



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ESTUDIO PILOTO:
“EFECTO DEL TRANSFERON® COMO ADYUVANTE
AL TRATAMIENTO DE OSTEOSARCOMA”.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGÍA PRESENTA:

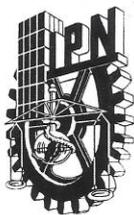
QBP. PAOLA CASTILLO JUÁREZ.

DIRECTORES:
DR. SERGIO A. ESTRADA PARRA.
M. en C. AZUCENA RODRIGUEZ FLORES.



MÉXICO, D.F.

2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14 BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F., siendo las 11:00 horas del día 13 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Estudio Piloto "Efecto del Transferon® como adyuvante al tratamiento de osteosarcoma"

Presentada por el alumno:

Castillo

Apellido paterno

Juárez

materno

Paola

nombre (s)

Con registro: A100168

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes:

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Sergio Antonio Estrada Parra

M. en C. Azucena Rodríguez Flores,

Dr. Miguel Aguilar Santelises

Dr. Rommel Chacón Salinas

Dr. Roberto González Guzmán

Dra. Jeanet Serafín López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. MANUEL JESÚS PIÑÓN LÓPEZ



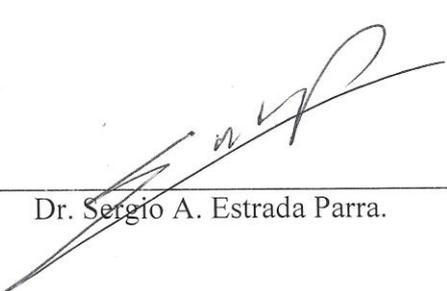


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

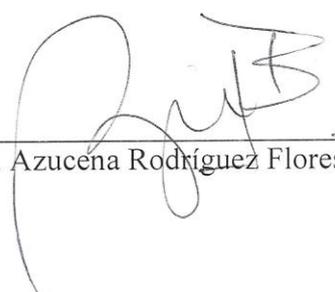
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D.F., el día 13 del mes de diciembre del año 2011, el(la) que suscribe Paola Castillo Juárez alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Inmunología con número de registro A100168, adscrito(a) a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Sergio A. Estrada Parra y M. en C. Azucena Rodríguez Flores y cede los derechos del trabajo intitulado Estudio piloto: "efecto del Transferon® como adyuvante al tratamiento de osteosarcoma", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo: qfiazu@hotmail.com y curieyoyos@yahoo.com.mx respectivamente. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Dr. Sergio A. Estrada Parra.



M. en C. Azucena Rodríguez Flores.



QBP. Paola Castillo Juárez.

El siguiente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología Molecular I del departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y en la unidad de tumores óseos del Instituto Nacional de Rehabilitación bajo la dirección del Dr. Sergio A. Estrada Parra y la M. en C. Azucena Rodríguez Flores, en colaboración del Dr. Genaro Rico Martínez, Dr. Roberto González Guzmán y el Dr. Antonio Roa Mendieta.

Este trabajo fue apoyado por el Proyecto Factor de Transferencia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

AGRADECIMIENTOS:

- A la planta de producción del Proyecto Factor de Transferencia, y al equipo de producción por la elaboración del Factor de Transferencia específico.
- Al personal del INR y a los doctores de esta institución.
- A los pacientes que noblemente aceptaron participar en este protocolo, mi más profundo respeto, admiración y agradecimiento.

A mi madre:

Fuente eterna de conocimiento, cariño, amor, confianza y fortaleza; gracias eternas por nunca soltar mi mano y alejar los temores de esta niña, gracias por ayudarme a conseguir un mundo lleno de victorias y alegrías, eres sin duda mi más grande maestro, espero no me faltes nunca, te amo Mombi.

A mis hermanas:

Compañeras de mil batallas, guía, compañía y guerreras inquebrantables, las amo gracias por estar en las buenas y en las malas, gracias por decirme que me merezco el mundo entero y sobre todo gracias por ayudarme a conseguirlo; Nani gracias por ser mi segunda madre, gracias por tu cariño y tus regaños, Blanquita, gracias por la ternura, los apapachos y las miles de sonrisas, Tata gracias por ser el oído que siempre me escucha, gracias por ser mi compañera de locuras.

A Beto:

Gracias por ser un padre para mí y acompañarme en muchos de los procesos de mi vida te quiero mucho.

Gracias a mi Tita por sus cuidados, a mis niños Rebe y Luis por ser fuente de inspiración para superarme.

A Ari:

Gracias por compartir conmigo la vida, todos los días me enseñas la maravillosa persona que eres, gracias por el arduo trabajo sin ti esto no hubiera sido posible te amo.

A Azucena:

Gracias por enseñarme a ser mejor persona, y apoyarme siempre, gracias por dejar las puertas del laboratorio siempre abiertas para mí.

Dr. estrada:

Gracias por el apoyo incondicional a este trabajo y por siempre tener una sonrisa para nosotros.

INDICE

	<i>Pág.</i>
<i>Abreviaturas.</i>	<i>i</i>
<i>Resumen</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<i>I. INTRODUCCIÓN.</i>	<i>1</i>
<i>1.1 Definición de osteosarcoma.</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Incidencia y epidemiología.</i>	<i>2</i>
<i>1.3 Clasificación.</i>	<i>2</i>
<i>1.4 Patogenia y factores etiológicos.</i>	<i>4</i>
<i>1.5 Métodos de diagnóstico.</i>	<i>6</i>
<i>1.6 Tratamiento empleado y pronóstico de vida.</i>	<i>6</i>
<i>1.7 Inmunoterapia.</i>	<i>7</i>
<i>1.8 Vacunas antitumorales.</i>	<i>8</i>
<i>1.9 Anticuerpos monoclonales.</i>	<i>8</i>
<i>II. RESPUESTA INMUNE CONTRA TUMORES.</i>	<i>10</i>
<i>2.1 Respuesta celular.</i>	<i>10</i>
<i>2.2 Papel de las citocinas proinflamatorias en el desarrollo tumoral.</i>	<i>12</i>
<i>III. FACTOR DE TRANSFERENCIA.</i>	<i>13</i>
<i>3.1 Definición:</i>	<i>13</i>
<i>3.2 Composición:</i>	<i>13</i>
<i>3.3 Actividad biológica y mecanismo de acción.</i>	<i>13</i>
<i>3.4 Interespecificidad del FT.</i>	<i>14</i>
<i>3.5 Usos clínicos.</i>	<i>14</i>
<i>3.6 Preparación y obtención del EDL.</i>	<i>16</i>
<i>IV. ANTECEDENTES.</i>	<i>17</i>
<i>V. JUSTIFICACIÓN.</i>	<i>18</i>

<i>VI. HIPÓTESIS.</i>	19
<i>VII. OBJETIVO GENERAL.</i>	20
<i>VIII. OBJETIVOS PARTICULARES.</i>	20
<i>IX. MODELO DE ESTUDIO.</i>	21
<i>9.1 Criterios de inclusión.</i>	22
<i>9.2 Criterios de exclusión.</i>	22
<i>9.3 Criterios de eliminación.</i>	22
<i>9.4 Grupos de estudio.</i>	22
<i>9.5 Administración de quimioterapia.</i>	23
<i>9.6 Administración de Transferon ®.</i>	23
<i>9.7 Análisis estadístico.</i>	23
<i>X. MATERIALES Y MÉTODOS.</i>	24
<i>10.1 Producción del factor de transferencia específico (FTe).</i>	24
<i>10.2 Toma de muestras clínicas y estudios de laboratorio.</i>	24
<i>10.3 Reactivos.</i>	24
<i>10.4 Metodología.</i>	26
<i>XI. RESULTADOS.</i>	29
<i>11.1 Clasificación en base a Levin.</i>	29
<i>11.2 Determinación de poblaciones linfocitarias post tratamiento.</i>	30
<i>11.3 Determinación de citocinas por el método de CBA.</i>	31
<i>11.4 Evaluación clínica.</i>	34
<i>11.5 Clasificación en base a Levin después del tratamiento.</i>	35
<i>11.6 Tiempo de supervivencia.</i>	36
<i>XII. DISCUSION.</i>	37
<i>XIII. CONCLUSIONES.</i>	41

INDICE DE FIGURAS.

	<i>Pág.</i>
<i>Figura 1. Imagen radiográfica de la metáfisis del fémur de un paciente con osteosarcoma.</i>	1
<i>Figura 2.- Osteoblastos tumorales, característicos en el estudio histopatológico. Técnica Hematoxilina Eosina.</i>	1
<i>Figura 3. Participación de poblaciones celulares en el control de desarrollo tumoral.</i>	11
<i>Figura 4. Participación de citocinas inflamatorias en el desarrollo de tumores.</i>	12
<i>Figura 5. Proceso de obtención del Factor de Transferencia.</i>	16
<i>Figura 6. Esquema general de trabajo.</i>	25
<i>Figura 7. Gráfica de puntos de poblaciones linfocitarias obtenidos por citometría de flujo.</i>	27
<i>Figura 8. Clasificación de Levin en pacientes con osteosarcoma antes de iniciar el tratamiento con FTe.</i>	29
<i>Figura 9. Clasificación de Levin en pacientes con osteosarcoma después de la administración de FTe.</i>	35
<i>Figura 10. Supervivencia global de pacientes con osteosarcoma después 2 años de seguimiento.</i>	36

INDICE DE TABLAS.

	<i>Pág.</i>
<i>Tabla 1. Clasificación de los tumores formadores de hueso en base a su severidad.</i>	2
<i>Tabla 2. Clasificación de los tumores propuesta el American Joint Committee on Cancer.</i>	3
<i>Tabla 3. Factores que intervienen en la regulación ósea.</i>	5
<i>Tabla 4. Características de los antineoplásicos comúnmente utilizados en quimioterapia, por su efecto citotóxico.</i>	9
<i>Tabla 5. Características fisicoquímicas e inmunológicas del Factor de Transferencia específico.</i>	15
<i>Tabla 6. Características de pacientes con osteosarcoma incluidos en el estudio.</i>	21
<i>Tabla 7. Número de leucocitos y células linfoides tipificadas en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de osteosarcoma.</i>	32
<i>Tabla 8. Determinación de citocinas séricas en pacientes con osteosarcoma a diferentes tiempos de tratamiento.</i>	33
<i>Tabla 9. Cuantificación de hemoglobina y fosfatasa alcalina en pacientes con osteosarcoma a diferentes tiempos del tratamiento.</i>	34

ANEXO 1.

<i>A. Resumen del procedimiento para analizar citocinas por CBA Inflammation KitBD.</i>	42
<i>B. Imágenes de paciente con metástasis pulmonar y lesión primaria en rodilla, véase la regeneración ósea después de 1 año.</i>	43
<i>C. Carta de consentimiento informado</i>	44

ABREVIATURAS

- **ADCC:** Citotoxicidad mediada por anticuerpos.
- **ATP:** Adenosina trifosfato.
- **BMPs:** Proteínas morfogenéticas óseas.
- **CBA:** Ensayo de citometría por perlas.
- **CD:** Determinante de grupo.
- **Células NK:** Células natural killer. (Asesinas Naturales).
- **CTL:** Linfocitos T citotóxicos.
- **DNA:** ácido desoxirribonucleico.
- **EDL:** Extracto Dializable de Leucocitos.
- **EGF:** El factor de crecimiento epidérmico.
- **FGF:** El factor de crecimiento fibroblástico.
- **FITC:** Isotiocianato de fluoresceína.
- **FL:** Fluorocromo.
- **FT:** Factor de Transferencia.
- **FTe:** Factor de Transferencia específico.
- **GH:** Hormona del crecimiento.
- **GM-CSF:** factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
- **IFN:** Interferón.
- **Ig:** Inmunoglobulina.
- **IGF-1:** Factor de crecimiento similar a insulina 1.
- **IGF-I y II:** Factor análogo a la insulina I y II.
- **IL-1:** Interleucina 1.
- **IL-1b:** Interleucina 1b.
- **IL-2:** Interleucina 2.
- **IL-6:** Interleucina 6.

- **IL-8:** Interleucina 8.
- **IL-10:** Interleucina 10.
- **IL-11:** Interleucina 11.
- **IL12p70:** interleucina 12.
- **INR:** Instituto Nacional de Rehabilitación.
- **LAK:** Células citotóxicas activadas con linfocinas.
- **LcTh:** Linfocitos T cooperadores.
- **LIF:** factor inhibitorio de Leucemia.
- **LMI:** Índice de Migración de Leucocitos.
- **M-CSF: Factor** estimulador de colonias de macrófagos.
- **MHC-I:** Moléculas de histocompatibilidad tipo I.
- **OPG:** Osteoprotegerina.
- **OPGL:** Ligando de Osteoprotegerina.
- **PDGF:** Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
- **PG:** Prostaglandinas.
- **PGE-2:** prostaglandina E2.
- **pRb:** Proteína Retinoblastoide.
- **RANK:** receptor activador del factor nuclear KB.
- **RANKL:** Ligando de RANK.
- **Rc:** Receptor.
- **RcTNF:** Receptor de factor de necrosis tumoral.
- **RNA:** Ácido ribonucleico.
- **TGF-β:** Factor de crecimiento transformante β.
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral.
- **VEGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial.

RESUMEN

Los osteosarcomas (OS) son tumores primarios de hueso que se derivan de las células osteoblásticas, con gran tendencia a la metástasis y una baja sobrevida en estadios avanzados que va de los 3 a 5 meses.

En este trabajo se realizó un estudio clínico y piloto, en doce pacientes con diagnóstico de OS en fases III y IV, con un rango de edad entre 7 a 36 años, de los cuales 7 son hombres (58.3%) y 5 mujeres (41.6%). El hueso más afectado fue el fémur con un 41.6%, seguido de la tibia con un 25%. A estos pacientes se les evaluó en sangre periférica el número de células CD3+, CD19+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, además se cuantificaron los niveles de citocinas séricas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF- α), de fosfatasa alcalina y hemoglobina, al inicio, tres y seis meses postratamiento.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto del tratamiento adyuvante con Transferón® a la quimioterapia, en la sobrevida y en los parámetros clínicos e inmunológicos de pacientes con osteosarcoma.

Los pacientes incluidos se dividieron en tres grupos: El grupo 1; de cuatro pacientes con presencia de metástasis, que recibió tratamiento de quimioterapia y adyuvante de Transferón® específico, el grupo 2; de 5 pacientes libres de metástasis, con tratamiento de quimioterapia mas adyuvante de Transferón® específico, y el grupo 3; de tres pacientes sin metástasis, que recibieron quimioterapia.

De la evaluación de sobrevida a los dos años de seguimiento, se observó que para el grupo 1; fue del 100%, en el grupo 2; del 80% y en el grupo 3; del cero por ciento con un desarrollo temprano de metástasis a los 6 meses de seguimiento en este grupo. Al relacionar estos resultados con los niveles séricos de fosfatasa alcalina observamos que en el grupo 3, hubo un aumento de la concentración de 582 U/L a 3362 U/L. En los grupos que recibieron tratamiento adyuvante de Transferon® específico, se observó una disminución de los valores de fosfatasa alcalina con respecto a sus valores iniciales de 557 a 227 U/L; en el grupo 1 y de 102 a 68 U/L; en el grupo 2.

En cuanto a los parámetros inmunológicos, se observó un comportamiento heterogéneo en los grupos de estudio, por lo que no podemos dar una conclusión definitiva al respecto. Sin embargo, podemos comentar de manera general que en el grupo 2, se observó una tendencia al aumento en el número de células CD3+CD8+ y CD16+CD56+. Clínicamente se reporta que los pacientes con presencia de metástasis que recibieron tratamiento adyuvante de Transferon se mantienen en el mismo estadio sin observar aparentemente nuevas lesiones metastásicas.

ABSTRACT

Osteosarcomas (OS) are primary bone tumors derived from osteoblastic cells, with great tendency to metastasis and low survival in advanced stages ranging from 3 to 5 months. In this paper we conducted a pilot clinical study in twelve patients with a diagnosis of OS in stage III and IV, with an age range from 7 to 36 years, of which 7 are males (58.3%) and 5 women (41.6 %). The most affected bone was the femur with a 41.6%, followed by humerus 25%. These patients were evaluated in peripheral blood the number of CD3 +, CD19 +, CD3 + CD4 +, CD3 + CD8 +, CD3-CD16 + CD56 + also quantified the levels of cytokines serum (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- α), alkaline phosphatase and hemoglobin at baseline, three and six months after treatment.

The goal of this study was to evaluate the impact of adjuvant Transferón® to chemotherapy on survival and clinical and immunological parameters of patients with osteosarcoma. The patients included were divided into three groups: group 1, four patients with metastases, who received chemotherapy and adjuvant Transferón® Specifically, the group 2 of 5 patients free of metastases with adjuvant chemotherapy more of specific Transferón®, and group 3, three patients without metastases, who received chemotherapy.

From the evaluation of survival at two years follow-up, it was observed that group 1 was 100% in group 2, 80% and in group 3, the zero percent with early development of metastases the 6 months follow up in this group. By relating these results with serum alkaline phosphatase levels observed in group 3, there was an increased concentration of 582 U / L to 3362 U / L. In the groups receiving adjuvant treatment of specific Transferon®, we observed a decrease in alkaline phosphatase values with respect to their initial values of 557 to 227 U / L, in group 1 and 102 to 68 U / L, in group 2.

Regarding the immunological parameters was observed heterogeneous behavior in the study groups, so that we can not give a definite conclusion about it. However, we can comment in general that in group 2, we observed an increasing trend in the number of CD3 + CD8 + and CD16 + CD56 +. Clinically it is reported that patients with metastases who received adjuvant treatment Transferon remain at the same stage without observing apparently new metastatic lesions.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Definición de osteosarcoma.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud; el **osteosarcoma** es un tumor óseo maligno primario en el que las células neoplásicas producen por lo menos pequeñas cantidades de material osteoide, con gran tendencia a la metástasis, en cualquier otro hueso, músculo o tendones cerca del tumor primario. Aunque se ha observado que en el 90% de los casos este se disemina hacia el pulmón (1).

En la figura 1 se observa una zona tejido osteoide abundante característico del osteosarcoma.



Figura 1. Imagen radiográfica de la metáfisis del fémur de un paciente con osteosarcoma (URL1).

La lesión macroscópica se caracteriza por una masa irregular que se extiende hacia la médula diafisaria. La célula común a todos los subtipos de Osteosarcomas es el osteoblasto tumoral (Figura 2). Hay gran cantidad de osteoide (tejido óseo inmaduro).

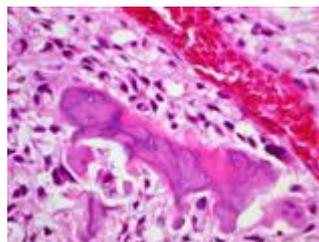


Figura 2.- Osteoblastos tumorales, característicos en el estudio histopatológico. Técnica Hematoxilina Eosina (URL2).

1.2 Incidencia y epidemiología.

Las principales neoplasias para los adolescentes de 15 – 19 años son los Tumores del Sistema Nervioso Central (10%), leucemias (10%), linfomas (25%) y tumores óseos entre los cuales destaca el osteosarcoma con una sobrevivida promedio 2 años en estadios iniciales de la enfermedad (2).

El Osteosarcoma se presenta generalmente en pacientes jóvenes en edades en desarrollo, comprendidas entre los 10 y 25 años, con predominio en el sexo masculino (1). Representa del 1 al 3 % de todos los tumores óseos de la infancia; su incidencia es de 7 casos por un millón de adolescentes por año (3). En México y Latinoamérica se diagnostican aproximadamente 1,500 casos nuevos de tumores óseos en niños cada año (4). La tumoración ósea suele localizarse en la porción distal (metáfisis) de huesos largos, siendo el fémur el más afectado, con una frecuencia que va de 40% a 50% de los casos, seguido de la tibia (con un 20% de los casos) y el húmero (10% a 15%) (5).

1.3 Clasificación:

El osteosarcoma se encuentra clasificado dentro de los tumores formadores de hueso; que a su vez se clasifican de acuerdo a su severidad; como se indica en la tabla 1 (3).

	Benignos	Intermedios	Malignos
Formadores de hueso	Osteoma Osteoma osteoide Osteoblastoma	Osteoblastoma agresivo	Osteosarcoma
Formadores de cartilago	Condroma Osteocondroma Condroblastoma Fibroma condromixioide		Condrosarcoma
Tumor de células gigantes			
Tumores de células redondas			Sarcoma de Ewing Linfoma maligno Mieloma Tumor neuroectodérmico
Tumores vasculares	Hemangioma Tumor glómico	Hemangioendotelioma Hemangiopericitoma	Angiosarcoma
Tumores derivados del tejido conectivo	Fibroma desmoplásico Fibrohistiocitoma benigno		Fibrosarcoma Fibrohistiocitoma maligno
Otros		Cordoma. Adamantimoma	

Tabla 1. Clasificación de los tumores formadores de hueso en base a su severidad (3).

Otras clasificaciones consideradas por la OMS, agrupan a estos tumores como primarios o *de novo* y secundarios; de acuerdo a su asociación con otras patologías; o basados en la localización del tumor se clasifican en centrales o medulares (localizados en la cavidad medular) y de la superficie (localizados en la superficie del hueso) (1).

En 1983, el American Joint Committee on Cancer estableció un sistema de estratificación para tumores malignos (Tabla 2). Este sistema se basa en cuatro criterios:

- La extensión del tumor primario (T): siendo T1 un tumor confinado a la cortical y T2 un tumor que la sobrepasa.
- La ausencia (N0) o presencia (N1) de adenopatías.
- La ausencia (M0) o presencia (M2) de metástasis a distancia.
- **El grado histológico:** subdividido en bien diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2), pobremente diferenciado (G3) o indiferenciado (G4). G1 y G2 son lesiones de bajo grado, y G3 y G4 de alto grado. Esta clasificación ha sido revisada en 2003, pasando a considerar en T el tamaño del tumor más que su localización: Los tumores menores de 8 cm se denominan T1 y los mayores de 8 cm pasan a designarse T2. Se crea una nueva categoría, T3, para lesiones con presencia de metástasis saltatorias.

Estadio	Tumor	Adenopatías	Metástasis	Grado
IA	T1	NO	M0	G1-2
IB	T2	NO	M0	G1-2
IIA	T1	NO	M0	G3-4
IIB	T2	NO	M0	G3-4
III	T3	NO	M0	Cualquiera
IVA	Cualquiera	NO	M1a	Cualquiera
IVB	Cualquiera	N1	Cualquiera	Cualquiera
IVB	Cualquiera	Cualquiera	M1b	Cualquiera

T0: No hay evidencia de tumor primario. T1: Tumor de 8 cm de diámetro mayor o menos. T2: Tumor mayor de 8 cm. N0: Ausencia de adenopatías. N1: Adenopatías regionales. M0: Ausencia de metástasis. M1a: Metástasis a pulmón. M1b: Metástasis en otras localizaciones. G1: Tumor bien diferenciado (bajo grado), G2: Tumor moderadamente diferenciado (bajo grado). G3: Tumor pobremente diferenciado (alto grado). G4: Tumor indiferenciado (alto grado)

Tabla 2. Clasificación de los tumores propuesta el American Joint Committee on Cancer.

1.4 Patogenia y factores etiológicos.

La etiología del osteosarcoma es desconocida, aunque se relaciona con 5 factores:

- Mutación en el gen p53: (el cual participa en el control del ciclo celular al activar proteínas capaces de reparar DNA dañado o bien al inducir la apoptosis en células cuyo DNA no puede ser reparado); está mutación puede deberse a una causa de origen viral.
- Radioterapia ionizante: se ha observado que incrementa el riesgo de desarrollar neoplasias; se documenta en pacientes que han recibido tratamiento con radioterapia (6).
- El uso de quimioterapia con agentes alquilantes (7).
- Relacionado con la proteína retinoblastoide (pRb): la alteración genética de esta proteína en los pacientes con retinoblastoma se localiza en el cromosoma 13q14, la cual corresponde a la misma alteración en pacientes con osteosarcoma, observándose que el osteosarcoma es la segunda neoplasia en infantes que han sufrido retinoblastoma.
- Diversos padecimientos a nivel óseo, como la enfermedad de Paget, enfermedad de Ollier y síndrome de Mafucci (5).
- Desregulación de moléculas del metabolismo óseo; algunos de las moléculas susceptibles a desregulación se mencionan en la tabla 3, así como el proceso en el que participan. Un ejemplo de esto es el aumento de interferón gamma que puede actuar como molécula inhibidora de osteoclastogénesis; proceso necesario para la resorción ósea que puede derivar en un proceso neoplásico (Tabla 3).

Tabla 3. Factores que intervienen en la regulación ósea.

	Estimulan formación	Estimulan reabsorción	Inhiben reabsorción
Factores de crecimiento	<p>BMP-2 (Proteína morfogenética ósea-2) BMP-4 (Proteína morfogenética ósea-4) BMP-6 (Proteína morfogenética ósea-6) BMP-7 (Proteína morfogenética ósea-7) IGF-I (factor análogo a la insulina I) IGF -II (Factor análogo a la insulina II) TGF-β (Factor transformante del crecimiento β). FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas). VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial).</p>	<p>TNF (Factor de necrosis tumoral) EGF (Factor de crecimiento epidérmico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas). FGF (Factor de crecimiento fibroblástico). M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos). GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos).</p>	
Citocinas		<p>IL-1 (Interleucina -1). IL-6 (Interleucina -6). IL-8 (Interleucina -8). IL-11 (Interleucina -11) PGE2 (Prostaglandina E-2). PGE1 (Prostaglandina E-1). PGG2 (Prostaglandina G-2). PGI2 (Prostaglandina I-2). PGH2 (Prostaglandina H-2)</p>	<p>IFN-γ (Interferón γ) IL-4 (Interleucina-4)</p>

1.5 Métodos de diagnóstico.

El diagnóstico de osteosarcoma se basa principalmente en:

- **La historia clínica:** las manifestaciones clínicas tienen una duración promedio de tres meses y son; dolor local, aumento del volumen del hueso afectado y neoformación vascular (5).
- **Exploración física:** dirigida a revisión del tumor (forma y tamaño) además de auscultaciones de campos pulmonares.
- **Estudios de imagen:** radiografía simple; tomografía axial computada, resonancia magnética nuclear y gammagrafía (8).
- **Estudio de citología:** punción aspiración con aguja fin e histopatología (9).
- **Estudios de laboratorio:** biometría hemática, química sanguínea con estudios de metabolismo óseo (determinación de la actividad la enzimas lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida).

Uno de los marcadores tumorales que se utilizan en el diagnóstico de Osteosarcoma es la determinación de fosfatasa alcalina, en el plasma o suero de un paciente normal se encuentra esta enzima, pero se encuentra elevada en enfermedades óseas caracterizadas por un aumento de la actividad osteoblástica. (10).

1.6 Tratamiento empleado y pronóstico de vida.

El tratamiento de osteosarcoma ha evolucionado desde la amputación o cirugía radical, hasta la introducción de la quimioterapia, pasando por el uso de radioterapia, con una mala respuesta a esta última ya que no es un tumor radiosensible (5).

El plan de tratamiento para los pacientes con osteosarcoma se puede resumir en:

- Quimioterapia neoadyuvante. En un número total de tres ciclos. Las principales ventajas de este son; la reducción del edema, disminución del tamaño del tumor y su vascularización y el efecto comprobado sobre las micrometástasis, este esquema se sigue antes de someter al paciente a cirugía; ya que el principal objetivo de este tipo de quimioterapia es la disminución del tamaño del tumor presente. (5). Se recomienda el uso de agentes citostáticos (Tabla 4) combinados a altas concentraciones.

- Cirugía: ablativa (amputación o desarticulación) o con preservación de miembro (resecciones amplias y reconstrucción con endoprótesis, injertos óseos).
- Quimioterapia post-operatoria: se realiza por un periodo aproximado de seis meses. La elección de los quimioterapéuticos depende de la respuesta histológica del tumor a la quimioterapia neoadyuvante (11).

Para cada esquema de tratamiento pueden utilizarse diversos agentes citostáticos (Tabla 4) con propiedades farmacológicas y características diferentes, el uso de cada uno dependerá del grado de severidad de la tumoración y el grado de respuesta en el paciente.

1.7 Inmunoterapia.

La principal razón de buscar una estrategia de base inmunológica, radica en el hecho de que las terapias actuales contra el cáncer, dependen de fármacos que destruyen las células en división o bloquean la división celular, y estos tratamientos tienen graves efectos sobre las células normales en proliferación de los pacientes con cáncer, como consecuencia de esto, el tratamiento causa una importante morbimortalidad.

La respuesta inmune a los tumores puede ser específica a los antígenos tumorales y no dañar a la mayor parte de las células normales; por consiguiente, la inmunoterapia tiene el potencial de ser el tratamiento con mayor especificidad hacia el tumor; gracias a las ventajas de la inmunoterapia y las características del Factor de Transferencia (que serán vistas a detalle más adelante) se propone a este como un buen candidato en la terapia adyuvante a la quimioterapia.

Existen diversas investigaciones que indican que la inmunoterapia con productos derivados o que actúan directamente sobre las células que participan en la inmunidad tumoral puede ser una opción para el tratamiento del cáncer. Sin embargo muchos de ellos aún se encuentran en investigación.

A continuación se presentan algunos de los tratamientos inmunológicos:

1.8 Vacunas antitumorales.

Se basan en el uso de células tumorales muertas, con el objetivo de generar una respuesta celular específica mediada por linfocitos T, también se ha tratado de hacer más eficiente la respuesta celular en contra del tumor, mediante la administración de células dendríticas purificadas, procedentes del mismo paciente e incubadas con antígenos tumorales o transfectadas con genes que codifican antígenos tumorales (12).

1.9 Anticuerpos monoclonales.

Esta tiene como objetivo dirigir selectivamente el tratamiento antitumoral hacia antígenos presentes específicamente en las células tumorales. Uno de los problemas asociados al uso de anticuerpos monoclonales, es la proliferación de células tumorales que han perdido el antígeno contra el que el anticuerpo actúa, por lo que ya no son reconocidas por dichos anticuerpos (1).

Tabla 4. Características de los antineoplásicos comúnmente utilizados en quimioterapia, por su efecto citotóxico (37, 37).

QUIMIOTERAPEUTICO	PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	EFFECTOS SECUNDARIOS.
Ciclosfamida	Oxafosforina de acción citostática basada en la ruptura de la doble hélice de DNA. En el ciclo celular se hace más corta la fase G2.	Mielosupresión, estreñimiento, anorexia, cistitis, microhematuria, azoospermia, oligospermia, fibrosis pulmonar crónica, pancreatitis aguda.
Doxorrubicina	Antraciclina que se acopla a aminoazúcares; ejerciendo su acción citotóxica mediante la formación de radicales libres, incrementa la fragmentación de DNA e inhibe la síntesis de ácidos.	Trombocitopenia, anemia, hipoxia tisular, hemorragia, leucemia mielogena aguda, hepatomegalia, derrame pleural, edema pulmonar, disfunción ventricular, alopecia, hiperpigmentación de piel y uñas.
Sulfato de vincristina	Alcaloide vinca, obtenido de la planta pervinca, detiene el ciclo celular en metafase, por lo tanto bloquea la cariocinesis, también interfiere en el metabolismo de los aminoácidos.	Hipersensibilidad, coprostasis, anorexia, vómito, hipertensión, infarto al miocardio, ataxia, coma, neuropatía motora, ceguera, atrofia óptica, leucopenia, trombocitopenia.
Cisplatino	Metal pesado, perteneciente a los complejos de coordinación del platino, aumenta las especies reactivas del oxígeno y peróxido orgánico, inactivando las enzimas antioxidantes.	Toxicidad renal, pérdida de audición, mielodepresión, náusea, vómito, anorexia, edema facial disnea, taquicardia.

II. RESPUESTA INMUNE CONTRA TUMORES.

2.1 RESPUESTA CELULAR:

A) Linfocitos T citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺)

El principal mecanismo de inmunidad tumoral son los CTL (linfocitos T citotóxicos) que llevan a cabo la destrucción de células tumorales, esta subpoblación linfocitaria desempeña su función de vigilancia reconociendo y destruyendo células con malignas que expresan péptidos derivados de proteínas celulares mutantes o de proteínas de virus oncogénicos, que son presentadas en asociación con las moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) (14).

B) Linfocitos T cooperadores (CD3⁺ CD4⁺)

Desempeñan su función antitumoral produciendo citocinas (como la interleucina-2) que colaboran con el desarrollo y diferenciación de los CTL. Además las células T cooperadoras específicas a antígenos tumorales pueden secretar citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), interferón gamma (IFN- γ); que pueden aumentar la expresión de moléculas de clase I (MHC- I) por la célula tumoral y aumentar la capacidad citolítica de los CTL. Es posible también que el IFN- γ active macrófagos para destruir a las células tumorales (14).

C) Respuesta inmune humoral.

Los anticuerpos son inmunoglobulinas que participan en la respuesta inmune de tipo humoral.

En el caso de los portadores de tumores pueden producir anticuerpos contra diversos antígenos tumorales; dichos anticuerpos pueden destruir a las células tumorales activando el complemento o mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, en las que las células NK y macrófagos portadores de receptores Fc median la destrucción de las células tumorales (14).

D) Células NK (asesinas ó citotóxicas naturales).

Las células NK destruyen muchos tipos de células tumorales, especialmente células que tienen una expresión de moléculas del MHC reducidas, que pueden escapar de la lisis por los CTL (14).

Las células NK responden a la ausencia de MHC - I; ya que el reconocimiento de esta molécula suministra señales inhibitorias para las células NK; algunos tumores pierden la expresión de moléculas de las clase I de MHC, quizá a consecuencia de la selección contra células que expresan MHC de clase I por los CTL, esta alteración inmunológica hace que los tumores sean dianas adecuadas para las células NK (14); o bien las células NK expresan el receptor FcγIII (CD16), el cual tiene la capacidad de unirse a moléculas de IgG que se encuentren recubriendo células; de esta manera, la IgG facilita la lisis mediada por las células NK, fenómeno conocido como ADCC. El FcγRIII es un receptor de baja afinidad que se une a moléculas de IgG que se encuentran agrupadas en la superficie de las células blanco, pero que no tiene capacidad de unirse a la IgG libre, lo cual asegura la activación de las células NK sólo en el momento requerido. Esta interacción del FcγRIII con las células cubiertas con IgG activa la síntesis y secreción de citoquinas en las células NK, particularmente IFN-γ, y al mismo tiempo induce la degranulación de la célula NK que está en contacto con la célula blanco, provocando la muerte de la célula blanco (14).

La capacidad tumoricida de las células NK aumenta por el efecto de citocinas como los interferones, la Interleucina 12 e Interleucina 2, produciendo células citocidas activadas por linfocinas (LAK), cuya actividad citolítica y especificidad al tumor es mayor que las células NK (15).

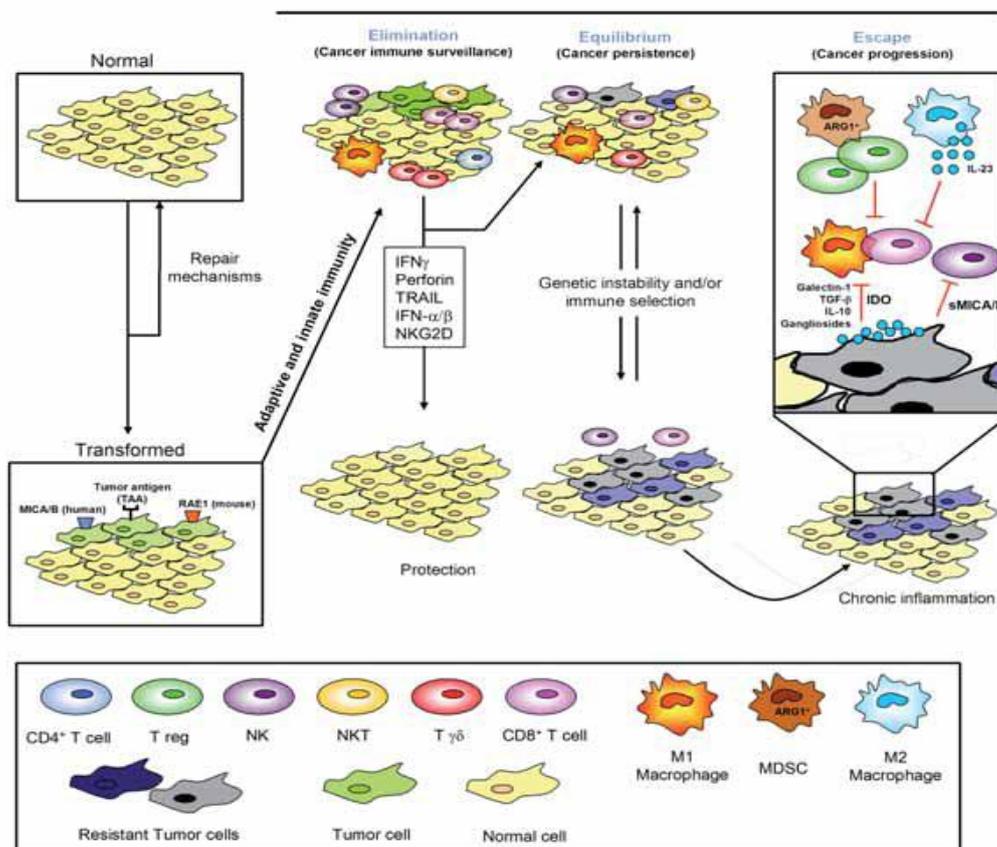


Figura 3. Participación de poblaciones celulares en el control de desarrollo tumoral (39).

2.2 Papel de las citocinas proinflamatorias en el desarrollo tumoral.

Desde 1863, cuando Virchow observó por primera vez infiltrados de leucocitos en tejidos tumorales, se ha ido acumulando evidencia que demuestran que en sitios de inflamación crónica existe una mayor probabilidad de favorecer el desarrollo de un tumor (16, 17). Otras investigaciones demuestran que los procesos inflamatorios locales promueven el crecimiento de algunos cánceres humanos previamente establecidos, como los tumores colo-rectales, hepatocelulares y de cuello de útero (18). En otros estudios se observa que la mayoría de los tumores generan un ambiente pro-inflamatorio compuesto de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y agentes que inducen daño en el ADN, lo cual podría ampliar un proceso inflamatorio preexistente que a su vez generaría un mayor crecimiento y malignidad del tumor (19).

Estudios recientes han demostrado la estrecha relación entre el microambiente citocínico y la evolución clínica de los tumores; relacionando el aumento de los niveles séricos de citocinas proinflamatorias como; IL- 8, IL-10, IL-6 y TNF- α , y un alto grado de malignidad tumoral con el desarrollo de metástasis, por lo que se le relacionó con un pronóstico clínico (20).

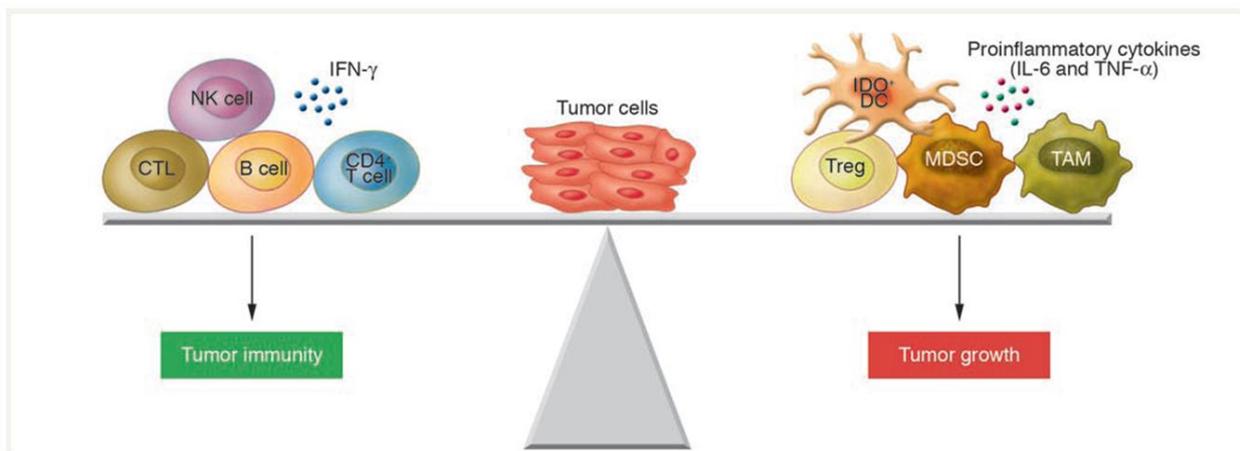


Figura 4. Participación de citocinas inflamatorias en el desarrollo de tumores (40).

III. FACTOR DE TRANSFERENCIA.

3.1 Definición:

El Factor de Transferencia (FT) es un inmunomodulador presente en el **extracto dializado de leucocitos (EDL)** que se ha utilizado con éxito en enfermedades en donde se encuentra alterada la respuesta inmune.

3.2 Composición:

El componente activo en el extracto de leucocitos fue llamado **Factor de transferencia (FT)** por su capacidad de transferir la inmunidad celular. En 1959 Lawrence demostró que la transferencia de sensibilidad no se alteraba si el FT se trataba con DNasa, RNasa pancreática, por lo que se dedujo que no se trataba de DNA o de RNA. Inicialmente se pensó que el FT era la única sustancia activa presente en dicho dializado, por lo que a los extractos se les denominó de esta manera, aunque más tarde se demostró que el EDL contiene más de 200 diferentes sustancias químicas con posible actividad biológica (21); dentro de las cuales destaca la presencia de histamina, prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, factores de maduración de células T (timosina), que contribuyen en mucho en su efectividad terapéutica.

3.3 Actividad biológica y mecanismo de acción.

Existen varias hipótesis acerca del modo de actuar del EDL para transferir la inmunidad celular específica de un donador inmune a un receptor no inmune. Además se han observado otros efectos que se originan como consecuencia de la actividad del FT en pacientes; algunos son la producción de algunas citocinas y quimiocinas, (como RANTES e IFN- γ) la activación de linfocitos y el incremento en la citotoxicidad mediada por linfocitos T. En cuanto a las otras sustancias presentes en el EDL además del FT, se cree que tienen **actividad potenciadora** independiente del antígeno; dichas sustancias son: prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, histamina, factores de maduración de células T; hormonas tiroideas; a las cuales se les ha atribuido algunos de los efectos del FT. Algunas de las hipótesis acerca del mecanismo de acción del FT es que se ha observado aumento en el número de células T en pacientes con inmunodeficiencia; acumulación de guanosina monofosfato en leucocitos mononucleares y aumento de la respuesta de células T a mitógeno (22). De acuerdo con todos estos efectos inmunológicos observados a lo largo de la historia del FT los investigadores han propuesto algunas de las hipótesis acerca de su mecanismo de acción, todas ellas basadas en su aplicación clínica.

La propuesta por Borkowsky y Lawrence se basa en el hecho que el Factor de transferencia posee dos actividades inmunorreguladoras opuestas; la primera antígeno específica, en la cual se confiere reactividad sobre células inmunes contra un antígeno en particular y en la segunda funciona como potenciador no específico independiente de antígeno. Sin embargo, ninguna de estas dos acciones puede estar asociada con un compuesto único, de aquí que el Factor de transferencia tiene incluidas dos funciones, una con actividad específica de antígeno cuya función es inductora-cooperadora; llamada factor inductor y otra que posee actividad supresora y ambas residen en la fracción con PM mayor a 3500 Da y menor a 12 000 Da. (23). Kirkpatrick, propuso un modelo que sugiere que el FT contiene la información instruccional o genética, específica para generar en células no sensibles, la capacidad de responder a ciertos antígenos; otro modelo propuesto menciona que el FT funciona desreprimiendo células anérgicas previamente sensibilizadas.

Una de las hipótesis basada en la interacción célula-célula durante una respuesta inmune propuesta por Borkowsky, en 1983 acerca del mecanismo de acción del FT enuncia que el FT solo es activo cuando se tiene una respuesta anormal (exceso o deficiencia de la respuesta inmune) por lo que aumenta o suprime respuestas antígeno específicas.

3.4 Interespecificidad del FT.

Diversos estudios han demostrado que el FT puede ser utilizado en especies animales diferentes del que fue obtenido, tal es el caso de FT bovino utilizado para transferencia de inmunidad en aves (24), o el uso de FT porcino aplicado a un modelo de resistencia a *Listeria* en ratón (25). Vlastimil y colaboradores en 1999, realizaron un estudio donde se compara el efecto de FT humano y porcino mostrando que tienen efectos similares.

3.5 Usos clínicos.

El EDL fue utilizado con fines terapéuticos hasta fines de los 60's y principios de los 70's y aún en la actualidad a pesar de sus beneficios evidentes en algunos casos causa escepticismo, debido a la carencia de un modelo estructural que defina sus características químicas, así como su mecanismo de acción. Sin embargo, hasta la fecha se ha utilizado con gran éxito en una amplia gama de enfermedades que van desde padecimientos infecciosos, inmunodeficiencias, autoinmunidad e hipersensibilidades y como adyuvante en algunas neoplasias (26). De los usos clínicos más exitosos es la respuesta de los pacientes con herpes zóster y coccidiodomicosis, en donde se ha utilizado como único tratamiento (27).

Tabla 5. Características fisicoquímicas e inmunológicas del Factor de Transferencia específico. (38).

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS	CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS
<ul style="list-style-type: none"> Polipéptido con peso molecular de 5 KD . 	<ul style="list-style-type: none"> Capacidad de transferir hipersensibilidad retardada.
<ul style="list-style-type: none"> Sensible a carboxipeptidasa A y fosfodiesterasa I. 	<ul style="list-style-type: none"> Es específico de antígeno.
<ul style="list-style-type: none"> Resistente a RNAsas, DNAsas, fosfodiesterasa II y aminoleucina peptidasa. 	<ul style="list-style-type: none"> Interactúa con el antígeno.
<ul style="list-style-type: none"> Moléculas hidrofílicas de alta polaridad, por lo que es altamente soluble en agua y fácil de dializar. 	<ul style="list-style-type: none"> No presenta antígenos de histocompatibilidad.
<ul style="list-style-type: none"> Se cree que su estructura está formada por pequeños péptidos unidos a un ribonucleótido que forma un oligoribonucleo-péptido. 	<ul style="list-style-type: none"> Presenta un factor inductor y uno supresor.
<ul style="list-style-type: none"> Lábil al calor, pero muy estable al frío (temperaturas de -20 a -70 °C) 	<ul style="list-style-type: none"> No presenta propiedades de anticuerpo.

3.6 Preparación y obtención del EDL.

El Factor de Transferencia se prepara de acuerdo al método descrito por Lawrence (21) se obtiene de órganos y tejidos linfoides o de una unidad de sangre de un donador sano previamente seleccionado, de éstos se separa el paquete de leucocitos (aproximadamente un total de 5×10^8 células). Mediante métodos físicos se logra la separación de las sustancias contenidas en el paquete de leucocitos, a través de un proceso mecánico se busca separar todas las moléculas con un tamaño menor de 10 - 12 KDa, por lo que se asegura la ausencia de contaminantes mayores como protozoarios, hongos microscópicos, bacterias, virus y priones, así como complejos de histocompatibilidad. En seguida se toman muestras del EDL para someterlo a pruebas de esterilidad, seguridad y pirógenos. Por consenso internacional se ha establecido que una unidad internacional (UI) de EDL es la que se obtiene de 5×10^8 leucocitos humanos, actualmente en el laboratorio de fabricación de biológicos de la ENCB-IPN se dosifica en base a la concentración de proteínas totales, considerando una unidad de EDL lo correspondiente a 2.2 mg/5ml. Su presentación puede ser en solución cuya administración es por vía oral o liofilizado y su administración es por vía parenteral.

Para la obtención del Factor de Transferencia específico el paquete de leucocitos (obtenidos de la misma forma que el Factor de Transferencia no específico) es sometido a diversas pruebas con el antígeno de interés y son seleccionadas aquellas células que responden de manera específica; para dicha selección se realiza el ensayo del LMI (Índice de Migración de Leucocitos); la cual tiene como fundamento la producción de LIF por parte de los linfocitos normales en respuesta a un determinado antígeno, trayendo como consecuencia del efecto de LIF la prevención o reducción de la migración de leucocitos. Este ensayo se utiliza para el diagnóstico de defectos en la inmunidad celular y para la selección de donadores sensibilizados.



Figura 5. Proceso de obtención del Factor de Transferencia (21).

IV. ANTECEDENTES

En 1975 Levin reporta el resultado de la administración de Factor de Transferencia específico a 18 pacientes de edades entre los 10 y 51 años, después del tratamiento quirúrgico; observando en pacientes con osteosarcoma primario sin metástasis, diferencia significativa en la supervivencia y en la respuesta inmune celular de tipo citotóxica; comparando con pacientes que recibieron Factor de Transferencia no específico.

En este trabajo Levin hace una clasificación del osteosarcoma en base al tipo de respuesta inmune y el grado de avance de la lesión primaria de los pacientes, por lo que los divide en IV fases:

Fase I: Son los pacientes que presentan tumoración primaria pequeña, con ausencia de lesión de tipo metastásica, con niveles normales de linfocitos totales y linfocitos T en sangre periférica y su respuesta inmune citotóxica es alta.

Fase II: Son pacientes que presentan tumores primarios grandes, con ausencia de lesión metastásica, valores normales de linfocitos T y linfocitos totales, pero con una marcada disminución o pobre respuesta citotóxica.

Fase III: Los pacientes presentan lesión primaria grande sin lesión metastásica localizada con baja población de linfocitos T en sangre periférica, y una respuesta citotóxica disminuida.

Fase IV: Pacientes con lesión primaria grande y evidencia de lesión metastásica, con una respuesta citotóxica muy disminuida ó nula, con bajos niveles de linfocitos T y totales. Por lo que estos pacientes no presentan una respuesta inmune de tipo celular efectiva en contra del tumor (28).

A manera de conclusión este trabajo describe que existe desventaja en pacientes con metástasis y masas tumorales muy grandes, limitando así la eficacia del FTe. Mientras que en pacientes clínicamente libres de metástasis son buenos candidatos para la inmunoterapia.

V. JUSTIFICACIÓN.

Los tumores óseos son considerados como una de las neoplasias de mayor agresividad por su tendencia a la producción de metástasis con una sobrevida baja y dado que en trabajos previos observamos que en pacientes con este padecimiento existe una disminución del número de células T, CD3+ CD8⁺ y CD3+ CD4⁺ en sangre periférica, y que el tratamiento con Transferon® como terapia adyuvante incrementó el número de estas células; se hace necesario explorar si este aumento se mantiene por largo tiempo y si existe correlación clínica con este aumento.

VI. HIPÓTESIS

Si a los pacientes con osteosarcoma se les administra Transferon® como inmunomodulador además del tratamiento convencional de quimioterapia y cirugía, entonces en estos pacientes se modificará de manera benéfica el número de células que participan en la respuesta inmune y la producción de citocinas por parte de dichas células; retardando la presencia de metástasis.

VII. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el impacto del uso de Transferón® como adyuvante a la terapia convencional; sobre la evolución clínica, inmunológica y la sobrevida de pacientes con osteosarcoma.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el pronóstico y calidad de vida en los pacientes a seis meses y un año después del tratamiento.
- Cuantificar el número de linfocitos T, Th, T citotóxicos, B y NK en pacientes con osteosarcoma; al inicio durante y al final del tratamiento (seguimiento de 2 años).
- Cuantificar las citocinas séricas de tipo inflamatorio (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α). En pacientes con osteosarcoma al inicio durante y al final del tratamiento (seguimiento de 2 años).
- Evaluar los niveles de hemoglobina al inicio durante y al final del tratamiento; en pacientes con osteosarcoma.
- Evaluar los niveles de fosfatasa alcalina al inicio durante y al final del tratamiento; en pacientes con osteosarcoma.
- Determinar el tiempo de sobrevida después del tratamiento.

IX. MODELO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio clínico, experimental, longitudinal durante dos años de seguimiento a pacientes con y sin presencia de metástasis, con edades entre los catorce y treinta y seis años, diagnosticados con osteosarcoma, para este estudio se contó con un total de 12 pacientes cuyas características se resumen en la tabla 6.

21

Tabla 6. Características de pacientes con osteosarcoma incluidos en el estudio.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	
	MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTANDAR / PORCENTAJE
EDAD	20 \pm 6.2 años
SEXO	
MASCULINO	7 (58.3 %)
FEMENINO	5 (41.6 %)
ESTADO DEL TUMOR	
PRIMARIO	12 (100 %)
RECURRENTE	0 (0 %)
LOCALIZACIÓN	
FÉMUR	41.6 %
TIBIA	25 %
HÚMERO	8.3 %
OTROS	8.3%
ESTADO DE ENFERMEDAD	
METÁSTASIS	4 (33.3%)
NO METÁSTASIS	8 (66.6%)

9.1 Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de osteosarcoma corroborado por histología, gammagrafía, radiología y clínicamente.
- Pacientes que hayan aceptado participar en el protocolo, mediante la firma del formato de consentimiento otorgado por el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). O en caso de ser menor de edad, firmado por sus padres o tutor.

9.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes con síndrome de mala absorción.
- Pacientes con insuficiencia renal crónica.
- Pacientes con problemas psiquiátricos.
- Pacientes con cáncer de diferente tipo histológico.
- Pacientes con HIV y enfermedades autoinmunes.
- Pacientes que no firmen el consentimiento de participación.

9.3 Criterios de eliminación:

- Pacientes que abandonen el tratamiento propuesto por el INR en el servicio de Tumores Óseos.
- Pacientes que no se apeguen al tratamiento con Transferon®.
- Pacientes que decidan no continuar en el protocolo.

9.4 Grupos de estudio:

Dichos pacientes fueron divididos en tres grupos:

Grupo 1: (n=4) pacientes con metástasis, que recibieron quimioterapia + Transferon®.

Grupo 2: (n=5) pacientes sin metástasis que recibieron quimioterapia + Transferon®.

Grupo 3: (n=3) pacientes libres de metástasis que solo recibieron quimioterapia como tratamiento.

9.5 Administración de quimioterapia:

La quimioterapia recibida constó de ciclos de cisplantino, adriamicina e ifosfamida, con dosis .ajustadas de acuerdo a su peso y edad. Los ciclos de quimioterapia fueron programados a 1 ciclo por mes, cada ciclo con duración de 3 días.

23

9.6 Administración de Transferon®:

Se administraron 60 unidades de Factor de transferencia específico vía oral durante los primeros 6 meses de tratamiento, con dos dosis de mantenimiento por semana a lo largo de 2 años de seguimiento y dependiendo de su evolución clínica.

9.7 Análisis estadístico:

Los datos obtenidos se analizaron por una prueba estadística no paramétrica (anova de muestras de repetición) que nos permitió comparar la respuesta de cada paciente a diferentes tiempos del tratamiento y en los diferentes grupos de estudio, con una $p < 0.05$ y un intervalo de confianza del 95%.

Para el análisis del porcentaje de sobrevida se realizó una prueba de Mantel-Cox, que permite evaluar la eficacia de un tratamiento en dos poblaciones separadas.

Las pruebas estadísticas y las gráficas que se muestran en este trabajo fueron hechas con Graph Pad Prism 5.0.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Producción del factor de transferencia específico (FTe).

El FTe se elaboró con el apoyo del personal de la planta de Fabricación de biológicos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (PROYECTO FACTOR DE TRANSFERENCIA), a partir de la selección de los leucocitos humanos que responden a los antígenos tumorales provenientes de la parte anatómica del paciente donde se presenta el tumor, biopsia que previamente fue tipificado por los histopatólogos como osteosarcoma (en la unidad de Histopatología del INR).

10.2 Toma de muestras clínicas y estudios de laboratorio:

Se tomaron muestras sanguíneas de los participantes en este estudio por punción venosa obteniendo un volumen de 10 ml con anticoagulante se realizó la determinación de poblaciones linfocitarias; a partir de plasma obtenido de tubos con heparina como anticoagulante y después conservados a 4°C se determinó la presencia de citocinas proinflamatorias por citometría de flujo, la cuenta total de leucocitos en cámara de Neubauer, así como la cuenta diferencial de leucocitos con tinción de Wright. Por su parte el personal del INR realizará las pruebas de gabinete en donde se incluyen la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina y concentración de hemoglobina, además de estudios de imagenología.

10.3 Reactivos:

Para la cuenta total de leucocitos se utilizó solución de Turk. "FLUKA", para la cuenta diferencial se usó colorante de Wright- Giemsa. (HYCEL), para la tinción de poblaciones linfocitarias se utilizó BD Simultest™ IMK-Lymphocyte ; en cuanto a la determinación de citocinas se utilizó un Human Th1/Th2 Cytokine Kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) de BD Biosciences y los resultados fueron analizados en un Citofluorometro FACSCalibur (Becton Dickinson San José CA, USA) equipado con un programa Cell Quest Pro. Versión 5.2.1.

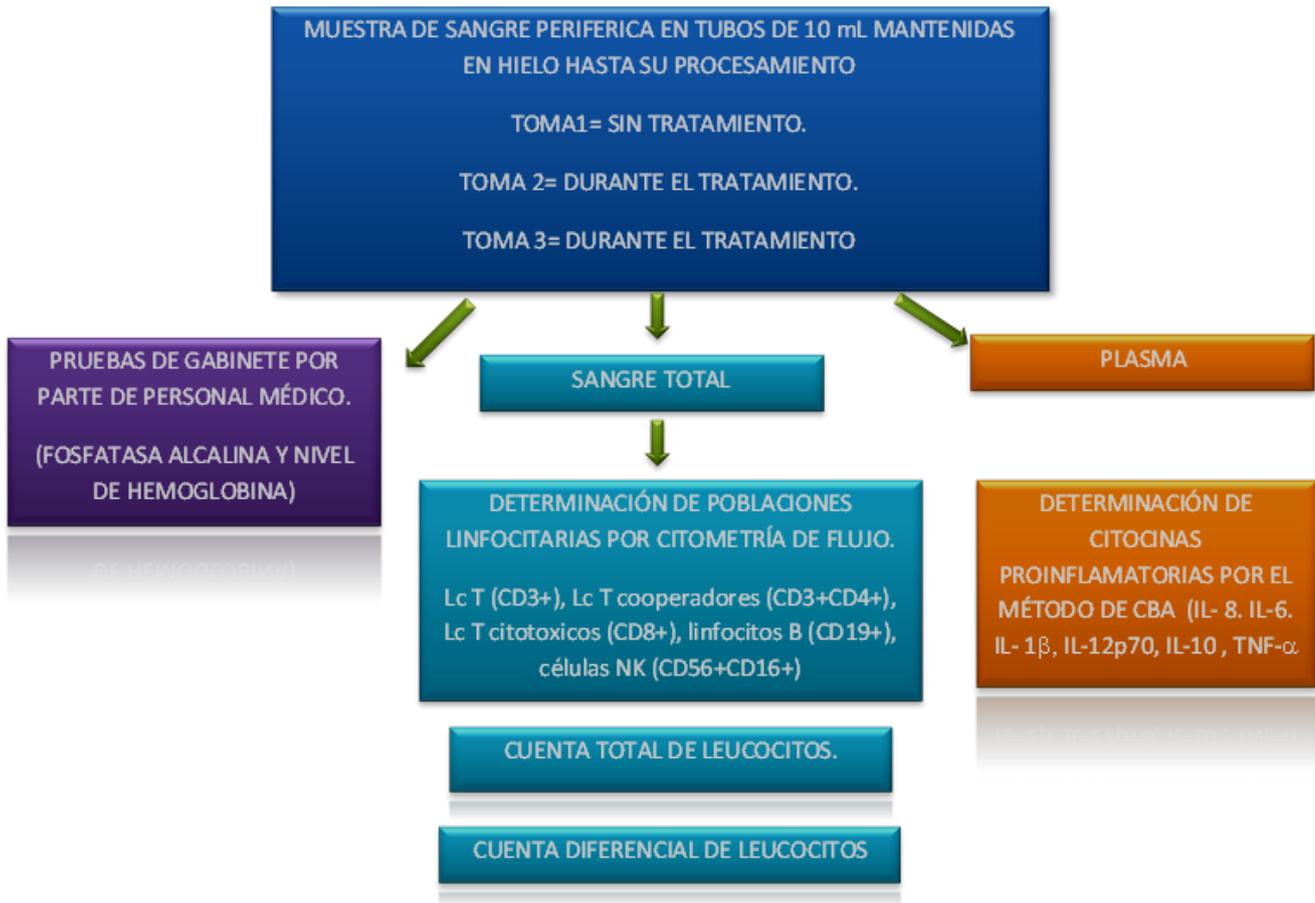


Figura 6. Esquema general de trabajo.

10.4 Metodología.

A) Determinación de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, por tinción directa.

Se evaluaron las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias por medio de análisis de citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales (conjugados a diferentes fluorocromos) por medio de una tinción de superficie directa, comparando la intensidad de fluorescencia producida por la detección de señales de dispersión de la luz láser y emisión de fluorescencia del citómetro de flujo.

La tinción se realizó de la manera siguiente:

Se colocaron 30 μ L de sangre heparinizada del paciente y 5 μ l de anticuerpos fluoresceinados; dirigidos a diferentes moléculas presentes en las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, de la siguiente manera:

- TUBO 1: anti- γ 1 PE/ anti- γ 2 FITC.
- TUBO 2: anti-CD3 FITC (Lc T) + anti CD 19 PE (Lc B).
- TUBO 3: anti-CD3 PercP + anti-CD4 FITC (Lc Th).
- TUBO 4: anti-CD3 PercP + anti-CD8 FITC (Lc Tc).
- TUBO 5: anti-CD3 PercP + anti-CD56, CD16 PE (NK).

B) Análisis por citometría de flujo.

La identificación de los linfocitos totales (CD3⁺) , linfocitos T cooperadores (CD3⁺CD4⁺), citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) , células NK (CD56⁺) y linfocitos B (CD19⁺) se realizó por medio de citometría de flujo en un equipo FACS-Calibur de BD y se analizó con el Software CellQuest Pro de BD, las gráficas de puntos resultantes de este análisis se muestran en la figura 7 .

Figura 7 A; se presenta la imagen en puntos de una muestra de sangre total, en la que el eje de las "X" representa el tamaño celular (FSC) y en el eje de las "Y" la complejidad o granularidad citoplásmica (SSC), de acuerdo al tamaño y a la forma del núcleo nosotros podemos identificar la región de los linfocitos y PMN (polimorfonucleares), en este gráfico se seleccionó la población de linfocitos y a partir de esta región se realizó la identificación de las subpoblaciones linfocitarias de acuerdo a los marcadores de superficie específicos y fluorescentes, para lo cual se incluyó un control negativo (7 B) denominado como isotipo, en donde se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra Ig de ratón conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y a ficoeritrina (PE).

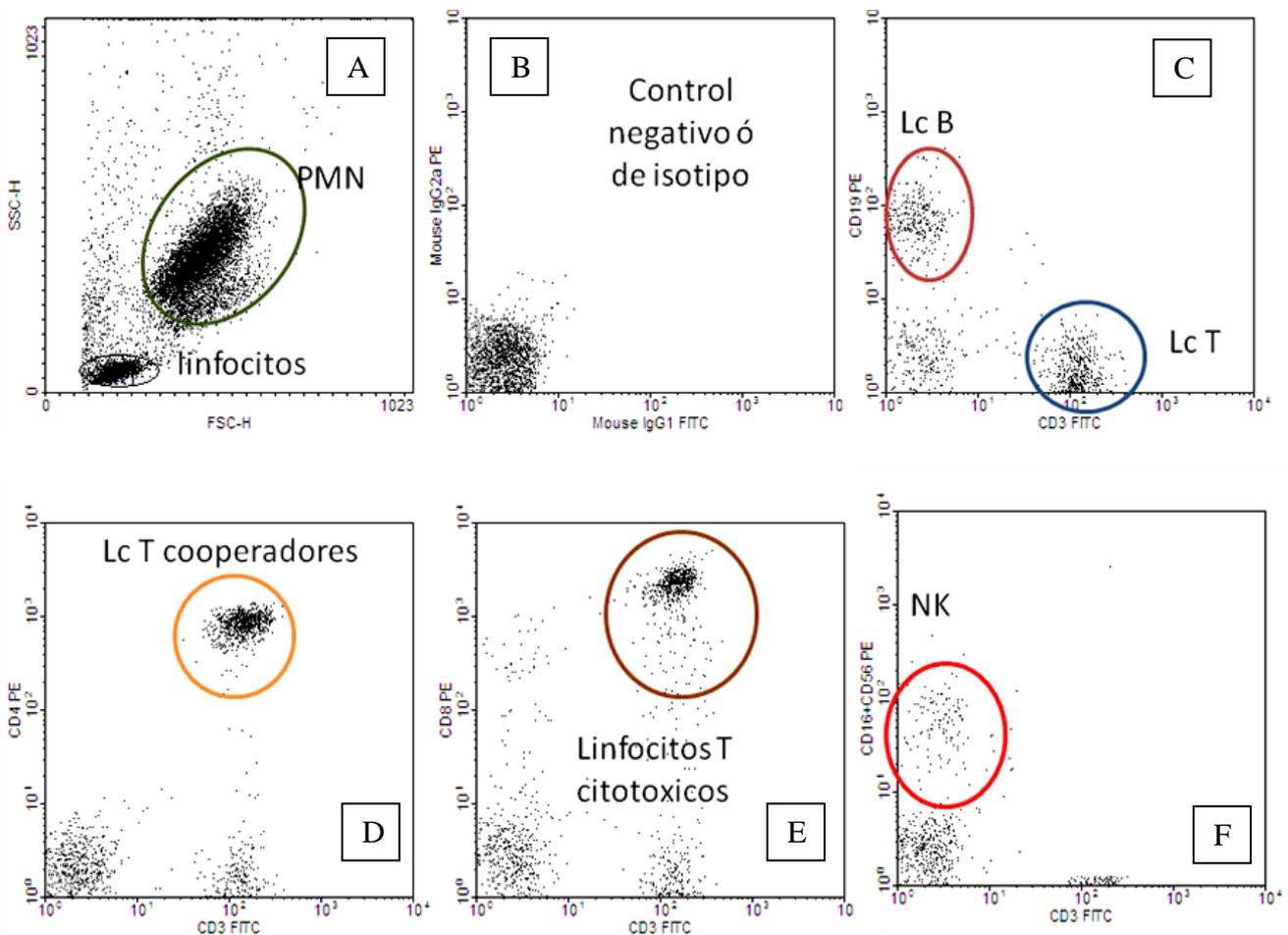


Figura 7. Gráfica de puntos de poblaciones linfocitarias obtenidos por citometría de flujo, realizando tinción directa para cada uno de los marcadores diferenciales de población.

C) Determinación de citocinas por CBA:

La determinación de citocinas IL-8, IL1b, IL-6, IL-10, IL-12p70 y TNF en suero se realizó de acuerdo a la metodología del kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) kit para citocinas humanas inflamatorias (ver anexo 1 A). con los siguientes límites de detección para cada una de las siguientes citocinas: IL-8: 3.6 pg/mL, IL-1β: 7.2 pg/mL, IL-6: 2.5 pg/mL, IL-10: 3.3 pg/mL, TNF: 3.7, IL-12p70: 1.9 pg/mL.

D) Cuenta diferencial de poblaciones leucocitarias.

Partiendo de una gota de sangre periférica con heparina o EDTA se realizó un extendido en portaobjetos, y este fue teñido con la técnica de Wright y Giemsa para su posterior lectura al microscopio óptico en el objetivo 100x a inmersión.

E) Cuenta total de leucocitos.

A partir de sangre periférica con heparina o EDTA se realizó una dilución 1:20 con líquido de Turk; para después llenar la Cámara de Neubauer y realizar la cuenta bajo el microscopio óptico en el objetivo 10X.

XI. RESULTADOS:

Se incluyeron 12 pacientes con diagnóstico de osteosarcoma en fase III y IV (en base a la clasificación del comité Americano de Cirugía de Tumores Malignos), cuatro tenían metástasis y ocho no presentaban evidencia de lesión metastásica. En la tabla se muestran las características generales de los pacientes, con un alta frecuencia de localización tumoral en fémur (40%) seguido de la tibia (25%) y el húmero (8.3%). De acuerdo al estadio clínico todos los pacientes se encontraron con un grado avanzado de la enfermedad y son considerados pacientes con un mal pronóstico (Tabla 6).

A estos pacientes se les tomaron muestras sanguíneas al inicio, a los 3 y 6 meses post tratamiento para evaluar su respuesta clínica e inmunológica al tratamiento.

11.1 Clasificación en base a Levin:

De acuerdo a la clasificación propuesta por el grupo de Levin en 1975 y considerando los valores basales de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias (tabla 5) , encontramos que los pacientes incluidos se encontraron: siete en la etapa 1; que comprende una lesión tumoral pequeña, con niveles de linfocitos T, B y linfocitos T citotóxicos normales (Tabla 7), sin evidencia de lesión metastásica (figura 8), un paciente en la etapa 3 con un número disminuido de leucocitos, linfocitos B, Linfocitos T cooperadores y citotóxicos (figura 8), cuatro de los pacientes se clasificaron en la fase cuatro debido a que presentan lesiones de tipo metastásica y esta es la única fase en donde es considerada esta condición (figura 8).

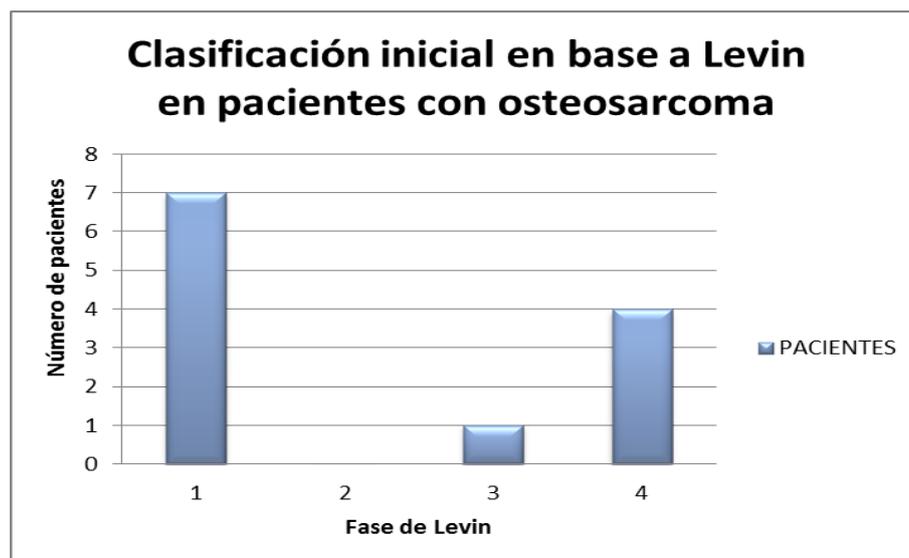


Figura 8. Clasificación de Levin en pacientes con osteosarcoma antes de iniciar el tratamiento con FTe.

11.2 Determinación de poblaciones linfocitarias post tratamiento:

Se compararon el número de células linfoides tipificadas en los 3 grupos de estudio, al inicio 3 meses y 6 meses pos tratamiento:

En la tabla 7, se presentan los valores cuantificados de las diferentes estirpes fenotipificadas por citometria de flujo ex vivo de cada uno de los pacientes que conforman los 3 grupos de estudio al inicio (T1), 3 (T2) y 6 (T3) meses pos tratamiento.

En la parte superior de la tabla se presenta el grupo de 4 pacientes con metástasis que recibieron quimioterapia más tratamiento adyuvante de factor de transferencia específico. De acuerdo a los valores obtenidos observamos que el número de leucocitos cuantificados se mantuvo dentro de los valores de referencia (4,000-11,000 cel/mm³) en 3 pacientes a los 3 meses; con una disminución en 2 de ellos a los 6 meses. Sin embargo, en uno de los pacientes (MSH) que disminuyó, presenta desde el inicio valores por abajo de lo normal.

En cuanto al resto de las poblaciones tipificadas se observa disminución de los valores cuantificados con respecto a la toma inicial (toma 1), antes de recibir tratamiento, sin embargo, en los pacientes MRE y EBA se observó un aumento en las células CD8+, CD16+CD56+.

Con respecto al grupo 2 de 5 pacientes libres de metástasis que recibieron quimioterapia y FT específico. Se observa un aumento del número de leucocitos totales en 4 de los 5 pacientes con respecto a la toma inicial, lo cual fue favorable en estos pacientes ya que permitió que se les aplicara su ciclo de quimioterapia de manera programada. En cuanto a la determinación de los linfocitos totales CD3+,CD19+,CD3+CD8+,CD16+CD56+ se observa un aumento en 4 de los pacientes a excepción del paciente GJA el cual presentó una disminución importante de todas las poblaciones tipificadas a los 6 meses pos tratamiento con respecto a su toma inicial, esto puede estar relacionado con la respuesta individual a los efectos adversos de la quimioterapia.

De manera general en este grupo de pacientes podemos comentar que en 4 de los 5 incluidos, se observó un aumento del número de cel/mm³ en la mayoría de las poblaciones tipificadas con respecto a su toma inicial.

En el grupo 3, de 3 pacientes que recibieron solo tratamiento de quimioterapia, desafortunadamente solo 2 pacientes sin metástasis (MSG y LEDM), se pudo realizar la cuantificación al inicio y tres meses de seguimiento, ya que el resto del grupo falleció antes del tiempo programado o desarrollaron metástasis temprana, o no se pudo tener acceso a la otra muestra. En estos pacientes se observó que a los 3 meses de iniciado el estudio (toma 2), se disminuyeron el número de leucocitos y linfocitos totales con respecto a su toma inicial probablemente por efecto de los ciclos de quimioterapia. Además se observó una tendencia a la disminución en el número de cel/mm³ de los linfocitos CD3+ y CD16+CD56+, con

aumento del número de linfocitos CD3+CD8+ en la toma 2, en el paciente LEDM y en la toma 3 (6 meses), en el paciente MSG.

De manera general, en este grupo 3 de 3 pacientes sin metástasis que solo recibieron quimioterapia podemos comentar que aparentemente por la tendencia en sus resultados evaluados presentaron una disminución en la mayoría de las poblaciones evaluadas lo cual puede indicar, el por qué en este grupo se tuvo una mala evolución reflejado en el desarrollo de metástasis, aumentó en los valores de fosfatasa alcalina y en la disminución de hemoglobina (Tabla 9) y nula sobrevida (figura 10).

11.3 Determinación de citocinas por el método de CBA:

De la determinación plasmática de citocinas proinflamatorias se observó la presencia de IL-8 e IL-6 en dos de los pacientes del grupo con metástasis cuyos valores se encuentran dentro de los valores de referencia (IL-6 de 0-8.0 pg/mL; IL-8 de 5.3-7.6 pg/mL) (Tabla 8) (33) en uno de los pacientes se encontró la presencia de TNF- α en valores normales (0-8.1 pg/mL) esto al inicio y después de la administración de FTe como adyuvante a la quimioterapia. En cuanto a los pacientes sin evidencia de lesión metastásica se observó en dos de ellos la presencia IL-8, IL1b, IL-6, IL-10, IL-12p70 y TNF dentro de los valores normales (Tabla 8); mientras que para uno de los pacientes no se detectaron ninguna de la citocinas determinadas. Mientras que para el grupo de pacientes que solo recibió quimioterapia (encerrados en rojo) se encontró la presencia de IL-8, IL1b, IL-6, IL-12p70 y TNF de manera basal y a lo largo del seguimiento, cabe mencionar que los valores se encontraron también dentro de los valores de referencia (Tabla 8).

Tabla 7. Número de leucocitos y células linfoides tipificadas en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de osteosarcoma.

PACIENTES CON METASTASIS QUE RECIBIERON Fte + QUIMIOTERAPIA									
INICIALES PACIENTE	TOMA	cel/mL							
		No. DE LEUCOCITOS TOTALES	LC TOTALES	CD3+	CD19+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD16+CD56+	CD4+/CD8+
EBA	toma 1	8300	1743	906	226	227	251	607	0.901
	toma 2	7800	1794	861	299	212	300	633	0.705
	toma 3	6675	2069	1578	331	505	549	173	0.92
NPJC	toma 1	13500	3240	1812	211	518	525	1138	0.99
	toma 2	4200	1386	1047	132	595	253	563	2.36
	toma 3	4200	1008	386	52	83	78	451	1.06
MSH	toma 1	2850	1710	1134	220	349	374	291	0.93
	toma 2	3250	1788	1132	168	325	345	161	0.94
	toma 3	3650	1387	1013	134	428	330	156	1.30
MRE	toma 1	5200	1872	1193	335	891	153	187	5.82
	toma 2	5150	1803	1226	186	429	456	391	0.94
	toma 3	2100	924	656	57	211	258	301	0.82
GRUPO DE PACIENTES SIN METASTASIS QUE RECIBIERON Fte + QUIMIOTERAPIA									
	TOMA	No. DE LEUCOCITOS TOTALES	LC TOTALES	CD3+	CD19+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD16+CD56+	CD4+/CD8+
MOCH	toma 1	3550	1207	925	156	412	191	153	2.16
	toma 2	5050	1717	1200	191	498	492	326	1.01
	toma 3	5400	1944	1266	176	454	296	41	1.53
JDR	toma 1	6950	1321	945	118	359	318	84	1.13
	toma 2	4450	2537	2042	341	848	620	178	1.37
	toma 3	6250	3938	2980	298	921	975	630	0.94
GJA	toma 1	6000	4020	3167	194	1159	754	659	1.54
	toma 2	9600	1728	1529	37	761	355	nd	2.15
	toma 3	2700	1917	1266	nd	423	598	nd	0.71
HAE	toma 1	5900	944	718	100	161	307	104	0.52
	toma 2	5850	1580	1106	184	325	442	287	0.74
	toma 3	6050	2118	1398	508	465	457	203	1.02
VFC	toma 1	3550	1988	1676	219	813	532	99	1.53
	toma 2	7700	1848	1038	55	324	128	171	2.53
	toma 3	7150	3003	2141	281	310	989	609	0.31
GRUPO DE PACIENTES SIN METASTASIS SOLO CON QUIMIOTERAPIA									
	TOMA	No. DE LEUCOCITOS TOTALES	LC TOTALES	CD3+	CD19+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD16+CD56+	CD4+/CD8+
LEDM	toma 1	6100	2379	1744	267	532	468	179	1.14
	toma 2	3700	1665	1379	247	480	575	102	0.84
EOL	toma 1	6600	990	467	116	69	125	87	0.55
MSG	toma 1	5200	1300	915	269	269	331	269	0.81
	toma 2	3600	1260	931	227	254	323	115	0.79
	toma 3	5000	1900	1237	297	265	581	253	0.46

Nota: aumentos con valores de $p > 0.05$, en rojo valores en los que se presentó aumento en el número de células/ml.

Determinación de citocinas por el método de CBA:

Tabla 8. Determinación de citocinas séricas en pacientes con osteosarcoma a diferentes tiempos de tratamiento.

INICIALES PACIENTES	GRUPO CON METÁSTASIS QUE RECIBIÓ QUIMIOTERAPIA +Fte									GRUPO SIN METÁSTASIS QUE RECIBIÓ QUIMIOTERAPIA +Fte									GRUPO CONTROL QUE SOLO RECIBIÓ QUIMIOTERAPIA										
	EBA			NPJC			MRE			VFC			JDR			GJA			HAE			LEDM			EOL			MSG	
CITOCINA	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3		
IL-8 (µg/ml)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
IL-1b (µg/ml)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
IL-6 (µg/ml)	2.92	2.73	nd	2.98	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.77	nd	2.73	2.74	2.73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
IL-10 (µg/ml)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
TNF-α (µg/ml)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
IL-12p70 (µg/ml)	nd	nd	nd	2.85	nd	nd	nd	nd	nd	2.73	nd	nd	nd	nd	2.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	

nd = no detectada. / = no determinada.

Tabla 9. Cuantificación de hemoglobina y fosfatasa alcalina en pacientes con osteosarcoma al inicio, 3 y 6 meses después del tratamiento con FTe más quimioterapia.

GRUPO	PACIENTE	PRESENCIA O AUSENCIA DE METÁSTASIS	GRADO DE TUMORACIÓN	NIVEL DE FOFATASA ALCALINA (U/L)			NIVEL DE HEMOGLOBINA (mg/dL)		
				T1	T2	T3	T1	T2	T3
**	EBA	METÁSTASIS	IV	56.6	39.6	41.4	10.3	12.5	8.455
	NPJC	METÁSTASIS	IV	1345	93.8	594.5	12.1	13	10.6
	MRE	METÁSTASIS	IV	588.1	357.8	47.6	8.5	12	6.31
*	JDR	NO METÁSTASIS	III	86.2	59.2	79	14.2	14.1	13.2
	GJA	NO METÁSTASIS	III	146.5	60.2	88.1	4.96	14.1	13.4
	VFC	NO METÁSTASIS	IV	106	98	55	13.6	10.4	10.1
2	HAE	NO METÁSTASIS	III	71.3	42.8	50	15.9	16.6	15.8
3	LEDM	NO METÁSTASIS	III	79.3	97.4	/	14.4	12.6	/
	EOL	NO METÁSTASIS	III	74.3	492	/	12.9	11	/
	MSG	NO METÁSTASIS	IV	1593	1134	3362	13.6	12.1	10.3

Fase de tumoración de acuerdo a la Asociación Americana de tumores Malignos. * $p=0.02$, ** $p=0.01$

11.4 Evaluación clínica:

Para evaluar la evolución clínica se consideraron los niveles de fosfatasa alcalina y hemoglobina, además del tiempo de supervivencia; antes y después del tratamiento.

Se observó una disminución estadísticamente significativa del nivel de fosfatasa alcalina en los pacientes con metástasis al compararse la toma basal (sin tratamiento) y la toma 2; después de la administración de FTe (Tabla 9).

Al analizar los niveles de hemoglobina observamos que en el grupo de pacientes sin desarrollo de metástasis, los valores se acercaban a los valores de referencia (12-17 g/dL) después de la administración de FTe, lo que no ocurrió en los pacientes del grupo control de quimioterapia y los pacientes con desarrollo de metástasis; que después de la toma 1 mostraban valores de hemoglobina disminuidos (Tabla 9).

11.5 Clasificación en base a Levin después del tratamiento:

Después de la administración de factor de transferencia por dos años la clasificación en base a Levin se modificó de la siguiente manera: cinco de nuestros pacientes se encuentran en la etapa 1 (todos tratados con FTe) que comprende una lesión tumoral pequeña, niveles de linfocitos T y B normales y respuesta citotóxica normal, sin evidencia de lesión metastásica; dos de nuestros pacientes (uno tratado con FTe q mantuvo su condición inicial y otro del grupo control que disminuyó el número de células iniciales, sin llegar al desarrollo de metástasis) se encuentran en la etapa 3 presentando respuesta celular abatida y por último 5 de nuestros pacientes son clasificados en la fase cuatro de manera directa ya que presenta desarrollo de metástasis y esta es la única fase en donde es considerada esta condición (cuatro que dé inicio presentaron esta condición tratados con FTe, se mantuvieron sin el desarrollo de metástasis hacia otro órgano o tejido, mientras que el paciente que se suma pertenece al grupo control que solo recibió quimioterapia , ya que después de 1 mes desarrollo metástasis cerebral (figura 9).

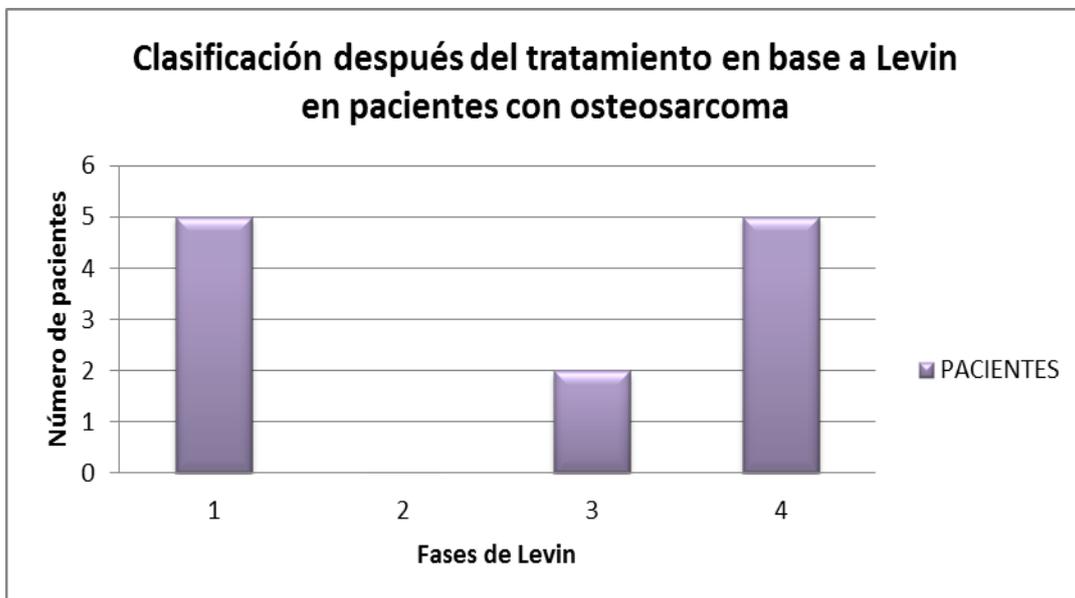


Figura 9. Clasificación de Levin en pacientes con osteosarcoma después de la administración de FTe como terapia adyuvante al tratamiento con osteosarcoma.

11.6 Tiempo de sobrevida:

En cuanto a la evaluación del tiempo de sobrevida encontramos diferencia estadísticamente significativa ($p=0.01$) al comparar a ambos grupos (grupo 1 y 2) con el grupo control de quimioterapia (grupo 3), encontrando un hasta un año más de vida en ambos grupos con respecto a los 6 meses de vida de los pacientes del grupo control. Como se puede observar en la figura 10.

36

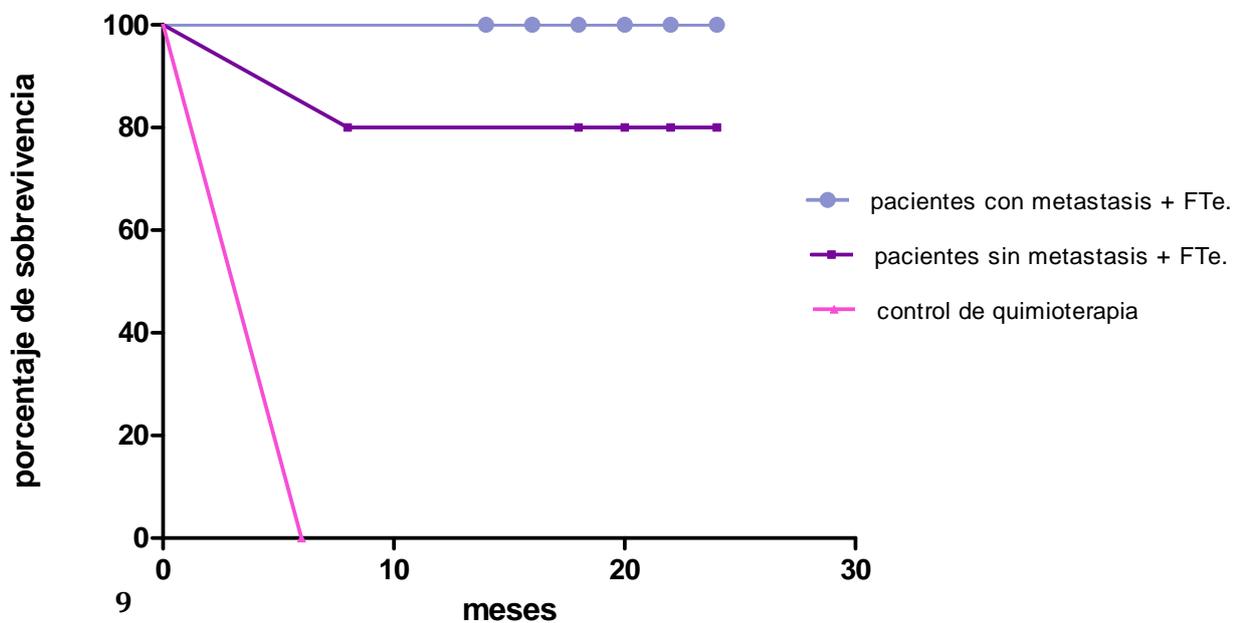


Figura 10 . Supervivencia global de pacientes con osteosarcoma después 2 años de seguimiento.

XII. DISCUSIÓN

El osteosarcoma es un tumor ósea maligno primario, con alta tendencia a producir metástasis hacia cualquier hueso, músculo o tendón cercano a la lesión primaria, aunque en el 90% de los casos esta metástasis está dirigida a pulmón (13); dicha neoplasia tiene mayor incidencia en el sexo masculino en poblaciones con edades de entre 10 y 25 años (2), la población estudiada mantuvo esta tendencia, ya que dentro de los 12 pacientes analizados el 58 % corresponden al sexo masculino y el 42% al sexo femenino, en edades comprendidas entre 7 y 36 años con una edad promedio de 20 años y en el 41% de los casos el hueso afectado fue fémur.

En la actualidad el tratamiento convencional basado en quimioterapia y cirugía ofrece un porcentaje de vida menor al 15% en estadios avanzados de la enfermedad (3), hoy en día se buscan nuevas estrategias basadas en la inmunoterapia debido al papel importante que juega la inmunoregulación en el control del proceso tumoral y sobre la regulación en la remodelación ósea en tumores óseos (29).

Existen pocos trabajos que indiquen el papel de las células linfoides y sus subpoblaciones en osteosarcoma por lo que en este trabajo nos interesó evaluar algunos componentes celulares (LcT , Lc B, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+CD56+, y citocinas inflamatorias (IL-8, IL-6, IL-1b, IL-10 ,TNF, IL-12p70) como mediadores de la respuesta inmune en este tipo de neoplasias así como su modificación por efecto de la quimioterapia y el tratamiento adyuvante como un inmunomodulador como el FTe.

Al inicio de nuestro estudio no se observó diferencia al comparar las poblaciones linfocitarias de pacientes sin metástasis y pacientes con metástasis, con las poblaciones de individuos sanos, esto debido tal vez a los mecanismos de evasión tumoral, que evitan el incremento de estas poblaciones al no ser estas activadas por moléculas propias del tumor, evitando su eliminación, aunque este comportamiento no se mantiene en los grupos a los que se les administró FTe, ya que el primer cambio importante que se observó fue en el número de leucocitos, que en ambos grupos (pacientes tratados sin metástasis y pacientes con metástasis con FTe como adyuvante) el número de estas células se mantiene a lo largo del tratamiento, esto es revelante, ya que en la clínica es considerado como un factor de buena o mala respuesta al tratamiento de quimioterapia, aunque de manera general existen reportes que indican que después de recibida la quimioterapia los pacientes cursan por leucopenia (30), mientras que en los grupos tratados con FTe el número de leucocitos nunca se encuentra por debajo de los niveles normales, a diferencia de lo observado en el grupo control en donde si bien no disminuyen por debajo de los valores de referencia (3500-11000

cel/ml) la tendencia observada es que después del segundo ciclo de quimioterapia el número de leucocitos comienza a disminuir.

Otra de las diferencias observadas fue el aumento del número de linfocitos T CD8+, LcB y células NK en el grupo de pacientes sin presencia de metástasis después de la primera toma de FTe esto tiene relevancia ya que diversos trabajos han demostrado la importancia de estas poblaciones en el control del progreso tumoral, ya sea produciendo moléculas como las perforinas y granzimas para el caso de las células NK y Lc T CD8+ (que sería interesante evaluar en estudios posteriores) o bien mediante la producción de anticuerpos específicos al tumor que sean capaces de activar mecanismos como la citotoxicidad mediada por anticuerpos (31, 34, 35); tal aumento no fue observado en los pacientes con metastasis tratados con FTe y los pacientes del grupo control, en donde de manera general las poblaciones linfocitarias tienden a disminuir después de la toma basal.

En cuanto a la determinación de citocinas en la toma basal no se encontró diferencia importante entre los pacientes con metástasis y los pacientes sin metástasis, este comportamiento se mantuvo después de la administración de FTe en los grupos 1 y 2 al compararlos con el grupo control (grupo 3) ; ya que en todos los grupos la presencia de citocinas fue heterogénea y dentro de los límites de referencia; lo que contrasta con los reportes bibliográficos que relacionan ambientes pro- inflamatorios con tumores de alto grado de malignidad y mala evolución (16).

En cuanto al nivel de fosfatasa alcalina encontramos que los pacientes de los grupos 1 y 2 cursaban con una elevación de los niveles séricos de dicha enzima lo que refleja un elevado metabolismo de los osteoblastos (32) y un mal pronóstico de la enfermedad, esto cambió después del tratamiento con FTe , ya que los niveles de dicha fosfatasa disminuyeron a niveles muy cercanos a los valores de referencia , iniciando con valores de 1000 U/L aproximadamente a valores aproximados de 90 U/L, lo que habla de una buena evolución clínica ya que el metabolismo óseo ha disminuido de manera considerable, pudiendo retardar la aparición de metástasis en los pacientes libres de esta condición (33) ya que como se menciona en los antecedentes, esta enzima es un factor importante en la activación de los osteoblastos, células que en muchos de los casos de osteosarcoma son la estirpe descontrolada.

El nivel de hemoglobina en los pacientes libres de metástasis con FTe (grupo 2), se elevó después del tratamiento, logrando estar dentro de los valores de referencia (12-17 g/dL) manteniéndose durante el seguimiento, esto refleja una recuperación en el número de hematíes en estos pacientes lo que habla de una mayor tolerancia a los agentes citostáticos, (que se ve reflejado en el curso del tratamiento sin anemia , indicador importante de la



tolerancia al tratamiento) de la quimioterapia, mientras que en los pacientes del grupo 3 no se observó este comportamiento.

En adición a esto encontramos que los pacientes de los grupos 1 y 2 mantuvieron su peso a lo largo de los ciclos de quimioterapia, en contraste con los pacientes del grupo 3 que cursaron con pérdida de peso severa durante la quimioterapia, efecto secundario esperando por la agresividad e inespecificidad de los agentes citostáticos aplicados.

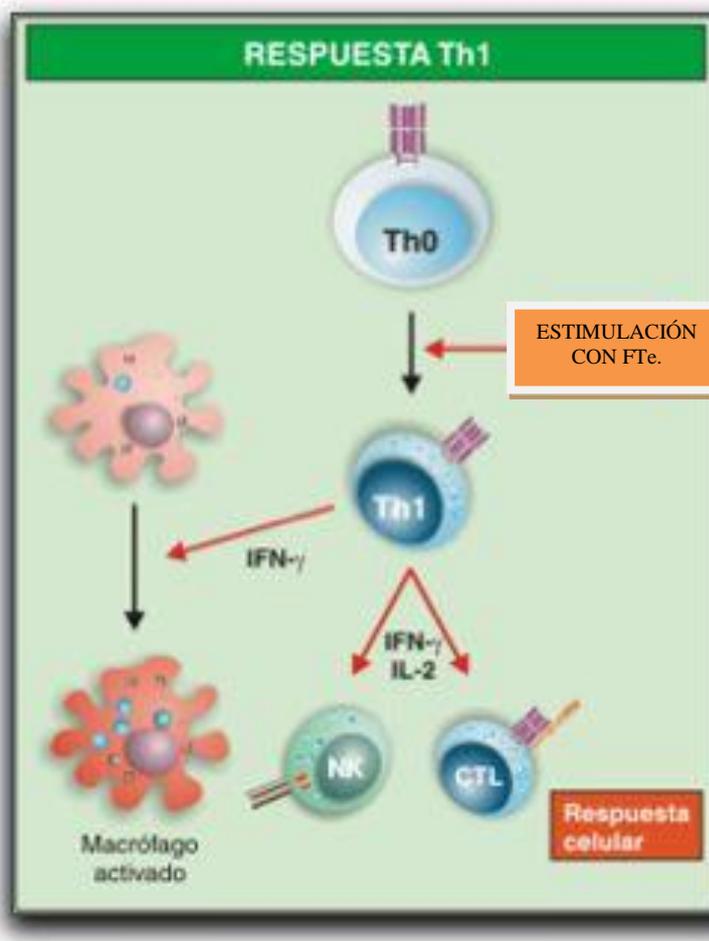
En cuanto a la sobrevida se observó el 100% de sobrevida en los pacientes del grupo 1 y el 80% en el grupo 2, después de dos años de seguimiento lo que es un muy buen indicio ya que el tiempo de sobrevida de los pacientes con metástasis es de solo 3 meses, mientras que para los pacientes libres de metástasis es de 17 meses (3) con desarrollo temprano de metástasis, en el grupo 3 (pacientes sin FTe) después de 6 meses todos los pacientes habían fallecido.

Después de dos años de seguimiento los grupos de Levin se modificaron ya que uno de los pacientes del grupo 3 (grupo control) desarrollo luego de 1 mes metástasis cerebral, colocándolo en la fase 4, mientras que los pacientes con FTe se mantuvieron en las fases 1 y 3 iniciales (28).

En cuanto a imagenología; radiografías indican limitación de lesiones tumorales pulmonares (metastásicas) después de la toma de FTe lo que sugiere que si bien el sistema inmune no es capaz de eliminar el tumor, tampoco permite que este progrese, manteniendo así un estado de equilibrio; además de esto las imágenes sugieren remodelación ósea y rápida evolución en uno de los pacientes que en tan solo 6 meses recuperó movilidad del miembro afectado, mientras que la recuperación normal es de más de años (anexo 1 B).

Una de las hipótesis aquí propuestas es la inducción por FTE de producción de IFN- γ por LcT cooperadores, lo que provoca la activación y proliferación de células NK y CD8+ , células en las que se observó aumento en el número de células por mililitro, en la mayoría de los pacientes libres de metástasis después de la administración de FTe ,lo que pudo contribuir a mantener a los pacientes sin lesión metastásica, mientras que en el grupo con presencia de metástasis que recibieron FTe bien no se encontró aumento , el número de estas células no disminuyó a lo largo del seguimiento, lo que pudo mantener en estado de equilibrio al organismo, es decir, si bien el tumor no se eliminó, tampoco progreso para aumentar el grado de severidad de los pacientes o generar otras lesiones metastásicas; para comprobar esta hipótesis es necesaria la cuantificación de IFN- γ , en los grupos de estudio.

O bien de otro de los mecanismos en el que el FTe pudo haber influido es el metabolismo óseo, pudiendo llevar a la producción de diversos factores como; PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas), FGF (Factor de crecimiento fibroblástico), M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos) o GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), moléculas clave para procesos de reabsorción ósea.

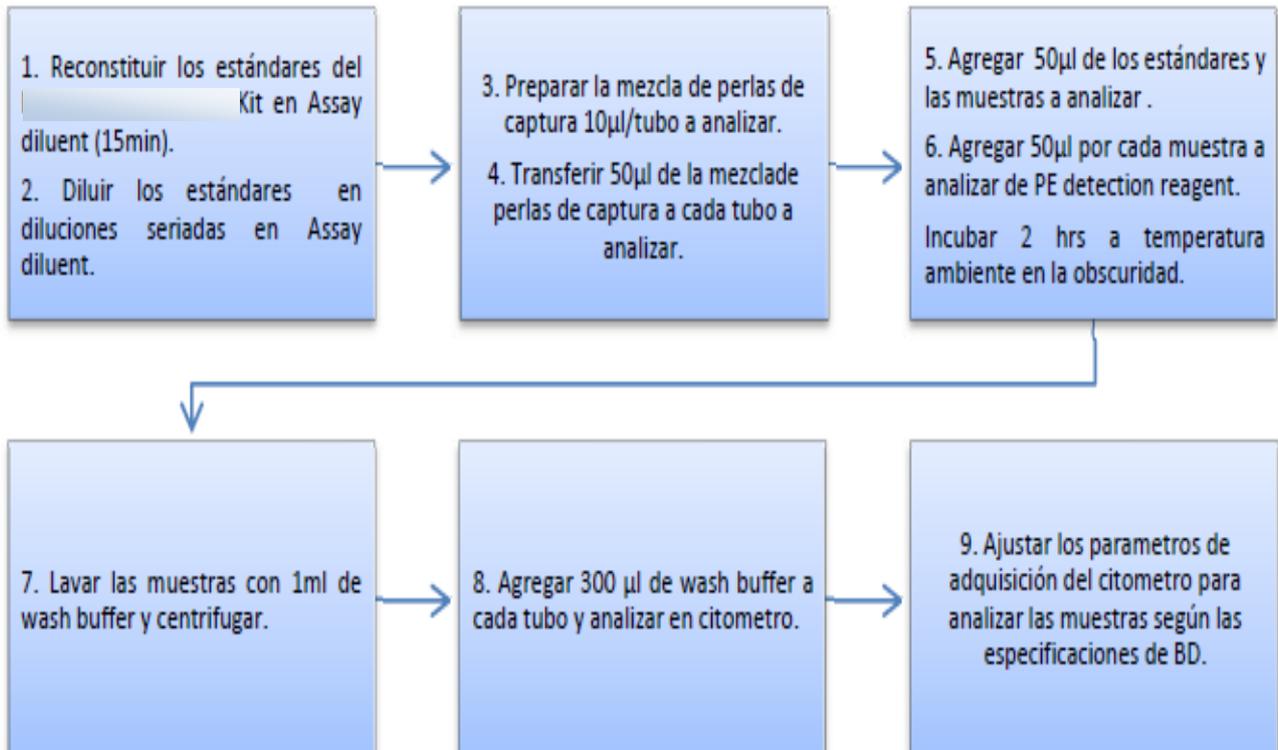


XIII. CONCLUSIONES:

- Se encontró aumentó de Lc CD8+, células NK y Lc B en pacientes sin metástasis que recibieron FTe mas quimioterapia.
 - No se encontró alteración en el nivel de citocinas séricas los pacientes con metástasis y pacientes sin metástasis que recibieron FTe más quimioterapia, ni en el grupo control que solo recibió quimioterapia como tratamiento.
 - Se observó aumento del nivel de hemoglobina en la toma 2, en pacientes que recibieron FTe más quimioterapia como tratamiento.
 - Se observó disminución del nivel de fosfatasa alcalina, en pacientes que recibieron FTe más quimioterapia como tratamiento.
 - Se observó aumento en el porcentaje de sobrevida, en pacientes que recibieron FTe más quimioterapia como tratamiento (p=0.01).
- **El incremento en las poblaciones linfocitarias y hemoglobina así como la disminución del nivel de fosfatasa alcalina y el aumento en el tiempo de sobrevida de los pacientes tratados con FTe como adyuvante nos permiten sugerir el efecto benéfico de Transferon® en pacientes con osteosarcoma.**

Anexo 1.

A. Resumen del procedimiento para analizar citocinas por CBA Inflammation KitBD.



B. Imágenes de paciente con metástasis pulmonar y lesión primaria en rodilla, véase la regeneración ósea después de 1 año.



Lesión metastásica en pulmón antes de la toma de FTe.



Lesión metastásica después de 8 meses de la toma de FTe, la limitación de las lesiones tumorales.



Lesión inicial



Lesión después de FTe evidencia de regeneración ósea después de un año de la administración de FTe.



INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

SUBDIRECCION ORTOPEDIA

**SERVICIO TUMORES OSEOS
DR. GENARO RICO MARTINEZ**

"2010 Año de la Patria Bicentenario del Inicio de la Independencia y
Centenario del Inicio de la Revolución"



**CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO
INFORMACION**

Nombre del paciente: _____ de 16 años de edad.

Con domicilio en: Zapotecos 345 Aguasca Capotlan

Nombre del representante: DF

de _____ años de edad. No de Registro 021983 Cama miraz

Con domicilio en: _____

En calidad de: _____

DECLARO

QUE EL DOCTOR: _____

Me ha explicado que es conveniente proceder en mi situación a:

Realización de Factor de Transparencia

Por tener diagnóstico: F

Todo acto médico diagnóstico
serie de complicaciones mayores o menores, a veces potencialmente serias, que incluyen riesgo de mortalidad y que pueden requerir tratamientos complementarios, médicos o quirúrgicos, que aumenten su estancia hospitalaria. Dichas complicaciones unas veces son derivadas directamente de la propia técnica, pero otras dependerán del procedimiento, del estado previo del paciente y de los tratamientos que esté recibiendo o de las posibles anomalías anatómicas y/o de la utilización de los equipos médicos.

Entre las complicaciones que pueden surgir en _____
se encuentran:

Ninguna

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el médico que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.





REFERENCIAS.

1. Dickson González Sonia M. Osteosarcoma: Aspectos Anatomopatológicos. Rev. Soc. Med. Quir. Hosp. Emerg. Pérez de León 2007; 38; 1: 4-7.
2. Cuevas Urióstegui M., Villasis A., Fajardo A. Epidemiología del Cáncer en Adolescentes. Salud pública de México 2003, 45 supl.115-123.
3. Fletcher C.D.M., Unni K.K., Mertens F. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. IARC Press: Lyon 2002.
4. Mora V, Pérez R, González R, et al. Osteosarcomas periféricos. Rev. Venez. Oncol. 2002; 14, 4: 209-215.
5. Niembro Zúñiga, Castellanos Toledo, et al. Osteosarcoma, results of eight years of treatment, experience of the National Institute of Pediatrics. Gamo. 2005, 4; 3: 35-40.
6. Kamb A. Shattuck-Eidens D. et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. Nat. Genet. 1994, 8; 1:23-6.
7. Tucker M.A., et al. Risk of second cancers after treatment for Hodgkin's disease. N. Engl. J. Med, 1988; 318:76.
8. Greenspan, A., Jundt G. and Remagen W. Differential Diagnosis in Orthopaedic Oncology. Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins. 2007.
9. Fechner R, Mills S. Atlas of tumor anthology tumors of the bones and joints. Armed Forces Institute of Pathology. Third series, Facicle 8. Bethrsda Mayland. EE.UU:1993.
10. Henry J, Diagnóstico y tratamientos clínicos, Ediciones Científicas y Técnicas S.A, 9ª. edición, México 1994, pp. 269, 293-295.
11. Covarrubias E, Cervantes L. Osteosarcoma, quimioterapia pre y posoperatoria. Informe de 10 casos hospital infantil de Sonora. Cancerología 2000:46:4; 154-251.
12. Cohen, A. D., Y. Shoenfeld. Vaccine-induced autoimmunity Journal of Autoimmunity. 1996, 9; 6:699-703.
13. Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: A critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. Metab Bone Dis. Relat. Res 1982; 4:1-6.

14. Abbas Abul K, y Lichman Andrew. *Inmunología Celular y molecular*. 5ta ed. Elsevier, 2004; 398-418.
15. Mariani E. et al. Interleukin-12 Induces Efficient Lysis of Natural Killer-Sensitive and Natural Killer-Resistant Human Osteosarcoma Cells: the Synergistic Effect of Interleukin-2. *Journal of Immunology*, 2000, 51:618-625.
16. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-45.
17. Muller AJ, Scherle P. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecules inhibitors. *Nature Rev* 2006; 6: 611-25.
18. Kamate C, Baloul S, Grootenboer S, et al. Inflammation and cancer, the mastocytoma P815 tumor model revisited: triggering of macrophage activation in vivo with protumorigenic consequences. *Int J Cancer* 2002; 100: 571-9.
19. Le NT, Xue M, Castelnoble LA, Jackson CJ. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front Biosci* 2007; 12: 1475-87.
20. Ruka W., et al. Alterations of routine blood tests in adult patients with soft tissue sarcomas: Relationships to cytokine serum levels and prognostic significance. *Annals of Oncology* 2001; 12: 1423-1432.
21. Lawrence HS, Al-Askari S, David J, Franklin EC, Zweiman B. Transfer of immunological information in humans with dialysates of leucocyte extracts. *Trans Assoc. Am Physicians* 1963; 76:84-89.
22. Petersen, E. A. and Kirkpatrick, C. H., Nature and activities of transfer factor. *Annals of the New York academy of sciences*, 332: 216–227. doi: 10.1111/j.1749-6632.1979. Transfer Factor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1979; 332: 216–227.
23. Lawrence HS, Borkowsky W. The nature and functions of inducer factor and suppressor factor in T cell dialysates. *Immunol Lett*, 1989; 21; 1:75-80.
24. Wilson GB, et al. De novo initiation of specific cell-mediated immune responsiveness in chickens by transfer factor (specific immunity inducer) obtained from bovine colostrum and milk. *Acta Virol*. 1988, 32; 1:6 18.
25. Karhumaki E, et al. Chromatographic and enzymatic effects on transfer factor-like activity from human leukocytes and porcine spleen dialysate. *Int J Biochem*-1988. 20; 10:1067-72.
26. Rodríguez Flores A., Castillo-Juarez P., R Gonzalez-Guzman., G. Rico-Martinez., Estrada-Parra S. Immunological evaluation of patients with osteosarcoma received adjuvant treatment with specific Transfer Factor. *The Journal of Immunology*, 2009, 182, 41.63.



27. Estrada-Parra S, et al. Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster. *Int J Immunopharmacol*-1998. 20; 10:521-35.
28. Levin AS, Byers VS, Funderberg HH, Wybran J, Hackett AJ, Johnston JO, Spittler LE. Osteogenic sarcoma. Immunologic parameters before and during immunotherapy with tumor-specific Transfer Factor. *The Journal of Clinical Investigation*; 1975;55 p 487-499.
29. Malvicini Mariana, Puchulo Guillermo, Matar Pablo, Mazzolini Guillermo. inmunoterapia del cancer importancia de controlar la inmunosupresión. *MEDICINA (Buenos Aires)* 2010; 70: 565-570.
30. Natalie A. Following Chemotherapy for Breast Cancer. *Official Journal of the American College of Sports Medicine*, 2005; 1827-35.
31. Bernardone Seren I. Role of NK cells and adaptive immunity in "immunoediting": Recent developments. *Panorama Inmunología*, 2008, 27; 3:141-146.
32. Wiwanitkit Viroj. High serum alkaline phosphatase levels, a study in 181 Thai adult hospitalized patients. *BMC Family Practice* 2001, 2:2.
33. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:E151-7.
34. Naito Yoshitaka, Saito Kazuya, Shiiba Kenichi, et al. CD8+ T Cells Infiltrated within Cancer Cell Nests as a Prognostic Factor in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998;58:3491-3494.
35. Nelson Delia, Ganss Ruth. Tumor growth or regression: powered by inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2006, 80:685-690.
36. Potmesil M., Kohn K.W. DNA topoisomerases in cancer. New York. Oxford University, Press, 1991.
37. Hooper, D.C. Clinical application of quinolones. *Biochem. Biophys. Acta* 1400; 45, 1998.
38. Funderberg H, Pzza G. Transfer Factor new frontiers; progress in drug research. 1994;4:311-389.
39. Bernardone Seren I. Role of NK cells and adaptive immunity in "immunoediting": Recent developments. *Panorama Inmunología*, 2008, 27;3:141-146.
40. Bhardwaj Nina. Harnessing the immune system to treat cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 2007, 117;5:1130-1136.



URL:

1. <http://www.squidoo.com/bonexray>
2. <http://images.google.com.mx/url?q=http://www.path.utah.edu/casepath/MS%2520Cases/MSCase7/MSCase7Part3.htm>.
3. iescarin.educa.aragon.es