. The free, noncomplexed form of PSA versus that complexed to α_1 -antichymotrypsin. *Urol Clin North Am* 1993; 20(4):681-686.
18. Abrahamsson PA, Lilja H, Oesterling JE. Molecular forms of serum prostate specific antigen. The clinical value of percent free prostate specific antigen. *Urol Clin North Am* 1997; 24(2):353-365.
19. Partin AW, Carter HB. The use of prostate specific antigen and free/total prostate specific antigen in the diagnosis of localized prostate cancer. *Urol Clin North Am.* 1996; 23(4):531-540.
20. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, et al. A complex between prostate specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res.*, 1991; 51:222.
21. Luderer AA, Chen YT, Soriano TF, et al. Measurement of the proportion of free to total prostate specific antigen improves diagnostic performance of prostate specific antigen in the diagnostic gray zone of total prostate specific antigen. *Urol* 1995; 46(2):187-194.

22. Higashihara E, Nutahara K, Kojima M. et al. Significance of serum free prostate specific antigen in the screening of prostate cancer. *J. Urol.* 1996; 156:1964-1968.
23. Steinbeck MJ, Wyner LR. Ensayo inmunológico y principios relacionados. En Anderson S. y Cockayne S. *Química Clínica*. Ed. Interamericana Mc. Graw Hill. (1ª. Ed.) México. 1995:98-71, 94-108.
24. Woodrum DL, Brawer MK, Partin AW, et al. Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer. *J. Urol* 1998; 159:5-12.
25. Brawer MK, Kirby R. Prostate specific antigen. Fast facts. 1998:12. Health Press Limited. Oxford UK.
26. Pannek J, Rittenhouse HG, Chan DW, et al. The use of percent free prostate specific antigen for staging clinically localized cancer. *J. Urol* 1998; 159:1238-1248.
27. Oesterlig JE, Jacobsen SJ, Klee GG, et al. Free, complexed and total serum prostate specific antigen: The establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios. *J. Urol* 1995; 154:1090-1095.
28. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL. Evaluation of percentage of free serum prostate specific to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA* 1995; 274(15):1214-1220.
29. Keetch DW, Arcangeli CG, Shepherd DL, et al. Correlation of percent free PSA with pathologic features of prostatic carcinoma. *J. Urol* 1996; part 2, 155:45 A, abstract 420.
30. Abbott AxSYM System Operations Manual Volumen-1. 1996. Sección 3:1-6, 14-17.
31. Statland BE, Westward JO. Control de calidad: teoría y práctica. En Todd-Sanford-Davidsohn. *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*. John Bernard Henry. (8ª. Ed.) España. Editorial Salvat. 1988. Tomo I:103.
32. Castilla Serna Luis, Cravioto Joaquín. *Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud*. Ed. Trillas. México. 1991:129-131.