

1 11246



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN
Departamento de Biología Molecular
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
"Dr. Salvador Zubirán", Departamento de Urología

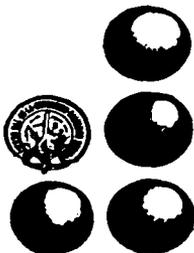
**"APLICACION DE UNA VACUNA DE CELULAS DENDRITICAS
COMO INMUNOTERAPIA EN PACIENTES CON CANCER
RENAL METASTASICO A PULMON. ESTUDIO FASE I"**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN UROLOGIA**

P R E S E N T A
DR. JOSE CARLOS ARROYO KURIBREÑA

**TUTORES: DR. FERNANDO GABILONDO NAVARRO
DRA. CARMEN SANCHEZ TORRES**

**ASESORES: DR. LUIS LLORENTE PETERS
DR. ANTONIO VELAZQUEZ GONZALEZ
DRA. IRMA ESPINOZA POBLANO**



INCMNSZ

MEXICO D.F. FEBRERO DEL 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Titulo de tesis:

**"Aplicación de una Vacuna de Células Dendríticas como
Inmunoterapia en pacientes con Cáncer Renal
Metastásico a Pulmón. Estudio fase I"**

Tesis de grado:

Especialidad en Urología.

**Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Medicina.**

**Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN,
Departamento de Biología Molecular**

**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
"Dr. Salvador Zubirán", Departamento de Urología.**

Autor:

Dr. JOSE CARLOS ARROYO KURIBREÑA

Tutores:

**Dr. FERNANDO GABILONDO NAVARRO
Dra. CARMEN SÁNCHEZ TORRES**

Asesores:

**Dr. LUIS LLORENTE PETERS
Dr. ANTONIO VELÁZQUEZ GONZALEZ
Dra. IRMA ESPINOZA POBLANO**

México D.F. Febrero del 2003.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DEDICATORIAS

**A Dios,
No puedo expresar todo mi agradecimiento.**

**A mi esposa Elena,
Gracias por tu ayuda, comprensión y empezar conmigo este plan de vida.**

**A mis papas,
Por sus consejos y ejemplo.**

**A mis hermanos, Monica, Ignacio, Ximena, Montserrat, Gonzalo y Carmen,
Mis mejores consejeros.**

**A mis abuelos,
Mis mejores paleros, pero también mis ejemplos a seguir.**

**Al Dr. Fernando Gabilondo,
Por su paciencia y apoyo incondicional en mi formación, para que finalmente reditúen
sus esfuerzos en un futuro Urólogo.**

**A Guillermo Huerta, Eric Maus y Javier Lopez,
Mis hermanos escogidos.**

**A Nikita y Esther,
Por ser las únicas que me reciben y despiden en mis horarios.**

**Al INCMNSZ y sus pacientes,
Por haberme enseñado tanto, y también demostrarme que falta mucho por aprender.**

**A mis maestros, Dr Elias, Dr Kasep, Dr Feria, Dr Sotomayor, Dr Sánchez
A mis residentes, Hugo G, Gabriel P, Ernesto L, Ayax S, Joel Q, Estuardo P, Rodolfo F,
Luis R, Victor G, Christian R, Francisco R, Ricardo C, Humberto A, Pedro P, Jose B,
Bernardo G, Manuel B.**

INDICE:

• Resumen	3
• Título	4
• Introducción	
o Cáncer Renal	4
o Células Dendríticas	7
o DC como Inmunoterapia en Cáncer	9
o Células Dendríticas en Cáncer Renal	11
• Planteamiento del problema	13
• Hipótesis	14
• Objetivos	
o Generales	15
o Particulares	15
• Material y Métodos	16
o Obtención de DC para la inmunoterapia	17
• Resultados	18
o Casos clínicos	18
o Características de las vacunas	24
o Respuesta clínica de los pacientes	25
o Células mononucleares obtenidas por leucoferesis	26
• Discusión	27
• Conclusiones	32
• Bibliografía	33
• Tablas y Anexos	43

RESUMEN:

El cáncer renal (CaR) es la 10ª causa de muerte por cáncer en EUA. Con frecuencia (20-30% de los casos) se diagnostica en estadios avanzados, fuera del espectro curativo de la cirugía. La respuesta del CaR al tratamiento con quimioterapia o radioterapia coadyuvantes tiene una alta mortalidad y baja tasa de respuesta (5-15%). La inmunoterapia con DC como inductoras de la respuesta inmune primaria citotóxica antitumoral ha reportado tasas de éxito del 40% en CaR.

Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígeno más eficientes del sistema inmune por su alta capacidad de captación y presentación antigénica, su elevada expresión de moléculas coestimuladoras y su capacidad de migración a los ganglios linfáticos para la estimulación de los linfocitos T, en conjunto con su distribución sistémica que facilita la captación antigénica.

En este estudio fase I, se utilizó un esquema de inmunoterapia mediante el uso de una vacuna de CD sensibilizadas con antígeno tumoral autólogo en pacientes con CaR metastásico, mediante la generación a partir de monocitos circulantes como progenitores de células dendríticas maduras, que fueron sensibilizadas con antígenos tumorales derivados del CaR metastásico autólogo. Evaluamos la factibilidad de preparación de la vacuna de DC autólogas, la presencia de efectos adversos a la vacuna y la respuesta clínica inducida en estos individuos mediante tomografía axial computada.

Participaron 6 pacientes con el diagnóstico de carcinoma de células claras de riñón, todos con metástasis pulmonares evaluables por TAC de pulmón. No se presentó ninguna dificultad para la formación de las vacunas, sin embargo los número de DC por vacuna fueron variables debido a las variaciones en adhesividad de los monocitos que se utilizaron para derivarlos a DC. Ningún paciente tuvo complicaciones durante la nefrectomía radical y solamente un paciente presentó febrícula durante el esquema de vacunas (esta hipertermia fue leve y con duración menor de 12hrs posterior a la aplicación de la vacuna 4 y 5). Finalmente se observó, enfermedad estable en 3 de los 6 pacientes y ningún fenómeno de respuesta autoinmune.

Consideramos que la inmunoterapia mediada por DC autólogas es una terapia factible de administrar en nuestro medio, y demostró, a pesar del número limitado de pacientes, ser un esquema de tratamiento sin complicaciones significativas y con respuesta de enfermedad estable en la mitad de nuestros pacientes. Sin embargo, es necesario que se investigue como se pudiera incrementar la tasa de respuestas sin aumentar la morbilidad involucrada con la terapia inmune.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TITULO:

"Aplicación de una Vacuna de Células Dendríticas como Inmunoterapia en pacientes con Cáncer Renal Metastásico a Pulmón. Estudio fase I"

INTRODUCCIÓN**CANCER RENAL**

El carcinoma renal (CaR) se origina a partir de las células del túbulo contorneado proximal (*Enquist*) y representa del 2 al 3% de todas las neoplasias en el ser humano (*, Marshall, McLaughlin*); la sobrevida promedio a 10 años en un tumor menor de 7cm es del 73%, con nódulos es del 24% y con metástasis del 0% (*Danpanich, Hurley, Srigley*), lo cual tiene un gran impacto, dado que en el 30% de los pacientes, el CaR se diagnostica asociado a metástasis a distancia (Mota). Los factores que mejor correlacionan con el comportamiento de la neoplasia son: la edad, el involucro tumoral y la presencia de metástasis (*Guinan, Javidan*), el tipo histológico (*Rini*) y grado de diferenciación por la escala de Furhman (*Medeiros*).

Se debe de tener presente que las neoplasias renales no son un solo tumor, sino una variedad distinguible de entidades, dado que un mismo tumor puede tener más de dos masas (*Bechtold, Iliopoulos, Walter*), pudiendo ser diferentes, en su grado de diferenciación, estirpe celular (*Bonsib*) o tiempo de presentación. La estirpe histológica más frecuente es la de células claras, que compromete hasta el 80% del CaR (*Reuter, Zambrano*).

El tratamiento del CaR es primordialmente quirúrgico y se puede dividir en: nefrectomía radical (*Lee, Gill*) y preservadora de riñón (*Hoznek, Morgan*). En los pacientes con estadios avanzados, la respuesta a la cirugía depende del grado de invasión de la vena renal (sobrevida a 5 años del 56% y a 10 años del 33%) o la presencia de metástasis a ganglios linfáticos regionales (sobrevida del 25% a 5 años y 16% a 10 años) (*Ornstein, Hilton*). El riesgo de recurrencia por estadios es: en T1 del 0-7%, en T2 del 15-27% y en T3 del 39-52% (25, 26), por ello, el seguimiento se adecua tanto a la búsqueda de una recidiva local o a distancia, como al funcionamiento renal residual (*Russo*).

La nefrectomía en CaR metastático tiene una función paliativa para el control de síntomas o coadyuvante como parte de un programa de inmunoterapia (*Tigrani*). Las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento sistémico del CaR metastático, son: la quimioterapia citotóxica utilizando fluoridina combinada con vinblastina con una respuesta global del 5%; esta respuesta tan baja se debe a los mecanismos de resistencia que involucran a la glicoproteína p170 codificada por el gen MDR1 y el ciclo redox glutatión detoxificante (*Amato*); la hormonoterapia que es ineficiente por ser un tumor hormono-independiente; la radioterapia que se restringe para el tratamiento paliativo por su radio-resistencia debida a la capacidad anaerobia de la neoplasia, su cápsula y centro necrótico (*Motzer*); y finalmente la inmunoterapia con citocinas, como la Interleucina 2 (*Figlin, Margolin, Shvarts*), GM-CSF (*Rini, Simons*) o Interferón α (*Fossa*) con tasa de respuesta del 15% durante 4 a 6 meses con una elevada tasa de efectos adversos (*Bukowski*).

La participación de la respuesta inmune en pacientes con CaR se demuestra por su historia natural inusual, los casos reportados de regresiones espontáneas o el crecimiento retardado de las metástasis; la presencia de un infiltrado aumentado en CaR de tipo linfocitario con fenotipo de memoria, asociado con macrófagos (*Van Den*), "natural killers" (*Hayakawa*), células B (*Shin*); la identificación de antígenos tumorales como MUC1 (*Fujiota*), G250 (*Uemura*), SART3 (*Kawagoe*) VHL o TSC (*Sell*); el incremento en el infiltrado inflamatorio tumoral posterior a la transfección del gen de HLA-B7 en el CaR (*Brasanaç*); la presencia de DC dentro del tejido tumoral capaces de captar y presentar antígenos tumorales (*Dallal, Thurnher, Troy*); la posibilidad de genera DC de sangre periférica de pacientes con CaR eficientes para la inducción de la respuesta inmune (*Merad*); las respuestas parciales a la infusión de citocinas recombinantes como IL-2, IFN- γ o GM-CSF (*Schwaab*) y la capacidad de las DC infiltrantes para la inducción de la respuesta inmune *in vitro* (*Hanash, Hoffman*); entre otras (*Janeway*).

En contraparte, se explica parcialmente la progresión tumoral a la inadecuada activación de los linfocitos T por las células tumorales (*Krane, Schuler, Tsai, Villacres*); la liberación de citocinas inmunosupresoras por el tejido tumoral como son IL-6 (*Aalther*), IL-10 (*Menetrier, Wittke*) y TGF- β (*Nelson*) con la subsecuente supresión de la actividad

presentadora antigénica, una regulación hacia la baja de HLA-I y HLA-II; y la anergia de linfocitos T como parte de una respuesta Th2; y la baja expresión de moléculas MHC-I en el tejido tumoral de base (*Brasanac*); entre otras.

La terapia inmune utilizada hasta el momento se propone vencer estos obstáculos por diferentes métodos (*Lattime*). Los diferentes esquemas terapéuticos en CaR se clasifican en: inmunoterapia activa cuando se transfieren agentes al huésped en un intento de inducir una respuesta inmune contra el tumor, por ejemplo: la administración de IL-2 como inductor de la activación de células CD8⁺ (*Surman*), IFN- γ , IFN- α (*Fossa*), IL-2 con IFN- α (*Bukowski*), GM-CSF o la combinación de lisados tumorales con citocinas (*Schwaab*). La inmunoterapia pasiva implica la administración de agentes inmunes que puedan mediar la regresión tumoral e incluyen: la administración de linfocitos autólogos sensibilizados contra el tumor (*Figlin*), la infusión de células asesinas activadas por linfocinas y linfocitos infiltrantes tumorales activados con citocinas como IL-2 (*Krane*), la proliferación y sensibilización de DC para la presentación del antígeno tumoral que despierte una respuesta citotóxica efectiva contra el tumor (*Banchereau, Cella*).

Como se puede observar, los objetivos de la inmunoterapia implican la polarización hacia una respuesta Th1 de tipo celular (*Berd*), que se asocia con respuestas de hipersensibilidad retardada, la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ efectores de la inmunidad antitumoral, la citotoxicidad mediada por células, entre otras; esta respuesta Th1 se caracteriza por la secreción principalmente de citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ y el cambio de clase de células B a IgG2a. En el otro extremo de la polarización de la respuesta se encuentran las células Th2 de tipo humoral con cambio a clase IgE e IgG1 y la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 IL-10 e IL-13 (*Koch*). Encontrándose una participación de ambas en el inicio de la respuesta inmune siendo involucrada IL-4 (*Schuler*) con la posterior polarización como resultado de la interacción del linfocito CD4⁺ con el CD8⁺ y la DC en condiciones del microambiente inductoras como es IL-2 e IL-12 (*Bhardwaj*). Estas observaciones correlacionan con la proliferación de linfocitos T CD8⁺ con capacidad antitumoral y los perfiles de RNAm de citocinas en el tejido tumoral, donde se encuentra un incremento de un perfil Th1 en las zonas en regresión y Th2 en la progresión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Células Dendríticas

Las células dendríticas (DC), se han descrito como una población de células con función de célula presentadora de antígeno profesional. Fueron descritas por primera vez en 1868 por Langerhans en piel (*Hart, Thomas*). En 1990 Inaba demostró la actividad inmunogénica in vivo de las DC, siendo en 1994, Sallusto quien introduce el protocolo de generación de DC *ex vivo* a partir de monocitos CD14⁺ de sangre periférica estimulados con GM-CSF e IL-4 (*Yamada*) facilitando su estudio y aplicación en la terapia inmune antitumoral. Se han identificado en todos los tejidos del cuerpo humano; conformando menos del 0.3% de las células mononucleares en sangre periférica (*Thurner*).

El uso de las DC como elemento central de la inmunoterapia se basa en su eficiente capacidad de célula de presentación antigénica profesional y su capacidad de inducir una respuesta inmune primaria en linfocitos T. La DC se caracteriza por: su distribución sistémica, la gran capacidad de capturar, procesar y presentar un antígeno, su facultad de migración a los tejidos linfoides y la elevada expresión de complejos MHC-péptido en su membrana junto con moléculas coestimuladoras (*Goxe, Santambrogio*). De acuerdo a lo anterior, las funciones de las DC se pueden dividir en tres: centinela (adquisición antigénica y procesamiento), migratoria (su movilización a órganos linfoides y presentación de los complejos MHC-I-péptido), y finalmente la activadora de linfocitos T (al generar las señales accesorias para la estimulación de células T, induciendo su proliferación y función efectora) (*Lane*). Estas diferentes funciones se van modificando de acuerdo al estado de maduración de la DC que implica un cambio dinámico resultado de su estimulación por agentes patógenos o citocinas y quimiocinas en el microambiente inflamatorio.

En un inicio, las DC como células inmaduras distribuidas en todo el organismo, presentan una baja expresión de moléculas coestimuladoras y MHC en su membrana, que contrasta con su gran capacidad de captación, internalización y procesamiento antigénico. El proceso de captura antigénica es mediada por tres procesos diferentes: fagocitosis (para partículas o microbios), endocitosis mediada por receptores específicos y macropinocitosis constitutiva (permite la captura de fluido extracelular). Estos antígenos captados se localizan en el interior de la célula en unas vesículas denominadas

macropinosomas y son capaces de ser retenidos por un periodo de hasta 48 horas sin ser procesados, (*Pulendran*).

Las diferentes funciones de la DC inmadura explican sus características fenotípicas como son la presencia de receptores de membrana para la captación antigénica mediada por receptores $Fc\gamma$ (CD32 y CD64), $Fc\epsilon$ II (CD23), $Fc\alpha$ y lectinas tipo C (receptor de manosa y DEC-205); la presencia de fibras de actina en su citoplasma, así como un acumulo de MHC-II en un compartimento intracelular multilaminar y multivesicular, denominado DIC con características de endosomas tardíos/lisosomas para el procesamiento antigénico (*Wright*); la presencia de receptores para quimiocina CCR1, CCR2 y CCR5 para la unión de quimiocinas inflamatorias inductoras de su migración fuera del tejido inflamatorio (*Aliberti*).

En respuesta a estímulos inflamatorios (LPS, $TNF-\alpha$, GM-CSF, MIP-1 α), las DC migran de estas posiciones periféricas para alcanzar los órganos linfoides secundarios, donde entran en contacto con los linfocitos T específico del antígeno y se completa su proceso de maduración (*Weinlinch*). La migración de las DC se da preferentemente por los vasos linfáticos aferentes en respuesta a estímulos por citocinas inflamatorias como $TNF-\alpha$, GM-CSF y quimiocinas, con lo que se explica la relación estrecha que existe entre el proceso de migración y maduración de las DC (*Barratt*), observándose cambios en su fenotipo, manifestados por un procesamiento de los antígenos retenidos y su unión a moléculas de MHC-I y MHC-II, que posteriormente se expresan en la membrana en donde permanecen estables, en conjunto con el incremento en la producción *de novo* de moléculas coestimuladoras (*Sozzani*).

Estos cambios de función explican las características de las DC maduras que se manifiesta por presentar receptores para quimiocinas constitutivas (CCR7) con respuesta a MIP-3 β y 6Ckine inductoras de la migración a las áreas de linfocitos T en los ganglios linfáticos, el incremento en las moléculas coestimuladoras (CD24, 40, 80, 86), la expresión de un receptor característico de las DC maduras (CD83), el incremento en la expresión de MHC-I y MHC-II unido al péptido en la membrana con moléculas de adhesión (ICAM-1, 3, LFA-3) y finalmente, la capacidad de liberación de una gran variedad de citocinas (IL-1, IL-8, IL-12, $TNF-\alpha$ y MIP-1) (*Almeida, Lin*).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La DC maduras migran a la periferia de los ganglios linfáticos para poder entrar en contacto con los linfocitos T y mediante la presentación antigénica, se lleve a cabo la inducción de la activación entre ellas. El linfocito T es activado mediante interacción del TCR/MHC-péptido, que a su vez es estimulado para incrementar la expresión de moléculas como CD28 y CD40L. Cuando estos receptores se unen a sus ligandos en las DC (CD80/86 y CD40 respectivamente) estimulan a su vez a las DC para que se incremente la expresión de las moléculas de coestimulación y adhesión y se inicie la liberación de citocinas estimuladoras de la proliferación y diferenciación de los linfocitos T hacia células efectoras (*Rieser*), observándose la coestimulación del linfocito CD4⁺, CD8⁺ y la DC.

Gracias a que se pueden obtener grandes cantidades de DC a partir de monocitos de sangre periférica (*Merad*) se ha facilitado el estudio *in vitro* del proceso de maduración de las DC y se ha permitido la aplicación de inmunoterapia mediada por DC. Este protocolo involucra el aislamiento de los monocitos de sangre periférica, con la posterior estimulación en cultivo con citocinas (IL-4 y GM-CSF) para iniciar su diferenciación de monocitos a DC inmaduras. Posteriormente se requiere del estímulo con citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , PG-E2, LPS) o su activación en presencia del ligando de CD40 para la inducción de la maduración con el consecuente cambio fenotípico y funcional a una DC madura.

Células dendríticas como inmunoterapia en cáncer

Debido a las características ya mencionadas de las DC, estas han demostrado ser el candidato para ser utilizadas en la inmunoterapia antitumoral, aun cuando no se ha definido el esquema de aplicación de las DC que induzca satisfactoriamente la respuesta inmune en neoplasias terminales resistentes al tratamiento con fármacos antineoplásicos o radioterapia.

Existen múltiples estudios que demuestran la efectividad del uso de vacunas con DC, con antecedentes *in vivo* del uso de DC sensibilizadas con lisado tumoral para impedir la progresión de metástasis en ratones con fibrosarcoma demostrando la inmunidad celular mediada por DC (*Celluzzi, DeMatos*), verificándose en otros estudios con péptidos antigénicos derivados del tumor. Así mismo, se ha utilizado RNA mensajero

tumoral, que ha demostrado la inducción de una estimulación potente de linfocitos T contra el tumor (*Boczkowski, Takayama*); y la asociación de RNA tumoral con el RNA de telomerasa encontrando citotoxicidad contra melanoma, timoma, CaR y cáncer de próstata (*Nair*).

Entre los estudios clínicos fase I, II y III se han utilizado una gama amplia de neoplasias sometidas a estos esquemas. En melanoma, donde se han aplicado DC sensibilizadas con lisados tumorales y péptidos antigénicos identificados como MAGE-1, MAGE-3, Melan-A o gp 100, en 14 pacientes con enfermedad sistémica, encontrado remisión en 2 y enfermedad estable en 6 pacientes (*Rosenberg*); otro estudio utilizó péptidos del antígeno asociado a melanoma con respuesta en 17 de 31 pacientes (*Mackensen*) y en otro estudio se ha demostrado la inducción de la respuesta inmune inducida con DC inmaduras mediante la prueba de hipersensibilidad retardada a KLH (Keyhole limpet hemocyanin) para verificar la inducción de la respuesta inmune con DC inmaduras, observando inducción de la hipersensibilidad en los 16 pacientes con respuesta objetiva en el melanoma en 5 de 16 pacientes (*Nestle*). En linfoma de células B se han aplicado vacunas de DC maduras sensibilizadas con la fracción ideotípica de su inmunoglobulina (*Hart, Osterroth*), siendo administradas un promedio de 5×10^6 DC vía percutánea con un reforzamiento posterior con antígeno tumoral con respuesta clínica en 3 de 4 pacientes (*Hsu*). En cáncer de próstata se ha demostrado la presencia de DC infiltrantes (*Troy*), que ha sustentado el uso de DC sensibilizadas con el antígeno prostático específico de membrana (APEM) comparado con DC solas y el péptido APEM para la estimulación antigénica, observando disminución del APEM sérico en 5 de 9 pacientes (*Lodge, Salgaller*), encontrándose a la fecha protocolos fase III en desarrollo (*Dendron*).

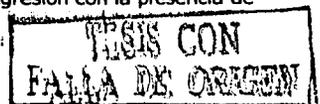
La vía de aplicación ha sido intravenosa e intracutánea en pacientes con melanoma, encontrando mejor respuesta posterior a la aplicación intradérmica por su migración a los ganglios linfáticos, comparado con la infusión intravenosa donde se localizan en hígado y bazo con una respuesta eefectora muy disminuida (*Enk, Thurner*). Esto es una condición para la inmunoterapia efectiva para la adecuada estimulación y presentación antigénica por las DC, aunado con la migración a la periferia de los ganglios linfáticos para entrar en contacto con células T y estimular la respuesta inmune

primaria. Esta migración se da preferentemente tras su aplicación cutánea, por ser los vasos linfáticos cutáneos la vía de movilización hacia los ganglios linfáticos. Este proceso de migración se asocia a la maduración observada como el incremento de expresión de CD86 y MHC-II en las DC para la presentación y estimulación antigénica (*Austyn*).

Células Dendríticas en cáncer renal

La presencia de un infiltrado tumoral incrementado en la concentración de DC y su distribución heterogénea en el CaR, supone la posibilidad de despertar una respuesta inmune citotóxica en la neoplasia (*Thurnher*), sin embargo, algunos autores han demostrado la capacidad de presentación antigénica intratumoral suprimida intra tumoral por ser DC maduras con una consecuente menor capacidad de captura antigénica (*Mulders*) y con una inadecuada estimulación de los linfocitos T por supresión de la expresión de B7 en la membrana (*Chaux*) que pudiera incluso resultar en una inducción de tolerancia contra el mismo tumor. La evidencia anterior, aunado con la posibilidad de generar DC funcionantes y en cantidades adecuadas de sangre periférica de pacientes con CaR (*Radmayr*), y los estudios *in vitro* que han verificado la respuesta inmune antineoplásica mediante la cuantificación de citocinas (IFN- γ para polarizar la respuesta hacia Th1) (*Gitlitz*) y capacidad de estimulación de linfocitos T (*Hinkel*); se ha sugerido que el uso de las DC como inmunoterapia permitiría aprovechar los diversos antígenos neoplásicos para inducir una respuesta inmune policlonal contra múltiples blancos en la neoplasia, y plantea que las DC pueden actuar como células coordinadoras de una respuesta tipo Th1 por la inducción de la secreción de citocinas y su efecto de lisis tumoral.

Las DC en la inmunoterapia se ha utilizado en estudios fase I y II en CaR. Estos estudios han demostrado que es posible la generación de DC inmaduras a partir de monocitos derivados de pacientes con CaR con la posterior maduración con TNF- α ; y aplicación como inmunoterapia sin efectos adversos y se asocia con respuesta inmunes y clínicas. La aplicación de inmunoterapia mediada por DC en CaR se ha reportado en diferentes modalidades como son: vacunas de DC maduras (bajo estímulo con TNF- α con PGE-2) sensibilizadas con lisado tumoral en 4 pacientes, observando una correlación entre progresión con una respuesta tipo Th2 y regresión con la presencia de



respuesta de hipersensibilidad retardada asociada a una respuesta Th1. En otros estudio se ha estimulado a las DC maduras con antígeno tumoral obtenido a partir del lisado del cáncer (*Holt*), utilizando liposomas, heteroconjugados de tumor-DC, RNA tumoral (*Heiser*) o formando híbridos por electrofusión (*Kugler*). En un estudio utilizando tres infusiones intravenosa de DC maduras sensibilizadas con lisado tumoral y KLH se observó respuesta parcial en un paciente y estabilidad del CaR en 7 con progresión en 5 (*Holt*). En otro estudio se utilizaron liposomas catiónicos para la carga de las DC con lisado tumoral aplicándose en 3 ocasiones en 5 pacientes observando una respuesta parcial por un periodo corto de tiempo (*Giltitz*). Finalmente, el estudio con mejor respuesta clínica hasta en el 8 de 18 pacientes, observada como remisión completa en 5/18 y respuestas del 50% en 3/18; se obtuvo mediante la aplicación de híbridos DC-tumor via subcutánea en dos ocasiones (*Kugler*).

Planteamiento del problema

Las DC han demostrado ser la mejor terapia para el CaR metastásico teniendo una tasa de efectividad de hasta el 40%. Hasta la fecha no se ha planteado el uso de inmunoterapia diferente de la aplicación de citocinas en pacientes con cáncer renal metastásico en nuestro país.

La terapia inmune mediada por DC no se ha establecido en México como una opción de tratamiento en cáncer avanzado, teniendo la posibilidad de mejorar las tasas de respuesta aprovechando la capacidad inmunoreguladora de las DC.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hipótesis

Los pacientes con cáncer renal metastásico presentan una respuesta inmune inefectiva, que con inmunoterapia a base de DC derivadas de monocitos sanguíneos presentan diferentes respuestas inmunológicas al tratamiento manifestadas clínicamente.

Objetivos

General

Evaluar la respuesta clínica inducida posterior a un esquema de inmunoterapia mediada por el uso de DC derivadas de monocitos sensibilizadas

Objetivos Particulares

1. Estandarizar la generación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica mediante un esquema de maduración previamente establecida en la literatura.

2. Aplicar en pacientes con CaR metastásico una terapia inmunológica mediada por DC maduras derivadas de monocitos de sangre periférica autólogos, sensibilizados con lisados tumorales procedentes de biopsias renales y el antígeno KLH como trazador inmunológico.

3. Analizar la respuesta clínica a la inmunoterapia con DC en pacientes con CaR metastásico.



MATERIALES Y METODOS

Este protocolo fue aceptado por la Coordinación del Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Dr. Salvador Zubirán" con número de referencia: 968. Como estudio fase I de aplicación de inmunoterapia mediada por DC en pacientes con CaR metastásico.

Se incluyeron un total de 6 pacientes con CaR sistémico (estadio III o IV). Como criterios de inclusión se fueron una esperanza de vida mayor de 4 meses, un índice de Karnofsky de calidad de vida mayor del 60%, ser mayor de 18 años y que firmen el consentimiento informado.

Los criterios de exclusión incluían: pacientes sin diagnóstico histopatológico de CaR de células claras, CaR estadios I o II, inmunosupresión severa de cualquier etiología o enfermedad autoinmune (excepto vitiligo), CaR con metástasis cerebrales, enfermedad psiquiátrica considerable, insuficiencia hepática o renal severa, evidencia de otra neoplasia primaria activa, embarazo, lactancia, falta de tejido viable para la estimulación de las DC, síndrome de malabsorción, infección severa en las últimas 2 semanas, leucopenia $<3,000/\text{mm}^3$ y cualquier contraindicación para la realización de leucoféresis.

Los pacientes con CaR sistémico, candidatos a la inmunoterapia mediada por DC autólogas con diagnóstico radiológico establecido, fueron sometidos a una nefrectomía radical por abordaje toracolumbar o lumbotomía. De la pieza quirúrgica se seleccionó el tejido tumoral sin necrosis central para utilizarse como fuente de antígeno tumoral, que se proceso mediante ruptura mecánica utilizando un homogeneizador. Las muestras, resuspendidas en medio RPMI 1640, fueron centrifugadas a $14,000 \times g$ a 4°C durante 30 min y posteriormente filtradas a través de filtros de $0.2\mu\text{m}$. Finalmente, se determinó la concentración proteica por medio de la técnica de Bradford y las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Durante su recuperación postoperatoria, los pacientes fueron sometidos a la prueba de hipersensibilidad cutánea retardada (DTH) frente a varios antígenos de

recuerdo, con el fin de determinar el *status* inmunológico de cada paciente contra antígenos de memoria, que incluyeron candidina, tricoftina y PPD.

Obtención de DC para la inmunoterapia.

Se evaluó el estado general de los pacientes y se realizó una citología hemática antes de ser sometidos a leucoféresis, utilizando el programa para células mononucleares de sangre periférica. Una vez obtenidas, las células procedentes de la leucoféresis se sometieron a un gradiente de ficoll (Lymphoprep, de Nycomed pharma AS), para separar las células mononucleares (PBMC). Una parte de las células se congeló para realizar las vacunas posteriores. Otra parte se resuspenderá en medio completo (RPMI 1640 suplementado con suero humano inactivado a 56°C [10%], L-glutamina 2mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, 2-mercaptoetanol 50µM, penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml -Gibco BRL-) a una concentración de 50×10^6 células/10ml de medio. Las células se sembraron en placas Petri de 100mm durante 1h a 37°C para poder así seleccionar a los monocitos por adherencia. Los monocitos adheridos se cultivaron en 10 ml de medio completo suplementado con GM-CSF (1000 U/ml, Novartis) e IL-4 (15 ng/ml, Calbiochem) durante 6 días a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂. En el día 5 de cultivo se añadió al medio el lisado tumoral a una concentración de 100 µg/ml y el trazador inmunológico KLH a una concentración de 50 µg/ml, y el sexto día se les administró TNF-α y PGE-2, como estímulos de maduración con una nueva administración de antígeno tumoral y KLH. La vacuna consistió, entonces, de DC maduras (6 días de cultivo) y pulsadas con antígeno tumoral y KLH durante las últimas 24h.

Para su aplicación, las DC (5×10^6 células) fueron resuspendidas en 6 ml de solución fisiológica suplementada con 40 ng/ml de TNF-α (Genzyme). La vacuna se administró de forma intradérmica sobre los ganglios supraclavicular, inguinal y axilar en forma bilateral. El esquema de aplicación fue semanal durante 5 semanas. Transcurrida la última vacuna se realizaron los estudios de tomografía axial computarizada para evaluar la respuesta clínica de los pacientes siguiendo el esquema de seguimiento postoperatorio recomendado por la Sociedad Europea de Urología en el 2000, con las modificaciones de acuerdo a cada paciente para el seguimiento de metástasis previamente detectadas (Tabla 1).

RESULTADOS

Se incluyeron un total de seis pacientes con diagnóstico de cáncer renal de células claras, con metástasis a pulmón. A continuación se enumeran las características clínicas de los pacientes, conforme se fueron incluyendo en el protocolo.

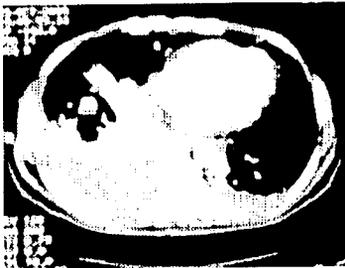
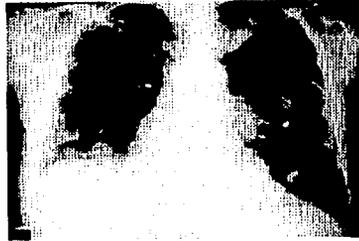
Resumen clínico de casos

• CASO I.

RAG, es un paciente masculino de 66 años de edad, con fecha de nacimiento 8 ago 34 y lugar de nacimiento el Distrito Federal. AHF: con historia de diabetes mellitus y cáncer de mama; ningún otro de importancia para su padecimiento. APNP: nivel socioeconómico alto, con hábitos higienicodietéticos adecuados en cantidad y calidad, tabaquismo positivo intenso, Etilismo social con Grupo sanguíneo O+ y Combe negado. APP: Diabetes Mellitus no insulino dependiente, controlada con hipoglucemiantes orales y dieta, hipertensión arterial sistémica controlada farmacológicamente con monoterapia. Antecedente quirúrgico de discoidectomía. Su padecimiento lo inicia con una masa en fosa renal derecha, con sensación de plenitud postprandial, pérdida de peso mayor de 10kg, astenia, adinamia y ataque al estado general. Como parte de su evaluación se realizó USG que mostró una masa renal derecha, heterogénea, que se verifica en la tomografía con lo que se estableció el diagnóstico de Ca renal derecho con trombo en vena renal con múltiples adenomegalias retroperitoneales y bilaterales pulmonares en múltiples sitios. Se realizó angiografía para planear la Nefrectomía radical derecha que cursó sin complicaciones. El reporte de patología fue de: adenocarcinoma renal mal diferenciado con bordes quirúrgicos positivos, trombo en vena renal y ganglios regionales metastásicos. T4, N2, M1. El paciente ingresó al protocolo, realizándose exanguinaciones semanales para la obtención de monocitos de sangre periférica, durante estas visitas cursó asintomático, durante las aplicaciones de las vacunas, negó síntomas de efectos colaterales, sin embargo, en la tomografía de control se observó progresión, por lo que fue excluido para ser manejado con interferón, sin embargo falleció.

Caso I

Metástasis pulmonares



TAC tórax con metástasis y derrame



RMN con cáncer renal



Gamagrafia con exclusión renal



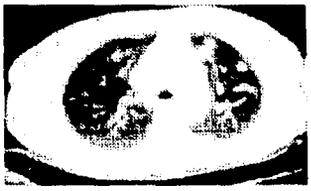
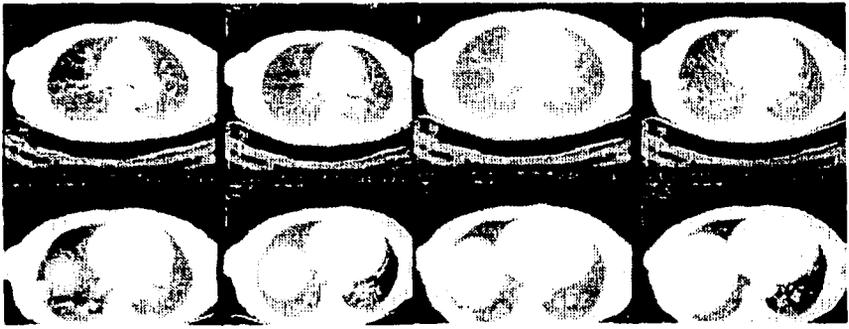
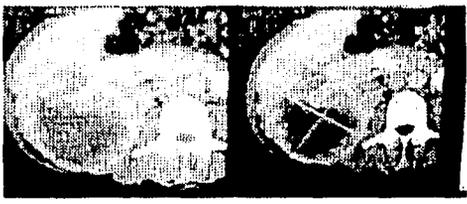
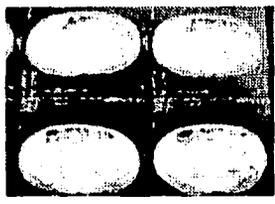
Angioresonancia sin involucro vascular

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CASO II

- WS es una paciente femenina de 59 años de edad, con fecha de nacimiento el 22 septiembre de 1943 en Primorsky Rusia con Reg: 198278. El interrogatorio de la paciente se realizó mediante la hija y nieta, dado que la paciente no habla español y se encontraba de visita en el país. Como antecedentes cuenta con: AHF: padre con TEP, hermano con hipotiroidismo, resto interrogados y negados. APNP: nivel socioeconómico medio, con hábitos higiénico dietéticos regulares en cantidad y calidad, tabaquismo negado y etilismo social. Grupo sanguíneo O+ con Combe negativo. AGO: menarca a los 14 años de edad, con ciclos eumenorréicos y regulares, G-4, P-0, C-1 gemelar, A-3, con fecha de último parto 1971, con ciclos actuales irregulares. APP: fractura de clavícula y muñeca izquierda en 1999 postraumáticas con 3 transfusiones previas no especificadas. Refiere que durante su padecimiento actual presentó pérdida de peso de 23kg desde feb 2000, asociado a anemia ferropénica, astenia y adinamia. Por lo anterior acudió con facultativo que solicitó teleradiografía de tórax, en la que se encuentran 3 metástasis basales derechas y una apical izquierda. Se le realizó una tomografía donde se diagnostica una neoplasia renal derecha asociada a ganglios retroperitoneales y 16 metástasis en forma bilateral y panpulmonares. En el gamagrama óseo se observan zonas hipercaptantes compatibles con lesión metastásica en el 10º arco costal izquierdo. Sus laboratorios al ingreso incluyeron: leu 6.3, HGB 7.1, HTC 21.7, plaq 649, linfos 24, monos 6, seg 66, eos 4, baso 0; glu 103, creat 0.8; fosf alc 227, prot 7, alb 1.9, bil tot 0.6, TGP 17, TGO 14, CPK 8, DHL 98; TP 11.8, TPT 32; EGO con leucos y cel epiteliales. Se le realizó el 12 de marzo una nefrectomía radical derecha, de la que se reportó: carcinoma de células claras grado nuclear IV, con áreas sarcomatoides, con bordes negativos. Su evolución durante la aplicación de las vacunas fue sin complicaciones, no se reportaron efectos adversos, con pérdida de peso, disnea y ataque al estado general, secundarios a la progresión de las metástasis pulmonares, lo que ocasionó su muerte el 4 de julio del 2000.

Caso II

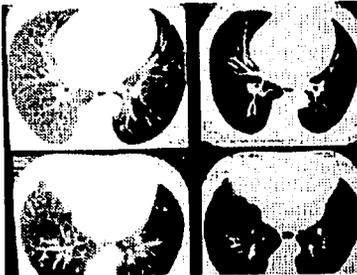
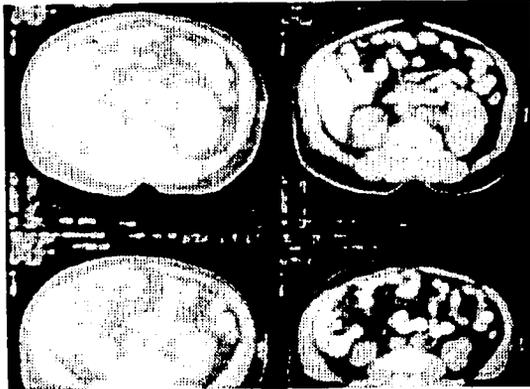


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caso III

- FMP es un paciente masculino de 63 años de edad con registro: 198434, su fecha de nacimiento es el: 11-5-38, en México DF. Como antecedentes cuenta con: AHF: padre con cirrosis hepática alcoholo-nutricional, hermanos con DMNID controladas con hipoglucemiantes orales. APNP: nivel socioeconómico bajo, con adecuados hábitos higiénico-dietéticos, etilismo positivo de pulque por 20-35 años, actualmente social sin llegar a la embriaguez, tabaquismo negado, Combe negado. APP: eruptivas de la infancia, postoperado de apendicectomía, y posteriormente su hernia umbilical. También cuenta con antecedente de urolitiasis e hiperuricemia sin acudir a la consulta regularmente y mal apego a los diferentes esquemas de tratamiento. Inició en noviembre del 2000 cuando se le solicita un USG en el que se observa una masa renal y litiasis bilateral y hematuria. A la exploración física se encontró dentro de límites normales sin datos que afecten la historia natural de la enfermedad. Sus laboratorios al ingreso fueron: EGO hematuria, creat 1.5, glu 108, dhl 142, hgb 14.6, leu 5.2, plaq 220, P alc 123, PFH nl, BH nl dep creat 27.7. El ultrasonido de mar'01 reporto pielonefritis renal derecha con neoformación renal izquierda. Esto se verifico por tomografía en la que se confirma tumoración en polo renal izquierdo con metástasis pulmonares bilaterales. Fue sometido a una nefrectomía radical izquierda el 6 de abril del 2001, reportando patología un Carcinoma de Células Claras de RI con bordes negativos, grado nuclear II. El paciente fue manejado con vacunas con células dendríticas, sin complicaciones y adecuada tolerancia. En su seguimiento permaneció con enfermedad estable durante un año, posteriormente al documentar progresión en las metástasis pulmonares, se le inicio tratamiento con talidomida, que fue bien tolerado con adecuada respuesta y regresión de las lesiones que habían progresado.

Caso III



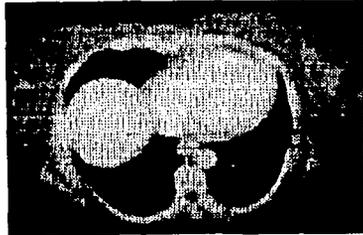
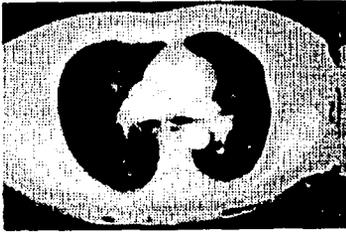
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caso IV

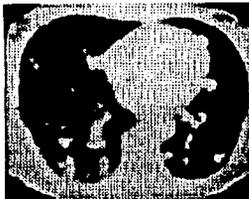
- ERC es una paciente femenina de 65 años, con Registro 200288. Su lugar de nacimiento y residencia es el Distrito Federal. Como antecedentes cuenta: AHF: positivos para EVC y DM. APNP: nivel socioeconómico medio, con adecuados hábitos higiénico dietéticos, tabaquismo y etilismo negados, Combe negativo, sin antecedentes alérgicos. APP: presento sepsis abdominal post-cesarea que resolvió sin complicaciones, DM controlada con dieta e hipoglucemiantes orales. Inició su padecimiento con perdida de peso no cuantificada, asociada a episodios de diaforesis y lumbalgia. Por lo que se le realizaron estudios de gabinete, que demostraron una neoplasia renal izquierda, que en la tomografía axial computada se identifica una tumoración renal izquierda con ausencia de involucro a tejidos adyacentes, con presencia de dos metástasis pulmonares, en forma bilateral en hilio y base, respectivamente. En base a lo anterior y con estudios de extensión completos, se le sometió a una nefrectomía radical izquierda, que cursó sin complicaciones, de la que se reporto por patología un Carcinoma de células claras grado 4 en riñon izquierdo con bordes negativos sin involucro vascular. La paciente se ingresó al protocolo de células dendríticas, en la que se le administraron las vacunas, sin complicaciones, con adecuada tolerancia, sin efectos adversos de importancia. Sin embargo, la paciente notó deterioro progresivo posterior a la quinta vacuna, con perdida de peso, astenia, adinamia, anorexia y ataque al estado general, que se manejo por la consulta con suplemento alimenticio y analgésicos. La paciente progresó en su deterioro, siendo sometida a una tomografía posterior a la última vacuna, en la que observó una progresión importante en cuanto al número y tamaño de las metástasis pulmonares. La paciente falleció el 1º diciembre del 2001 por progresión de la enfermedad con el diagnóstico de insuficiencia respiratoria. A pesar de la progresión la paciente tolero adecuadamente las vacunas sin efectos adversos.

Caso IV

Preoperatoria



Postvacunación



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caso V

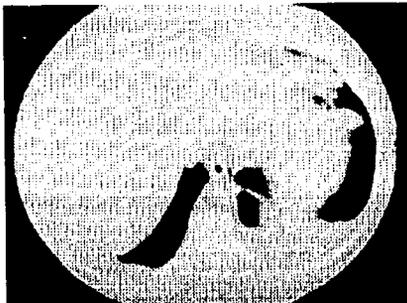
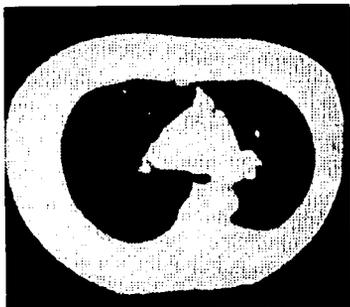
- JHG, es un paciente masculino de 47 años; con registro 200983. Su fecha de nacimiento es el 26 de mayo de 1954, con lugar de nacimiento y residencia, Michoacán. Su ocupación es campesino. Como antecedentes de importancia contaba con: AHF: madre diabética, padre finado por TCE. Con 8 hermanos y 9 hijos sanos. APNP: nivel socioeconómico bajo, con hábitos higiénico dietéticos regulares en cantidad y calidad, refiriendo etilismo ocasional sin llegar a la embriaguez, tabaquismo negado, Combe negativo. APP: antecedentes de litiasis urinaria a los 32 años con expulsión espontánea del lito, sin manejo posteriormente. Inició su padecimiento en abril del 2001 con lumbalgia incapacitante que se asoció a hematuria macroscópica, sin coágulos en los últimos 3 meses por lo que se le realizó una TAC toracoabdominal, en la que se observó una masa renal izquierda. Lo anterior se asoció a una pérdida ponderal de 4kg. Dentro de su valoración se realizó TAC abdominal con la presencia de la neoplasia renal izquierda, en las imágenes torácicas se encontraron dos lesiones metastásicas de 5mm. Por lo anterior fue sometido a una nefrectomía radical el 13 de agosto del 2001, cursando el periodo postoperatorio sin eventualidades ni complicaciones. El examen microscópico de la pieza reportó un carcinoma de células claras renales, grado III, tamaño de 4.6cm, sin invasión a cápsula, con metástasis a ganglio del hilio y periaórtico, con bordes negativos. El paciente refirió en el postoperatorio la presencia de pseudohernia en el sitio de la intervención quirúrgica asociado a fatiga intermitente, sin anorexia, ni pérdida de peso. El paciente refirió que posterior a la 5 y 6ª vacunas, presentó como efecto adverso leve: fiebre menor de 29°C, dentro de las primeras 24hrs de estas vacunas; que remitía espontáneamente o con la administración de 200mg de paracetamol, negó otros síntomas de efectos adversos. El paciente se integró a sus actividades laborales del campo, sin complicaciones, con actividades físicas intensas, negando datos de dificultad respiratoria.
- Este es el único caso de un efecto adverso leve, que se autocontrolaba y solamente se presentó en dos periodos posteriores a la aplicación de las vacunas. Este paciente, no presentó ningún efecto adverso serio, se encuentra actualmente con enfermedad estable y sin secuelas ni datos de autoinmunidad.

Caso V

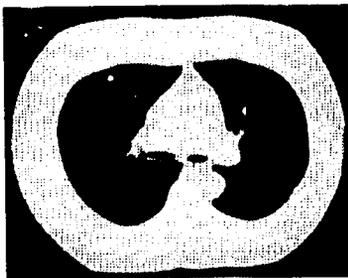
Preoperatorias

Inmunoterapia con Células Dendríticas en Cáncer Renal

22-a



Postvacunación

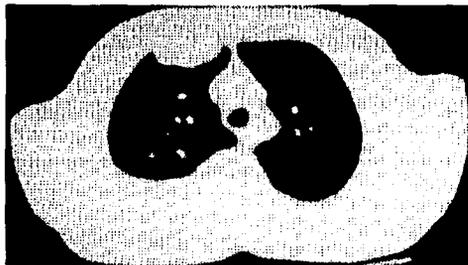
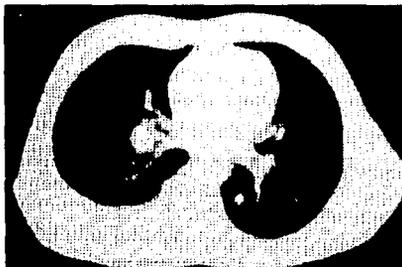
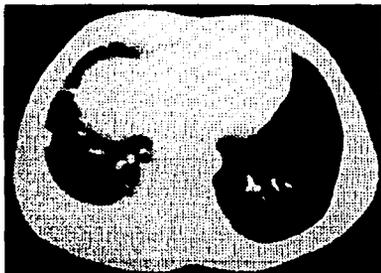
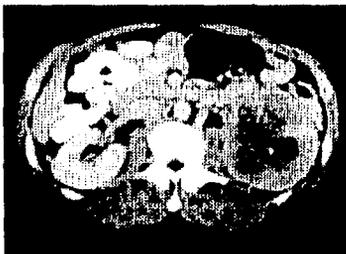
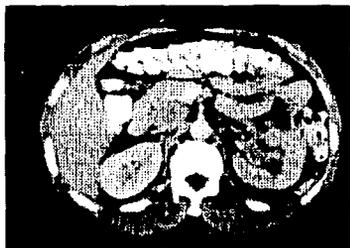


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caso VI

- AHC, es un masculino de 42 años de edad, con registro 204542, su fecha de nacimiento es el 13 de septiembre de 1960, su lugar de nacimiento y residencia es el Distrito Federal. Con ocupación cargador. Como antecedentes se mencionaron: AHF madre finada por IAM, 4 hermanos sanos y, dos con DM, sin descendencia. APNP: nivel socioeconómico bajo, sus hábitos higiénico dietéticos son deficientes en cantidad y calidad, tabaquismo positivo con IT 2, etilismo social sin llegar a la embriaguez, Combe negado, sin antecedentes alérgicos. APP: negativos para su padecimiento actual. El inició su padecimiento en noviembre del 2002, caracterizado por dolor abdominal moderado, en la región lumbar izquierda, asociado a pérdida ponderal de 10kg aproximadamente. Durante evaluación de gabinete se encuentra la masa renal izquierda. Que por ultrasonido se identificó como una masa dependiente del polo inferior izquierdo, con ecos heterogéneos en su interior. La tomografía verifico el diagnóstico de neoplasia renal izquierda en el polo renal izquierdo, de dimensiones 10x9 cm de longitud, asociado a esta, la presencia de un trombo importante en la vena cava inferior por lo anterior fue sometido a una nefectomía radical izquierda el día 18 de marzo del 2002, durante la cirugía se comporto hemodinamicamente estable, sin embargo es importante considerar que la masa de adenomegalias y el trombo tumoral de la vena cava no fueron posibles reseca durante el tiempo quirúrgico, por la localización y friabilidad de estos tejidos, por lo que se aplicó una sutura con objeto de lograr cierta hemostasia y primordialmente para la fijación del trombo en la vena. El análisis histológico de la pieza fue reportada por Patología como un carcinoma renal convencional grado IV con involucro a cápsula, con bordes quirúrgicos negativos, trombo en vena renal residual. El paciente se manejo en el postoperatorio sin complicaciones, se iniciaron las vacunas de células dendríticas, con adecuada tolerancia, sin efectos adversos. El paciente se encuentra actualmente con enfermedad estable, sin datos de autoinmunidad, realizando actividades físicas intensas sin dificultad e integrado a su vida diaria normal.

Caso VI



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Características de las vacunas

Las vacunas se prepararon de acuerdo a la metodología previamente descrita, sin embargo, es importante considerar, que las características ni comportamiento de los monocitos de sangre periférica para adherirse a las placas de petri es muy variable, lo que puede explicar los resultados tan variables en cuanto al número de las células dendríticas que integraban cada vacuna, sin embargo, esto no ha demostrado importancia clínica en cuanto al manejo y metodología para la preparación de células dendríticas como inductoras de la respuesta inmune.

Paciente	RAG	VVS	FMP	ERC	JHG	AHC
1ª	1 x10 ⁶	5 x10 ⁶	9 x10 ⁶	8 x10 ⁶	6 x10 ⁶	6 x10 ⁶
2ª	3 x10 ⁶	2 x10 ⁶	16 x10 ⁶	9 x10 ⁶	5 x10 ⁶	6 x10 ⁶
3ª	4 x10 ⁶	2 x10 ⁶	16 x10 ⁶	5 x10 ⁶	8 x10 ⁶	4 x10 ⁶
4ª	6 x10 ⁶	3 x10 ⁶	9 x10 ⁶	5 x10 ⁶	6 x10 ⁶	6 x10 ⁶
5ª	6 x10 ⁶	3 x10 ⁶	6 x10 ⁶	4 x10 ⁶	9 x10 ⁶	4 x10 ⁶
6ª	---	1 x10 ⁶	5 x10 ⁶	4 x10 ⁶	5 x10 ⁶	----
Promedio	4 x10 ⁶	2.6 x10 ⁶	10.1 x10 ⁶	11.6 x10 ⁶	6.5 x10 ⁶	5.2 x10 ⁶

El número de células dendríticas de cada vacuna representa las derivadas de 100 x 10⁶ células mononucleares que se dejaron adherir durante una hora a 37°C, posterior a lo cual se siguió el protocolo habitual de diferenciación a células dendríticas. El Promedio global de todas las vacunas fue de 6.66 x10⁶ células dendríticas aplicadas en los pacientes en forma intradérmica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Respuesta clínica de los pacientes

En un intento de cuantificar objetivamente la progresión o respuesta de enfermedad estable se cuantificaron el número de metástasis y volumen aproximado en la tomografía axial computarizada de los pacientes en los estudios de estadiaje antes y después de la administración de las vacunas de células dendríticas como inmunoterapia.

Pacientes	VVS	FMP	ERC	JHG	AHC
Nº mets preTx	37	41	9	2	6
Volumen preTx	80mm	51mm	14mm	3mm	mm
Nº mets postTx	147	53	95	2	6
Volumen postTx	320mm	42mm	290	3mm	mm
% progresión	400%	-18%	1,000%	0%	0%

Como se había mencionado previamente, tres pacientes presentaron progresión de las metástasis pulmonares que les ocasionó su muerte por insuficiencia respiratoria. Sin embargo en 3 de los 6 pacientes, se encontró enfermedad estable, incluso en FMP, se observó regresión de algunas metástasis, y progresión de otras. Todo lo anterior nos aporta una respuesta clínica evaluable objetivamente de la participación de la respuesta inmune inducida mediante la administración de células presentadoras de antígeno tumoral, y todo lo anterior sin efectos adversos de importancia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEM

Células mononucleares obtenidas por leucoféresis

A continuación se exponen las cifras obtenidas a partir de leucoféresis, técnica que se implemento en nuestros pacientes como metodología estándar para la obtención de células mononucleares de sangre periférica para la posterior purificación de los monocitos por adherencia en las cajas de Petri, sitio en las que se lleva a cabo el cultivo y diferenciación a células dendríticas.

	VVS Pre	VVS Post	VVS bolsa	FMP Pre	FMP Post	FMP Bolsa	ERC Pre	ERC Post	ERC Bolsa	AHG Pre	AHG Post	AHG bolsa
Hgb	9	7.2	0.9	13.7	11.6	3.9	12.6	10.1	0.5	15.1	43.6	1.8
Htc	27	22	3.0	41.2	35.2	11.6	39.1	31.5	1.2	44.2	14.6	5.2
RBC	3.4	2.7	0.38	4.56	3.89	1.28	4.85	3.87	0.14	4.99	--	0.57
MCV	--	80	78.7	90.4	90.5	90.7	80.1	81.2	80.9	88.7	--	87.9
MCH	--	25	23.8	30.1	29.9	30.3	26.1	26.1	32.6	30.3	--	30.7
MCHC	--	32	30.2	33.1	33.0	33.4	32.3	32.1	40.2	34.1	--	34.9
RDW	--	20	19.8	13.2	13.3	16.0		16.7	15.5	13.2	--	13.8
Plaq	499	327	291	218	155	1,760	403	248	2,140	234	163	1,370
WBC	8.6	6.5	82	6.3	6.1	31.3	7.8	6.7	51.1	5.9	4.6	49
Neu	68	65	12.4	75.2	77	19.5	67.1	70.0	38.1	65.1	--	40.9
Lymp	21	25	69.2	18.2	15.4	57.1	21.9	30.6	45.5	25.8	--	51.6
Mo	7	6	16.8	4.8	5.3	23.4	8.3	7.6	15.4	5.5	--	6.9
Eos	3	4	0.4	1.8	1.7	0	12	1.8	0.5	3.6	--	0.6
Ban	0	0	1.2	0	0.3	0	1.5	0	0.5	0	--	0

Como se puede observar, los rendimientos en número de células mononucleares en sangre periférica se incrementan en forma importante como resultado del uso de la leucoféresis para la obtención de estos elementos formes de la sangre. También es muy importante resaltar, como las proporciones de linfocitos, neutrófilos, natural killers y monocitos, se modifican en los elementos formes obtenidos por esta técnica. Una de las explicaciones que se plantean es la movilización resultado de estos diferentes ciclos requeridos para la realización de leucoféresis en vías venosas periféricas. Con lo que respecta al manejo posterior, es importante mencionar que las células mononucleares obtenidas por leucoféresis se comportaron mejor en lo que concierne a los cultivos y separación por ficoll de los eritrocitos restantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

En cuanto a la histología en cáncer renal, el adenocarcinoma o carcinoma de células claras renales representa el 85% de todas las neoplasias renales (Landis). Recientemente se ha encontrado un incremento en la incidencia de estas neoplasias, que puede ser atribuido a su detección incidental gracias al avance en las técnicas no invasivas de imagen, que han logrado gran difusión. Esto se refleja en los reportes del Instituto Americano de Cáncer, demuestran un incremento estable en la incidencia de CaR de 2 a 4% por año entre 1975 y 1995 (Chow).

Por otra parte, el 25 a 30% de los pacientes con CaR se diagnostican con estadios avanzados. El retraso en el diagnóstico pudiera deberse a la capacidad del retroperitoneo para retener masas de grandes dimensiones sin ocasionar sintomatología local (Guinan). Esto es de gran trascendencia, debido a la falta de respuesta de estos pacientes con CaR metastásico a las terapéuticas actuales, debido a su quimioresistencia y radioresistencia. Todo lo anterior ha llevado a la búsqueda de nuevas perspectivas para el tratamiento de estos pacientes.

La perspectiva de la inmunoterapia en cáncer renal (CaR) se basa en reportes de remisión espontánea en el 1% de los CaR metastásicos, y más recientemente en el reconocimiento de ciertos antígenos asociados al tumor (como G-250). Estos nuevos esquemas de tratamiento, han mejorado la historia natural de la enfermedad metastásica.

Las estrategias de inducción de una respuesta inmune contra las metástasis del CaR, se pueden englobar en tres grandes rubros:

- Administración de citocinas.- con el objeto de incrementar la actividad de las células efectoras existentes en los individuos con CaR, utilizando proteínas que incrementen la respuesta inmune. (Interferon alfa, Interferon gama e Interleucina 2).
- Abordajes de inmunización pasiva.- consiste en conferir una respuesta inmune antitumoral específica, mediante la administración de

componentes que convergen en una actividad antitumoral específica. Que a su vez se subdividen en: Inmunoterapia adaptativa.- cuando se administran agentes biológicos con actividad antitumoral establecida (Células asesinas activadas con linfocinas, Linfocitos infiltrantes de tumor, Autolinfocitos activados, etc). Terapia con anticuerpos monoclonales.- utilizados con aplicaciones diagnósticas o terapéuticas. Inducción de una respuesta injerto contra huésped.- se transplantan células progenitoras sanguíneas alogénicas.

- **Abordajes de inmunización activa.-** implican la inducción de una respuesta inmune antitumoral en el paciente, mediante la administración de antígenos o componentes del sistema inmune. Como ejemplos se tienen: Vacunas derivadas de células tumorales.- tiene como objetivo inducir una respuesta antitumoral en el individuo portador del tumor, mediante la inducción de novo de linfocitos T efectores tumor específico. La administración del antígeno tumoral autólogo con adyuvantes para incrementar su inmunogenicidad y así su respuesta, que también se logra mediante la administración de antígenos tumorales alogénicos o antígenos de tumores modificados genéticamente. Otro gran rubro son las vacunas con células dendríticas.- son las células presentadoras de antígeno más eficientes del organismo, en conjunto con su capacidad de inducción de una respuesta primaria en linfocitos T, las ha convertido en un abordaje muy atractivo en la inmunoterapia; y estas pueden estar sensibilizadas con antígenos mediante pulsos con péptidos, lisado tumoral o mediante la formación de híbridos célula dendrítica-célula tumoral o vía la transfección con vectores virales.

Todos estos abordajes de inmunoterapia nos evidencian la existencia de abordajes, que sin embargo requieren de la evaluación de predictores clínicos que pudieran ayudar en la elección del tipo de estrategia terapéutica que se aplicaría en cada individuo.

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más potentes, y por lo mismo, juegan un papel central en la regulación, maduración y mantenimiento de la respuesta inmune contra el cáncer, gracias a su capacidad promotora de supervivencia de linfocitos T y su selección en órganos linfoides secundarios. Lo que las ha convertido en un prospecto muy atractivo como elemento iniciador de una respuesta inmune efectiva antitumoral.

Dentro de las estrategias para la sensibilización de las células dendríticas incluyen: la administración de antígeno tumoral (péptidos sintéticos derivados de antígenos tumorales conocidos, lisado tumoral, ARN mensajero derivado del tumor o tumor apoptótico), la formación de híbridos tumor:célula dendrítica o transformación in vivo mediante la administración de citocinas.

Entre las limitantes del uso de lisado tumoral es la necesidad de tener acceso a suficiente tumor autólogo, así como la restricción en la aplicación individualizada. Sin embargo, otro riesgo sería la inducción de autoinmunidad, por tratarse de lisados que contienen células con péptidos de membrana, contra los que se pudiera inducir una respuesta inmune. Existen reportes de presencia de vitiligo en pacientes tratados por melanoma, probablemente debido a una reacción cruzada con los melanocitos normales, así como un caso en la Universidad de Pittsburg, que presentó artritis reumatoide sintomática al utilizar células dendríticas (el paciente contaba con factor reumatoide positivo pre tratamiento). A pesar de lo anterior, hasta la fecha no existe ningún reporte de inducción de autoinmunidad en pacientes bajo tratamiento con células dendríticas.

El riesgo de autoinmunidad es un elemento importante a considerar en pacientes bajo tratamiento con inmunoterapia, sin embargo, en ninguno de nuestros pacientes, se encontró algún dato que pudiera sugerir la inducción de algún tipo de respuesta autoinmune. Esto se explicaría parcialmente por las características inmunogénicas de los tejidos autólogos, así como el antecedente de tratarse de pacientes inmunocomprometidos por su neoplasia de base (Dallal).

Existen pocos estudios reportados del uso de células dendríticas como inmunoterapia, sin embargo, existen diversos éxitos en la literatura. Estos estudios son difíciles de comparar debido a que no existe un estándar aceptado en el diseño de estos protocolos.

En un intento de establecer una metodología en la generación reproducible de células dendríticas para inmunoterapia, en conformidad con las prácticas de buena manufactura, existen reportes que optimizan el número de células dendríticas, su madurez y estabilidad para la inmunoterapia (Turner). Estas modificaciones en el protocolo de generación de las células dendríticas se aplico en nuestro protocolo, que se refleja en las cifras que se administraron en nuestros pacientes. Sin embargo es muy importante considerar las diferencias implícitas a la técnica, en conjunto con el diferente comportamiento de los monocitos derivados de diferentes individuos. Lo anterior explica las diferencias entre cada paciente y entre cada vacuna.

Uno de los estudios más interesantes de la inmunoterapia en cáncer renal es el de Kugler en el que incluye 17 pacientes con cáncer renal metastásico que fueron vacunados con un heteroconjugado, con un seguimiento de 13 meses. En este protocolo, las células dendríticas eran derivadas de donadores sanos halogénicos, con un fenotipo maduro, administradas en forma subcutánea trimensualmente. Cuatro pacientes presentaron una respuesta completa prolongada, dos con una respuesta parcial y dos con enfermedad estable, observando progresión en los nueve restantes, con el 65% de los pacientes presentando una respuesta positiva de hipersensibilidad cutánea retardada (Kugler).

Lo anterior traduce que son las células dendríticas pulsadas con antígeno tumoral, las que inducen efectivamente una respuesta tipo Th1 en pacientes con cáncer que presentan respuesta contra la neoplasia, sin provocar una toxicidad significativa (Schuler).

Por todo lo anterior, y el interés en la presentación de antígenos tumorales, convirtiéndolos en inmunogénicos gracias a la célula presentadora,

fue importante utilizar células dendríticas maduras, puesto que en esta fase se encuentran con el antígeno internalizado, procesado y presentándolo activamente, para la inducción y estimulación de los linfocitos, como células efectoras de la respuesta inmune antitumoral.

Nuestros resultados demuestran que las células dendríticas cultivadas, pueden estimular una respuesta inmune antígeno específica en los pacientes con cáncer renal metastásico.

Esta es la primera aplicación de inmunoterapia mediada por células dendríticas en cáncer en México. Por otra parte, existen hasta la fecha, respuestas efectivas antitumorales en cáncer renal metastásico; pesar de que el uso de inmunoterapia a base de células dendríticas ha sido limitada. Aunado, con la ausencia de efectividad de los abordajes terapéuticos actuales para neoplasias renales en estadios avanzados; apoyan la necesidad de estudios más profundos en este campo.

Dentro de las perspectivas de estudio, estarían: un mejor entendimiento de las rutas óptimas de administración, el método ideal de sensibilización de las células dendríticas y el papel que pudieran jugar las citocinas como coadyuvante en estos pacientes, ya sean por separado o combinaciones de IL-2, IFN e IL-12. Teniendo como perspectiva eventual, la terapéutica en pacientes en estadios más tempranos en forma adyuvante, por ser pacientes que pueden tener una mejor respuesta a la inmunoterapia por su menor carga tumoral y sistema inmune preservado.

CONCLUSIONES

Los resultados preliminares de este estudio, indican que la inmunoterapia basada en el uso de células dendríticas es posible en México, es bien tolerada por los pacientes, con tasas de respuesta de enfermedad estable significativas. Lo que convierte a este abordaje como una modalidad nueva y muy prometedora para el tratamiento del carcinoma renal metastásico.

Sin embargo, es necesario que se continúe el estudio de este tratamiento, con el objeto de determinar el régimen óptimo y que se evalúe la efectividad clínica de este abordaje terapéutico.

BIBLIOGRAFIA

- Aalther M, Johnson B, Culley D, et al. Serum interleukin-6 levels in metastatic renal cell carcinoma before treatment with interleukin-2 correlates with paraneoplastic syndromes but not patient survival. *J Urol* 1998;159:718-722.
- Aliberti J, Reis C, Schito M et al. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8⁺ dendritic cells. *Nature Immunol* 2000;1:83-87.
- Almeida J, Bueno C, Alguero M, et al. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II⁺/lineage⁻ cells. *Clin Exp Immunol* 1999; 118:392-401.
- Amato R. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 1998;25(6):177-186.
- Ancuta P, Weiss L, Haeffner N. CD14⁺CD16⁺⁺ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol* 2000;30:1872-1883.
- Austyn J. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 1996;183:1287-1292.
- Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control on immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
- Barratt S, Zimmer M, Harshyne L, et al. Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J Immunol* 2000;164:2487-2495.
- Berd D. Cancer vaccines: reborn or just recycled? *Semin Oncol* 1998;25(6):605-10
- Bhardwaj N, Seder R, Reddy A, Feldman M. IL-12 in conjunction with dendritic cells enhances antiviral CD8⁺ CTL responses In vitro. *J Clin Invest* 1996; 98:715-722.
- Boczkowski D, Nair S, Nam J, Lyerly K, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:1028-1034.

- **Bonsib S.** Risk and prognosis in renal neoplasms. A pathologist's prospective. *Urol Clin N Am* 1999; 26(3): 643- 660.
- **Brasana D, Muller C, Muller G et al.** HLA class I antigens expresión in renal cell carcinoma: histopathological and clinical correlation. *J Exp Clin Res* 1999;18:505-0.
- **Bukowski R.** Cytokine combinations: therapeutic use in patients with advaced renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 2000;27:204-212.
- **Carballido J, Hellsten S, Mensink H, Schulze H, Mickisch G.** Guidelines on renal cell cancer. European Association of Urology, Brussels, 2000.
- **Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A.** Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9:10-16.
- **Celluzzi C, Mayordomo J, Storkus W, Lotze M, Falo L.** Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996;183:283-287.
- **Bechtold R, Zagoria R.** Imaging approach to stging of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 1997;21(3):507-520.
- **Chaux P, Favre N, Martin M, Martin F.** Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. *Int J Cancer* 1997;72:619-624.
- **Chow W, Devesa S, Warren J, Fraumeni J.** Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999;281:1628.
- **Dallal R, Lotze M.** The dendritic cell and human cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 2000;12:583-588.
- **Danpanich E, Kasiske B.** Risk actors for cancer in renal transplant recipients. *Transplantation* 1999;68:1859-1864.
- **DeMatos P, Abdel Z, Vervaert C, Seigler H.** Vaccination with dendritic cells inhibits the growth of hepatic metastasis in B6 mice. *Cell Immunol* 1998;185:65-74.
- **Dendron Corporation.** A randomized, double blind, placebo controlled trial of immunotherapy eith autologous antigen-loaded dendritic cells (Provenge™) for asymptomatic metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Urol* 2000;164:2278.
- **Enk A, Jonuleit H, Saloga J, Knop J.** Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997;73:309-316.

- Enquist E, Walther M, Linehan W. Molecular genetics of renal cell carcinoma. PACIOU V ©1999, Parthenon Publ. 5-14.
- Figlin R, Pierce W, Kaboo R, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8⁺ selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. J Urol 1997;158:740-745.
- Fossa S. Interferon in metastatic renal cell carcinoma. Semin Oncol 2000;27:187-193
- Fossa S. Interferons in metastatic renal cell carcinoma: tradition to be maintained? PACIOU V ©1999, Parthenon Publ. 45-57.
- Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Loms H. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. Blood 1996;97:373-377.
- Fujiota K, Denda K, Yamamoto M, et al Expression of MUC1 mucins inversely correlated with post-surgical survival of renal cell carcinoma patients. Br J Vancer 1999; 80:301-308
- Gill I, Schweizer D, Hobart M, et al. Retroperitoneal laparoscopic radical nephrectomy: the Cleveland clinic experience. J Urol 2000; 163:1665-1670.
- Gittlitz Bm Hinkel A, Mulders P, et al. Multi-antigen loaded dendritic cell (DC) vaccine for the treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) in vitro correlates. J Urol 2000;163(4):137.
- Goxe B, Latour N, Bartholeyns J, Romet J, Chokri M. Monocyte-derived dendritic cells: development of a cellular processor for clinical applications. Res Immunol 1998;149:643-646.
- Guinan P, Sobin L, Algaba F, et al. TNM staging of renal cell carcinoma. Cancer 1997; 80(5):992-3.
- Hanash K, Aquilina J, Barrett D, et al. Clinical research priorities in renal cell carcinoma. Cancer 1997;80(5):999-1001.
- Hart D, Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood 1997;90(9):3245-3287.
- Hart D, Hill G. Dendritic cell immunotherapy for cancer: application to low-grade lymphoma and multiple myeloma. Immunol Celll Biol 1999;77:451-459

- Hayakawa K, Morita T, Augustus L et al. Human renal-cell carcinoma cells are able to activate natural killer cells. *Int J Cancer* 1992;51:290-295.
- Heiser A, Dahm P, Yancey D et al. Dendritic cells transfected with antigen encoded in renal tumor RNA are potent stimulators of antitumor immunity in vitro. *J Urol* 2000;163(4):110.
- Hilton S. Imaging of renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 2000;27:150-159.
- Hinkel A, Tso C, Gittlitz B, et al. Immunomodulatory dendritic cells generated from nonfractionated bulk peripheral blood mononuclear cell cultures induce growth of cytotoxic T cells against renal cell carcinoma. *J Immunother* 2000;23:83-93.
- Hoffman D, Gittlitz B, Belldegrun A, Figlin R. Adoptive cellular therapy. *Semin Oncol* 2000;27:221-233.
- Holtl L, Rieser C, Papesh C et al. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *J Urol* 1999;161:777-782.
- Holtl L, Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Thurnher M. Dendritic cell-based immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma: a phase I trial. *J Urol* 2000;163(4):175.
- Hoznek A, Salomon L, Antiphon P, et al. Partial nephrectomy with retroperitoneal laparoscopy. *J Urol* 1999; 162:1922-1926.
- Hsu F, Benike C, Gagnoni F. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1996;2(1):52-58.
- Hurley L. Neoplasms of the Genitourinary tract. *Manual of Urology*. Lippincott Williams & Wilkins. USA @ 1999.
- Iliopoulos O, Eng C. Genetic and clinical aspects of familial renal neoplasms. *Semin Oncol* 2000;27:138-149.
- Janeway C, Travers P, Walport M, Capra D. Immunobiology, the immune system in health and disease. 4th edition. Current Biol, Garland ©1999.
- Javidan J, Stricker H, Tamboli P, et al. Prognostic significance of the 1997 TNM classification of renal cell carcinoma. *J Urol* 1999;162:1277-1281.

- Koch F, Stanzl U, Jennewein P, et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 1996;8:741-746.
- Krane R, Lavin P, Carpinito G, Osband M, Ross S. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autolympocyte therapy. Low toxicity outpatient approach to adoptive immunotherapy without use of In Vivo interleukin-2. *Urology* 1990;35:417-2
- Kugler A, Stuhler G, Walden P, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nature Med* 2000;6(3):332-336.
- Lane P, Brocker T. Developmental regulation of dendritic cell function. *Curr Opin Immunol* 1999;11:308-313.
- Landis S, Murray T, Bolden S. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;49:8.
- Lattime E. Next generation vaccine strategies for cancer. *J Urol* 2000;163:1069.
- Lee C, Katz J, Shi W, et al. Surgical management of renal tumors 4cm or less in a contemporary cohort. *J Urol* 2000; 163:730-736.
- Lin C, Suri R, Rahdon R, Austyn J, Roake J. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol* 1998;28:4114-4122.
- Lodge P, Jones L, Bader R, Murphy G, Salgaller M. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of phase II clinical trial. *Cancer Res* 2000;60:829-833.
- Mackensen A, Herbst B, Chen J, et al. Phase-I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 2000;86:385-392.
- Margolin K. Interleukin-2 in the treatment of renal cancer. *Semin Oncol* 2000;27:194-3
- Marshall F, Stewart A, Menk H. The national cancer data base: report on kidney cancers. *Cancer* 1997; 80:2167.
- McLaughlin J, Lipworth L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin Oncol* 1998;25(6):115-123.
- Medeiros J, Jones E, et al. Grading of renal cell carcinoma. *Cancer* 1997; 80(5):990-1.

- Menetrier C, Bain C, Favrot M, Duc A, Blay J. Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E₂ production by monocytes. *Br J Cancer* 1999;79(1):119-130.
- Merad M, Angevin E, Wolfers J, et al. Generation of monocyte-derived dendritic cells from patients with renal cell cancer: modulation of their functional properties after therapy with biological response modifiers (IFN-alfa plus IL-2 and IL-12). *J Immunother* 2000;23:369-378.
- Merad M, Angevin E, Wolfers J, et al. Generation of monocyte-derived dendritic cells from patients with renal cell cancer: modulation of their functional properties after therapy with biological response modifiers (IFN-alfa plus IL-2 and IL-12). *J Immunother* 2000;23:369-378.
- Montie J. Follow-up after partial or total nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urol Clin N Am* 1994;21(4):589-592.
- Morgan W, Zincke H. Progression and survival after renal-conserving surgery for renal cell carcinoma: experience in 104 patients and extended followup. *J Urol* 1990;14:852-585.
- Mota J, Castillo G, Monjaraz G, Hejase M, Zavala A. Carcinoma de células renales: análisis retrospectivo de 106 casos. *Rev Mex Urol* 1999;59(2):63-67.
- Motzer Rrusso P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 2000; 163:408-17.
- Mulders P, Tso C, Gitlitz B et al. Presentation of renal tumor antigens by human Kawagoe N, Shintaku I, Yutani S, et al. Expression of the SART3 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma, *J Urol* 2000;164:2090-2095.
- Mulders P, Tso C, Gitlitz B et al. Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lymphocytes against autologous tumor: implications for live kidney cancer vaccines. *Clin Cancer Res* 1999;5:445-54
- Nair S, Heiser A, Boczkowski D. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nature Med* 2000;6:1011-1017.
- Nelson J. Cytokine levels in cystic renal masses associated with renal cell carcinoma. *J Urol* 1998;159:1464.

- Nestle F, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1998;4:328-332.
- Ornstein D, Lubensky I, Venzon D, et al. Prevalence of microscopic tumors in normal appearing renal parenchyma of patients with hereditary papillary renal cancer. *J Urol* 2000; 163:431-433.
- Osterroth F, Garbe A, Fisch P, Veelken H. Stimulation of cytotoxic T cells against idiotype immunoglobulin of malignant lymphoma with protein-pulsed or idiotype-transduced dendritic cells. *Blood* 2000;95:1342-1349.
- Pulendran B, Smith L, Caspary G et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1036-1041.
- Radmayr C, Bock G, Hobisch A, et al. Dendritic antigen-presenting cells from the peripheral blood of renal-cell-carcinoma patients. *Int J Cancer* 1995;63:627-632.
- Reuter V, Presti J. Contemporary approach to the classification of renal epithelial tumors. *Semin Oncol* 1998;25(6):124-137.
- Rieser C, Ramoner R, Holtl L, et al. Mature dendritic cells induce T-helper type-1-dominant immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol Int* 2000;63:151-159.
- Rini B, Stadler W, Spielberger R, Ratain M, Vogelzang N. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor in metastatic renal cell carcinoma. A phase II trial. *Cancer* 1998;82:1352-1358.
- Rini B, Vogelzang N. Prognostic factors in renal carcinoma. *Semin Oncol* 2000;27:213-220.
- Rosenberg S, Yang J, Schwartzentruber D, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Med* 1998;4:321-327.
- Russo P. Renal cell carcinoma: presentation, staging and surgical treatment. *Semin Oncol* 2000;27:160-176.
- Saleh M, Goldman S, LoBuglio A, et al. CD16⁺ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1995;85:2910-2917.

- Salgaller M, Tjoa B, Lodge P, et al. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer. *Crit Rev Immunol* 1998;18:109-119.
- Santambrogio L, Sato A, Carven G, et al. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *PNAS* 1999;96(26):15056-15061.
- Schuler T, Qin Z, Ibe S, et al. T helper cell type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice. *J Exp Med* 1999;189:803-810.
- Schuler T, Thurner, et al. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature cryopreserved peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:205-211.
- Schwaab T, Heaney J, Schned A, et al. A randomized phase II trial comparing two different sequence combinations of autologous vaccine and human recombinant interferon γ and human recombinant interferon $\alpha 2B$ therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: clinical outcome and analysis of immunological parameters. *J Urol* 2000;163:1322-1327.
- Schwaab T, Schned A, Heaney J, et al. In vivo description of dendritic cells in human renal cell carcinoma. *J Urol* 1999;162:567-573.
- Sell S. Tumor markers. *Science Med* 2000; mar:8-17.
- Shin K, Ku J, Kim W, et al. Establishment and characterization of seven human renal cell carcinoma cell lines. *Br J Urol Int* 2000;85:130-137.
- Shvarts O, Figlin R. Expanding the indications for surgery and adjuvant interleukin-2-based immunotherapy in patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer J Scient Am* 2000;6(1).
- Simons J, Jaffee M, Weber E, et al. Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene therapy. *Cancer Res* 1997;57:1537-1546.
- Sozzani S, Allavena P, Dámico G, et al. Cutting edge: differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998; 161:1083-1086.
- Srigley J, Hutter R, Gelb A, et al. Current prognostic factors- renal cell carcinoma. *Cancer* 1997; 80(5):994-998.

- Surman D, Dudley M, Overwijk W, Restifo N. CD4⁺ T cell control of DC8⁺ T cell reactivity to a model tumor antigen. *J Immunol* 2000;164:562-565.
- Takayama T, Tahara H, Thomson A. Transduction of dendritic cell progenitors with a retroviral vector encoding viral interleukin-10 and enhanced green fluorescent protein allows purification of potentially tolerogenic antigen - presenting cells. *Transplantation* 1999;68(12):1903-1909.
- Tigrani V, Reese D, Small E, Presti J. Potential role of nephrectomy in the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a retrospective analysis. *Urology* 2000; 55: 36-40.
- Thomas R, Lipsky P. Human peripheral blood dendritic cell subsets. *J Immunol* 1994;153:4016-4029.
- Thurnher M, Radmayr C, Ramoner R, et al. Human renal -cell carcinoma tissue contains dendritic cells. *Int J Cancer* 1996;67:1-7.
- Thurner B, Haendle I, Roder C, et al. Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999;11(6): 1669-1678.
- Thurnher M, Rieser C, Holtl L, et al. Dendritic cell-based immunotherapy of renal cell carcinoma. *Urol Int* 1998;61:67-71.
- Thurner B, Roder C, Dieckmann D, et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999;223:1-15.
- Troy A, Davidson P, Atkinson C, Hart D. CD1a dendritic cells predominate in transitional cell carcinoma of bladder and kidney but are minimally activated. *J Urol* 1999;161:1962-1967.
- Troy A, Summers K, Davidson P, Atkinson C, Hart D. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:585-593.
- Troy A, Davidson P, Atkinson C, Hart D. Phenotypic characterization of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. *J Urol* 1998;160:214-219.

- Tsai V, Kawashima I, Keogh E, et al. In Vitro immunization and expansion of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive immunotherapy using peptide-pulsed dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 1998;18:65-75.
- Uemura H, Nakagawa Y, Yoshida K et al. MN/CA IX/G250 as a potential target for immunotherapy of renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 1999;81:741-746.
- University of Colorado. G-CSF priming protocol. 1999.
- Van Den Hove L, Van Gool S, Van Poppel H, et al. Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumor-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *J Urol* 1998;160:635-636.
- Villacres M, Bergmann C. Enhanced cytotoxic T cell activity in IL-4 deficient mice. *J Immunol* 1999; 162:2663-2670.
- Walter M, Choyke P, Glenn G, et al. Renal cancer in families with hereditary renal cancer: prospective analysis of a tumor size threshold for renal parenchymal sparing surgery. *J Urol* 1999;161:1475-1479.
- Weinlich G, Heine M, Stosel H, et al. Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1998;110:441-48.
- Wittke F, Hoffmann R, Buer J et al. Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;79:1182-1184.
- Wright V, McClain K, Talpaz M, Ordonez N, Estrov Z. Physiology and pathophysiology of dendritic cells. *Hum Pathol* 1997;28:563-578.
- Yamada N, Katz S. Generation of mature dendritic cells from a CD14⁺ cell line (XS52) by IL-4, TNF- α , IL-1 β and agonistic anti-CD40 monoclonal antibody. *J Immunol* 1999; 163: 5331-5337.
- Zambrano N, Lubensky I, Merino M, Linehan W, Walter M. Histopathology and molecular genetics of renal tumors: towards unification of a classification system. *J Urol* 1999; 162:1246-1258.

Tabla 1

Esquema de seguimiento postoperatorio por la Sociedad Europea de Urología

Estadio	Visita	Examen	Opcional	Finalidad
Todo T	4-6 sem PO	EF, creatinina, Hgb	Fos alc	Complicaciones PO Función renal residual Recuperación de sangrado
T 1,2	6m por 3ª 1ª por 3-5ª	EF, tele de tórax	Fos alc, imagen renal	Recurrencia local Recurrencia linfática, Mets pulmonares
T 3,4	6m por 3ª 1ª por 3-10ª	EF, Tele de tórax, TAC abdomen		Mets local o linfática, Mets pulmon, contralateral, Neo-ocurrencia

(Montie)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2

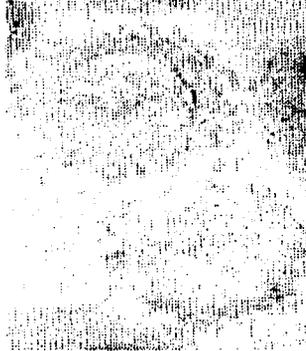
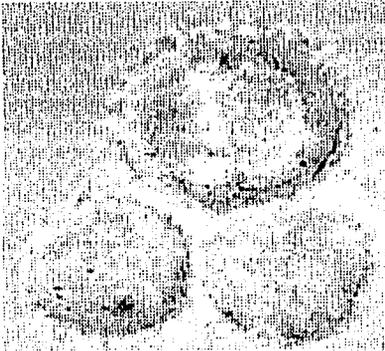
Esquema de preparación de la vacuna de células dendríticas autólogas.

Día 0	1	2	3	4	5	6	7	8
Leucoféresis 100ml sangre	X							
Recuento PBMC (1×10^{10})								DC (1×10^{10})
IL-4 3ng/ml		15ng/ml		15ng/ml		15ng/ml		
GM-CSF 2ng/ml		10ng/ml		10ng/ml		10ng/ml		
TNF							40 ng/ml	
Ag KLH							50 μ g/ml	
Ag tumoral 100 μ g/ml						100		
Medio 10cc		5cc		5cc		5cc		

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esquema 1

Células dendríticas utilizadas en las vacunas a un aumento de 100X en microscopio de luz con tinción con Azul, que indica su viabilidad y la morfología clásica de célula dendrítica, posterior a su separación de las cajas de petri, listas para su aplicación.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN