



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES
CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO
COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RENÉ SAMUEL DAMIÁN GONZÁLEZ

ASESORA: M EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

CO-ASESORA: M EN C. AZUCENA RODRÍGUEZ FLORES

CUAUTITLÁN IZCALLI ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación clínica e inmunológica de pacientes con Osteosarcoma que reciben tratamiento coadyuvante con Transferon®

Que presenta el pasante: **René Samuel Damián González**
Con número de cuenta: **305012616** para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de agosto de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Francisco López Mejía	
VOCAL	Dr. Andrés Romero Rojas	
SECRETARIO	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er. SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
2do. SUPLENTE	MVZ. Angel Germán Martínez Sosa	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

DEDICATORIAS

A mis padres:

Gracias a ellos he llegado hasta estas instancias, el poder realizar uno de mis más anhelados sueños, el inicio de una nueva etapa de mi vida todo esto producto del amor, apoyo en los buenos y malos momentos que en mi vida he pasado, la confianza que ellos me han brindado, así mismo por los consejos, enseñanzas y valores humanos que desde toda la vida me han inculcado para llegar a ser lo que hoy en día soy. ¡Los amo! ¡Va por ustedes!

A mi hermana:

Gracias por las enseñanzas, los buenos momentos que hemos compartido, tu apoyo incondicional, los consejos que me has brindado para seguir forjando mi futuro, aunque no siempre hemos coincidido con las mismas opiniones, eso me ha ayudado a ser tolerante y crítico aprendiendo de ello. Gracias a ti por ser un ejemplo de vida. ¡Te quiero!

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras:

M en C Azucena Rodríguez Flores:

Por haberme brindado la oportunidad de poder desarrollar este proyecto en la ENCB, por confiar en mí, así como por las enseñanzas y consejos que me han ayudado en mi formación profesional.

M en C Ana Laura Vázquez Martínez:

Por haberme dado la oportunidad de encontrar este proyecto, por las valiosas enseñanzas que he recibido durante mi estancia en la licenciatura y que me han ayudado a estar más preparado para así desarrollarme en el campo laboral.

Al honorable jurado:

Por el apoyo para la revisión de este trabajo, brindarme parte de su tiempo y de sus conocimientos para así generar críticas constructivas que han dado pauta a mejorar este proyecto.

A mis amigos:

Amigos de la FES-C (Mao, Gabo, Karenina, Juan, Vago, Luis, Christopher, Hugo, Alonso, Sandra, Fernanda, Lupis, Bladi, Alex, Sara y espero no olvidar a alguien mas) que durante la estancia de los más de cuatro años y medio que llevé conociéndolos en la licenciatura pasamos momentos magnánimos y únicos.

Amigas de la ENCB (Pame, Isela, Jessica, Myroz) que durante mi estancia y la realización del proyecto me han brindado apoyo, enseñanza de vida y amistad.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OSTEOSARCOMA	1
1.1.1 GENERALIDADES	1
1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA	3
1.1.3 CLASIFICACIÓN	3
1.1.3.1 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA	4
1.1.3.2 CLASIFICACIÓN DE TUMORES ÓSEOS	5
1.1.4 ETIOLOGÍA Y PATOGENIA.....	7
1.1.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	9
1.1.6 TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO DE VIDA.....	12
1.1.7 ANTECEDENTES EN OSTEOSARCOMA.....	16
1.2 INMUNOTERAPIA	17
1.3 FACTOR DE TRANSFERENCIA	19
1.3.1 DEFINICIÓN	19
1.3.2 COMPOSICIÓN	19
1.3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y MECANISMO DE ACCIÓN.....	20
1.3.4 USOS CLÍNICOS	20
1.3.5 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS.....	22
1.4 GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNITARIO E INMUNOVIGILANCIA	24
1.4.1 LINFOCITOS B.....	26
1.4.2 LINFOCITOS T	26
1.4.3 CÉLULAS NATURAL KILLER.....	28
1.5 RESPUESTA INMUNE FRENTE A CÁNCER.....	29

1.5.1 RESPUESTA INNATA	29
1.5.2 RESPUESTA ADAPTATIVA	29
1.6 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	32
2. JUSTIFICACIÓN.....	34
3. HIPÓTESIS.....	35
4. OBJETIVOS.....	36
4.1 OBJETIVO GENERAL	36
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	36
5. MODELO DE ESTUDIO.....	37
5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	37
5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	38
5.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	38
5.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	38
5.5 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO Y DE SUS ESCALAS DE MEDICIÓN.....	38
5.6 ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTO CONVENCIONAL MULTIMODAL	39
5.7 ADMINISTRACIÓN DE EXTRACTO DIALIZADO DE LEUCOCITOS (EDL ó DEL) ...	40
5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.1 PRODUCCIÓN DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA ESPECÍFICO (FTe)	41
6.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS	41
6.3 REACTIVOS.....	41
6.4 MATERIALES Y EQUIPOS.....	41
6.5 METODOLOGÍA	42
6.5.1 CUENTA TOTAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA	42
6.5.2 CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA	44
6.5.3 DETERMINACIÓN DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS POR TINCIÓN DIRECTA.....	45
6.5.3.1 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	46
7. RESULTADOS.	47
7.1 EVALUACIÓN CLÍNICA.....	49

7.2 DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS AL INICIO DEL TRATAMIENTO.....	49
7.3 DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS POST TRATAMIENTO.	57
7.4 TIEMPO DE SOBREVIDA	63
8. DISCUSIÓN.....	64
9. CONCLUSIONES	71
10. BIBLIOGRAFÍA.....	72
11. ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1. Estructura de un hueso largo típico	1
FIGURA 2. Distribución del sitio anatómico del tumor primario en pacientes mexicanos con Osteosarcoma (HGM 1996-2010)	2
FIGURA 3. Histología de Osteosarcoma Osteoblástico	4
FIGURA 4. Histología de Osteosarcoma Condrolástico	4
FIGURA 5. Histología de Osteosarcoma Fibroblástico	5
FIGURA 6. Proceso de obtención del Factor de Transferencia.....	22
FIGURA 7. Componentes para realizar la prueba de LIF.....	23
FIGURA 8. Poblaciones celulares que participan en el control del desarrollo tumoral	31
FIGURA 9. Componentes de un citómetro de flujo	32
FIGURA 10. Gráfico que muestra varias secciones de puntos, donde cada punto representa a una célula por individual	33
FIGURA 11. Ejemplo de una cámara de Neubauer	42
FIGURA 12. Distribución de los cuadrantes de la cámara de Neubauer	43
FIGURA 13. Extendido de sangre periférica en portaobjetos para realizar una tinción. ...	44
FIGURA 14. Gráfica con puntos de las poblaciones linfocitarias obtenidas por citometría de flujo, realizando tinción directa para cada uno de los marcadores diferenciales	46
FIGURA 15. Evaluación de Leucocitos de pacientes con Osteosarcoma al inicio del tratamiento. A. Representa a pacientes sin metástasis. B. Representa a pacientes con metástasis.	50
FIGURA 16. Evaluación de Linfocitos T Totales (CD3+) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del tratamiento. A. Representa a pacientes sin metástasis. B. Representa a pacientes con metástasis.	51
FIGURA 17. Evaluación de Linfocitos T Cooperadores (CD3+ CD4+) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del tratamiento. A. Representa a pacientes sin metástasis. B. Representa a pacientes con metástasis.....	52

FIGURA 18. Evaluación de Linfocitos T Reguladores (CD3+ CD4+ CD25+) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del tratamiento. A. Representa a pacientes sin metástasis. B. Representa a pacientes con metástasis.....	53
FIGURA 19. Evaluación de Linfocitos T Citotóxicos (CD3+ CD8+) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del tratamiento. A. Representa a pacientes sin metástasis. B, Representa a pacientes con metástasis.....	54
FIGURA 20. Evaluación de Células NK (CD56+) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del tratamiento. A. Representa a pacientes sin metástasis. B. Representa a pacientes con metástasis	55
FIGURA 21. Evaluación de Linfocitos B (CD19+) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del tratamiento. A. Representa a pacientes sin metástasis. B. Representa a pacientes con metástasis	56
FIGURA 22. Evaluación de Leucocitos de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento, A, Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. B. Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. C, Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. D. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante ..	57
FIGURA 23. Evaluación de Linfocitos T Cooperadores (CD3+ CD4+) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. A. Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. B. Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. C. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. D. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante	58
FIGURA 24. Evaluación de Linfocitos T Reguladores (CD3+ CD4+ CD25+) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. A. Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. B. Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. C. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. D. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante	59

FIGURA 25. Evaluación de Linfocitos T Citotóxicos (CD3+ CD8+) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. A. Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. B. Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transderón® como coadyuvante. C. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. D. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. **60**

FIGURA 26. Evaluación de Células NK (CD56+) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. A. Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. B. Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón®. C. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. D. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante..... **61**

FIGURA 27. Evaluación de Linfocitos B (CD19+) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. A. Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. B. Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón®. C. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. D. Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón como coadyuvante **62**

FIGURA 28. Escala de supervivencia de pacientes con Osteosarcoma después de 2 años de seguimiento. **63**

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
TABLA 1. Resumen de las características histopatológicas de los tipos de OS	4
TABLA 2. Clasificación de Enneking para tumores músculo-esquelético benignos basadas en características radiográficas de los márgenes del tumor.	6
TABLA 3. Clasificación de Enneking para tumores músculo-esqueléticos malignos basada en grado quirúrgico, extensión local y presencia o no de metástasis	7
TABLA 4. Pruebas y procedimientos para la evaluación inicial de un paciente con OS	9
TABLA 5. Características generales de los antineoplásicos comúnmente utilizados en las Quimioterapias.....	12
TABLA 6. Agentes inmunoterapéuticos usados para el tratamiento del cáncer	17
TABLA 7. Aplicaciones clínicas del Extracto Dializable de Leucocitos	21
TABLA 8. Características generales de las subpoblaciones linfocitarias	25
TABLA 9. Características generales de los pacientes.	47
TABLA 10 Aspectos clínicos de pacientes con metástasis.....	48
TABLA 11. Aspectos clínicos de pacientes sin metástasis	48

ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpo Monoclonal.
ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo
AJCC	Comisión Conjunta Americana de Cáncer (American Joint Committee on Cancer)
CD	Determinante de grupo (Cluster of Determination)
CTL	Linfocitos T Citotóxicos (Cytotoxic T Lymphocyte)
CTLA	Antígeno de Linfocito T Citotóxico (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen)
DC	Células Dendríticas (Dendritic Cells)
DLE	Extracto Dializable de Leucocitos (Dializable Leukocyte Extract)
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
GAGE	Gen de Enriquecimiento Generalmente Aplicable
GITR	Receptor del factor de necrosis tumoral inducido por Glucocorticoides
FGCR	(Receptor de la fracción cristalizable de la igG)
FITC	Isotiociano de Fluoresceina (Fluorescein Isothiocyanate)
FT	Factor de Transferencia
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
HER2	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
IFN	Interferón
IDR	Intradermorreacción
IL	Interleucina
INR	Instituto Nacional de Rehabilitación.

LAK	Células asesinas activadas con Linfocinas (Lymphokine Activated Killer Cells)
LIF	Factor de Inhibición de Linfocitos (Lymphocyte Inhibition Factor)
LMI	Índice de Migración de Linfocitos (Lymphocyte Migration Index)
MAGE	Gen del Antígeno de Melanoma (Melanoma Antigen Gene)
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)
NK	Asesino Natural (Natural Killer)
NY-ESO 1	Carcinoma de Células escamosas de Esófago Variedad Nueva York (New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPN	Osteopontina
OS	Osteosarcoma
PBF	Pituitary tumor gene Binding Factor (Factor de Unión del Gen)
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos (Phosphate Buffered Saline)
PE	Ficoeritrina (Phycoerythrin)
PERCP	Proteínas de Peridininina-Clorofila (Peridinin-Chlorophyll-Proteins)
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
PPD	Derivado Proteico Purificado (Purified Protein Derivative)
RANTES	Células T Reguladas en Activación, Secretadas y Expresadas (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted)
RIC	Respuesta Inmunitaria Celular
TCR	Receptor de Linfocito T (T Cell Receptor)
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta. (Transforming Growth Factor)

TH	Células T cooperadores (T Helper Cells)
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa (Tumor Necrosis Factor).
TIL	Linfocitos Infiltrados de Tumores. (Tumor Infiltrating Lymphocytes)
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

RESUMEN

El Osteosarcoma (OS) es un tumor primario de hueso que se deriva de las células osteoblásticas, con una gran tendencia a la metástasis y una baja tasa de supervivencia en estadios avanzados que va de 3 a 5 meses. En este trabajo se realizó un estudio clínico y piloto en dieciocho pacientes con diagnóstico de OS en fases III y IV, con un intervalo de edad entre 14 a 62 años de los cuales once son hombres (61.11%) y siete son mujeres (38.89%). El hueso más afectado fue el fémur con un 38.90%, seguido de la tibia con 33.33% y el húmero con 27.77%. A todos los pacientes se les realizaron evaluaciones en sangre periférica del número de células de Linfocitos B (CD3⁺ CD19⁺), Linfocitos T cooperadores (CD3⁺ CD4⁺), Linfocitos T reguladores (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺), Linfocitos T citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺) y Células Natural Killer (CD3⁻ CD56⁺) al inicio, durante y al final del tratamiento.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto del tratamiento coadyuvante con Transferón® en la supervivencia, parámetros clínicos e inmunológicos de los pacientes con OS. Los pacientes incluidos se dividieron en cuatro grupos: El grupo 1 que recibió únicamente tratamiento convencional multimodal a base de resección quirúrgica y quimioterapia. El grupo 2; que recibió tratamiento convencional más Transferón® como coadyuvante, El grupo 3; que recibió tratamiento convencional más Transferón® como coadyuvante y el grupo 4; que recibió solo tratamiento convencional.

De la evaluación de supervivencia después de dos años de seguimiento se observó que el 100% de los pacientes sin metástasis y en el grupo de pacientes con metástasis, en ambos grupos que recibieron tratamiento coadyuvante con Transferón® aumentaron significativamente (p=0.01) el tiempo de supervivencia en comparación con los encontrados en el grupo de pacientes que recibieron el tratamiento multimodal convencional en donde se observa que el tiempo de supervivencia fue de 14 a 40 meses como máximo y en el caso del grupo que recibe coadyuvante con Transferón® aumento hasta 60 meses.

En cuanto a los parámetros inmunológicos, de manera general los pacientes con grado avanzado de tumor óseo (grado III y IV), presentaron disminución del número de células linfoides (CD3⁺, CD19⁺, CD56⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ y CD3⁺CD8⁺) en comparación con el grupo de donadores libres de Osteosarcoma y otras infecciones, de la misma edad y sexo que los pacientes incluidos. Se observó que se presentó un incremento del 60% en el grupo de pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento coadyuvante con Transferón® en el número de linfocitos T citotóxicos y células Natural Killer, estas son células importantes que participan en la inmunidad antitumoral, lo cual contribuyó posiblemente a la buena respuesta al tratamiento multimodal convencional en estos pacientes y al aumento en el tiempo de supervivencia.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 OSTEOSARCOMA

1.1.1 GENERALIDADES

El término sarcoma fue introducido por el cirujano inglés John Abernathy en 1804 y es derivado de raíces griegas que significan excrescencia carnosa. En 1805 el médico cirujano francés Alexis Boyer fue el primero en usar el término Osteosarcoma.⁴⁵

En base 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 inmaduro, con gran tendencia a desarrollar metástasis cerca del tumor primario o a distancia, generalmente a pulmones¹⁰. Este tumor maligno se asienta principalmente sobre la metáfisis de los huesos largos (Figura 1), en especial en el extremo distal del fémur, y en el extremo proximal de la tibia y húmero.²⁹

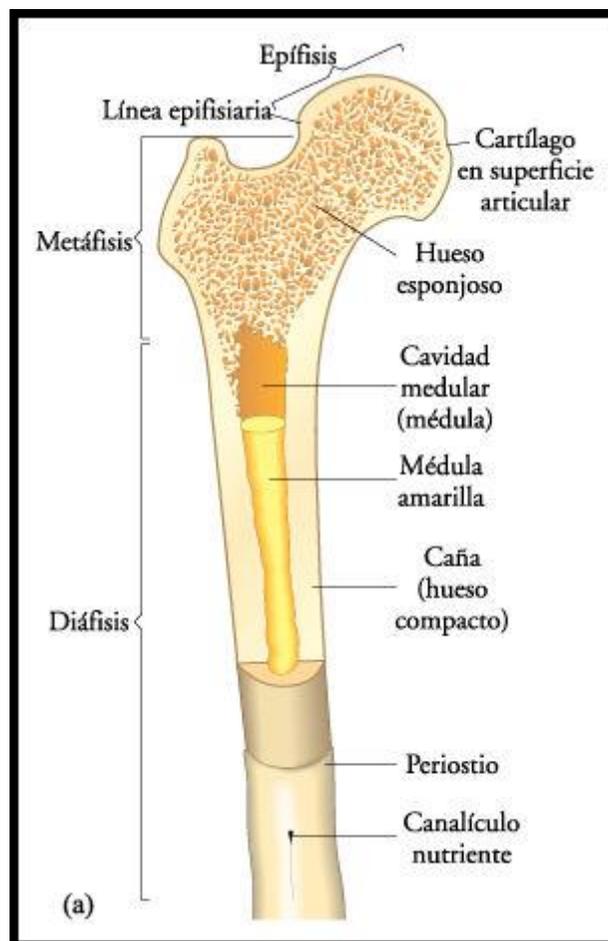


FIGURA 1. Estructura de un hueso largo típico

El Osteosarcoma muestra una profunda propensión a desarrollarse en los huesos largos particularmente el fémur distal, la tibia proximal y el húmero proximal (Figura 2). Tienden a desarrollarse en la metáfisis (91%) o de la diáfisis (9%). El desarrollo primario en la epífisis es extraordinariamente raro. Aunque los huesos largos son los sitios más frecuentes de Osteosarcoma primario convencional, la incidencia relativa del desarrollo en huesos no largos (mandíbula, pelvis, espina y cráneo) tiende a incrementarse con la edad.^{29, 39}

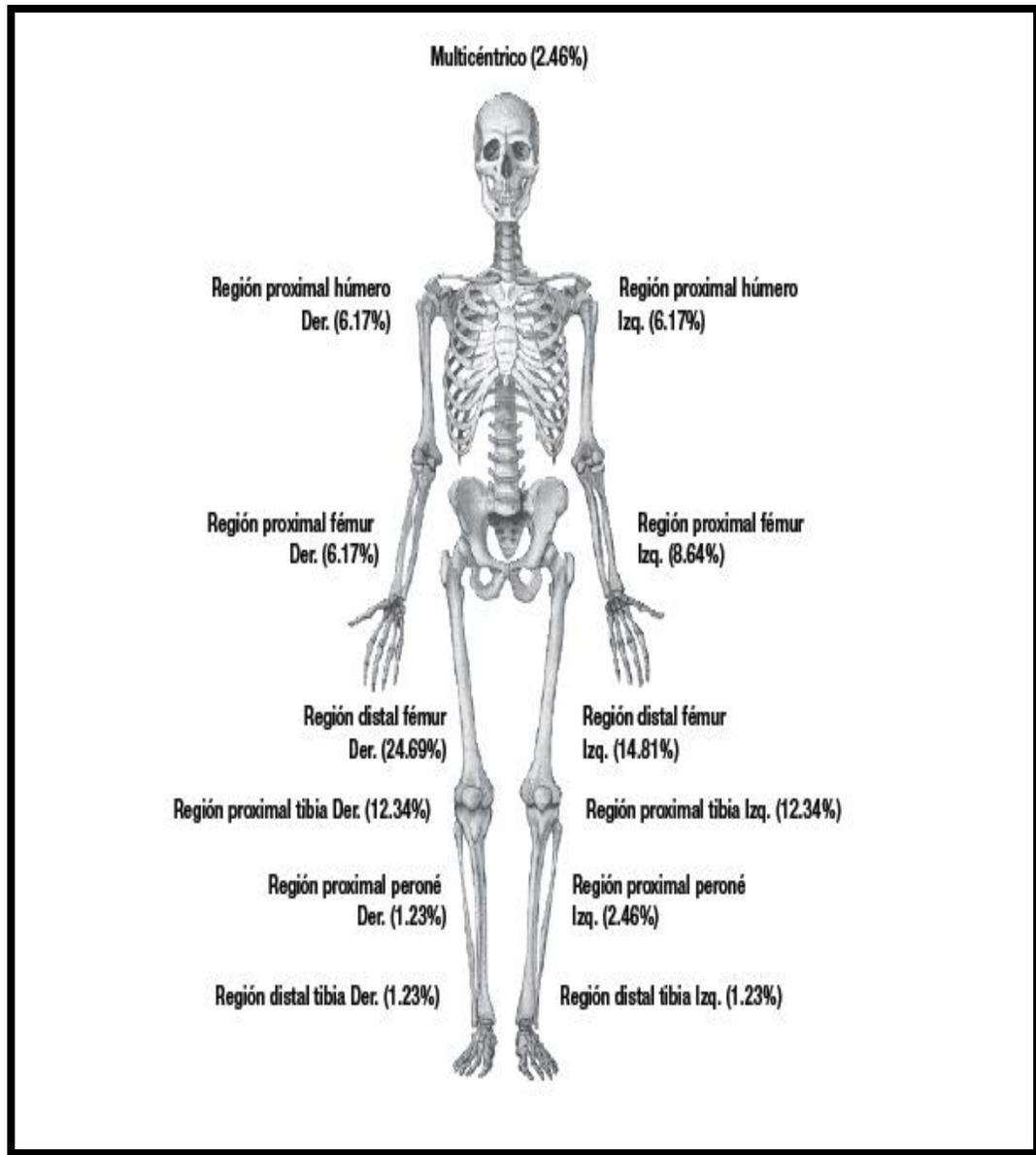


FIGURA 2. Distribución de sitio anatómico del tumor primario en pacientes mexicanos con Osteosarcoma (HGM 1996-2010).

1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

De todos los tumores óseos, el Osteosarcoma se presenta en un 56% de los casos y constituye aproximadamente un 6.6% de todos los tipos de tumores. En 2009 en México la incidencia reportada en el IMSS fue de 9 casos por millón entre los 10 y 14 años de edad.^{10, 11}

En las Unidades Médicas Acreditadas en la atención del menor con cáncer, pertenecientes a la Secretaría de Salud, en 2008 se reportaron 77 casos de Osteosarcoma, más del 80% de los casos se presentan entre los 5 y los 25 años de edad.⁴⁵. Para el caso de EU, anualmente se diagnostican 400 casos, y la incidencia anual es de 8.7 casos por millón en niños y adolescentes menores de 20 años.¹¹

Las estadísticas reportan que el Osteosarcoma es el tumor óseo más frecuente en pediatría ocupando el séptimo lugar de incidencias entre todas las neoplasias óseas malignas infantiles, con una frecuencia del 50 al 60% del total de los sarcomas. En niños, esta neoplasia se presenta frecuentemente en la segunda década de la vida, entre los 10 y 15 años, aunque afecta también a menores de 5 años.^{10, 39}

Existe una discreta predilección masculina con un primer pico de máxima incidencia en la segunda década de la vida, donde se encuentra la población más afectada debido a que se encuentra en edad de crecimiento. Posteriormente se experimenta un descenso gradual en el número de casos donde se observa nuevamente un segundo pico durante la séptima y octava década de vida.¹¹

1.1.3 CLASIFICACIÓN

Los Osteosarcomas se dividen en primarios y secundarios. El 85% de los Osteosarcomas son primarios (de origen óseo).³³ Dentro de los primarios encontramos el convencional de origen osteoblástico y sus respectivas variedades: condroblástico, fibroblástico y telangiectásico (Tabla 1).

El tumor óseo que se desarrolla posterior al de otro tumor en otra parte del cuerpo (como las mamas, los pulmones o el colon) se denomina tumor secundario o tumor óseo metastásico que se comportan de manera muy diferente a un tumor óseo primario.⁴⁰

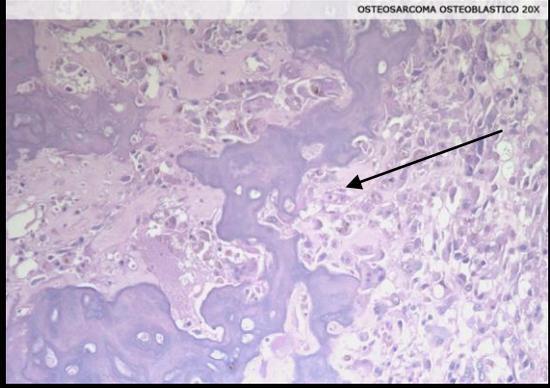
Los tumores óseos cancerosos (malignos) comprenden:

- **Osteosarcoma**
- Sarcoma de Ewing
- Condrosarcoma

1.1.3.1 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

El Osteosarcoma tiene un amplio espectro de apariencias histológicas, que tienen en común la proliferación de células mesenquimales malignas y la producción de material osteoide o hueso inmaduro por células tumorales. La clasificación dada por la Organización Mundial de la Salud reconoce tres principales subtipos de Osteosarcoma convencional: Osteoblástico (50%), Condrolástico (25%) y Fibroblástico (25%), reflejando el tipo predominante de la matriz en el tumor ^{22,27} En la tabla 1 se muestran sus características.

TABLA 1. Resumen de las características histopatológicas de los tipos de Osteosarcoma

Tipo de Osteosarcoma	Características Histológicas	
Osteoblástico	Constituido por osteoblastos dispuestos sobre una matriz constituida mayoritariamente por hueso compacto.	 <p data-bbox="857 1272 1359 1346">FIGURA 3. Histología de Osteosarcoma Osteoblástico</p>
Condrolástico	Consta de una matriz de apariencia cartilaginosa, lagunas con células fusiformes malignas.	 <p data-bbox="857 1780 1359 1854">FIGURA 4 Histología de Osteosarcoma Condrolástico.</p>

<p>Fibroblástico</p>	<p>Escaso material osteoide identificable.</p>	 <p>FIGURA 5. Histología de Osteosarcoma Fibroblástico</p>
-----------------------------	--	---

Tomado de Marina N, et al. 2004.

1.1.3.2 CLASIFICACIÓN DE TUMORES ÓSEOS

La Asociación Internacional de Tumores Músculo Esqueléticos propone una clasificación basada en el grado de diferenciación histológica, la localización y su grado de malignidad, con el objeto de estimar el pronóstico del paciente y lograr una mejor planeación en los procedimientos médico quirúrgicos. En este trabajo se utilizará la clasificación de tumores músculo esquelético propuesta por Enneking y colaboradores, la cual se basa en el grado de malignidad del tumor primario y asigna números Árabigos a los tumores benignos y números Romanos a los tumores malignos.²²

Desde su establecimiento en 1959, La comisión conjunta americana del cáncer de las siglas en inglés: AJCC ha asumido la responsabilidad para el desarrollo de sistemas de clasificación clínicamente útil para los diversos tipos de cáncer. Este sistema fue inicialmente establecido en la Universidad de Florida en 1977 basado en la colección de datos desde 1968 hasta 1976 por el doctor William Enneking.²²

Existen sistemas de clasificación por separado para tumores benignos y para tumores malignos. La clasificación para tumores músculo-esquelético benignos consiste en 3 categorías, es decir, latencia, actividad y agresividad. La clasificación está basada en **Características Radiográficas** (Tabla 2) de los márgenes o extensiones del tumor en estudio.⁹ Bordes bien delimitados son indicativos de lesiones latentes, mientras bordes indefinidos son resultados de permeabilidad en el hueso del hospedero y una lesión más agresiva. Para tumores benignos, la agresividad local y la incidencia o recurrencia aumenta de acuerdo al grado quirúrgico. La metástasis es poco frecuente para lesiones benignas locales, pero raramente ocurren en tumores de células gigantes y Condrioblastoma.

TABLA 2. Clasificación de Enneking para tumores músculo-esquelético benignos basada en características radiográficas de los márgenes del tumor.

ESTADO	DESCRIPCIÓN
Latente	Bordes muy bien delimitados
Activo	Bordes indistinguibles
Agresivo	Bordes indistinguibles

Tomada de Jawad et al. 2010.

El sistema de clasificación quirúrgico de Enneking para tumores malignos (Tabla 3) toma en cuenta el grado quirúrgico (G, G1, G2), extensión local (T, T1, T2), y la presencia o ausencia de metástasis (M0, M1). El sistema de clasificación para sarcomas músculo-esquelético malignos consiste en tres etapas. La etapa III representa cualquier tumor con metástasis distante (el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo). Las etapas I y II están basadas en grados quirúrgicos del tumor, I para bajo grado y II de alto grado. Cada etapa está dividida en 2 subcategorías (A: Intracompartimental, B: Extracompartimental) basadas en la extensión local del tumor. La etapa del tumor dictamina la extensión de la resección quirúrgica y el margen.⁹

En el sistema de clasificación de Enneking, una neoplasia es clasificada como de bajo (G1) o alto grado (G2). Una lesión de bajo grado corresponde a grados 1 o 2 con un bajo riesgo de propagación a distancia (<25%). Estos tumores están caracterizados por bajas tasas mitóticas, baja relación entre núcleo-citoplasma, y un pleomorfismo limitado. No obstante lesiones de alto grado (grados 3 y 4) tienen una gran incidencia a metástasis; están caracterizadas histológicamente por figuras mitóticas, nucléolo prominente y pleomorfismo.

En cuanto a las **características histológicas** la clasificación toma en cuenta las características clínicas y radiográficas. Esto incluye imágenes axiales para determinar las fronteras anatómicas de un tumor primario y la presencia de metástasis.²² La extensión local de cualquier neoplasia se refiere a su contenido en límites anatómicos de un compartimiento. Los compartimientos anatómicos tienen barreras inherentes a la diseminación tumoral, incluyendo planos fasciales, y estructuras del hueso. Así la extensión local determina el enfoque para procedimientos quirúrgicos y la viabilidad de márgenes quirúrgicos deseados. En general, la lesión de alto grado es más probable a invadir tejido circundante con un gran riesgo de recurrencia local y metástasis.

TABLA 3. Clasificación de Enneking para tumores músculo esquelético malignos basada en grado quirúrgico, extensión local y presencia o no de metástasis.

ESTADO	GRADO	SITIO	METASTASIS
IA	Bajo (G1)	Intracompartimental (T1)	No metástasis (M0)
IB	Bajo (G1)	Extracompartimental (T2)	No metástasis (M0)
IIA	Alto (G2)	Intracompartimental (T1)	No metástasis (M0)
IIB	Alto (G2)	Extracompartimental (T2)	No metástasis (M0)
III	Cualquiera (G)	Cualquiera (T)	Metastasis regional o distante (M1)

Tomado de Jawad, et al. 2010.

1.1.4 ETIOLOGÍA Y PATOGENIA

Se tiene un limitado conocimiento sobre la etiología del Osteosarcoma. El pico de incidencia coincide con el periodo de rápido crecimiento óseo, sugiriendo una correlación entre el crecimiento óseo y la evolución del Osteosarcoma. Las alteraciones genéticas en los sarcomas generalmente caen dentro de dos categorías:

- A) Translocaciones recíprocas con cariotipos balanceados y alteraciones en los genes supresores de tumor.
- B) Complejos de cariotipos desbalanceados con alteraciones de las vías de la proteína 53 (p53) y de la vía de Retinoblastoma (Rb) ^{36, 45}

Las vías de supresión tumoral de p53 y Rb están involucradas en la patogénesis de Osteosarcoma.⁹ Muchas muestras de tumores tienen algún tipo de inactivación combinada de las

vías de supresión tumoral de p53 y Rb. Cerca de 3% de los pacientes con una línea germinal de Osteosarcoma esporádico muta en p53.²

La alteración característica de la pérdida de heterocigosidad, o LOH por sus siglas en inglés “Loss Of Heterozygosity” del gen del retinoblastoma, donde el producto de este gen es una proteína que actúa suprimiendo el crecimiento de las células con DNA dañado (se trata de un gen supresor tumoral). La pérdida de la función de este gen permite a las células crecer de forma descontrolada, llevando a la aparición de diversos tumores, incluido el Osteosarcoma. Las mutaciones de p53, en la mayoría de los Osteosarcomas se encuentran algún tipo de inactivación combinada de Rb y p53.
22, 24

Los sobrevivientes a Retinoblastoma han tenido una incidencia aumentada a segundas neoplasias malignas, la mayoría de éstas son Osteosarcomas. En la forma hereditaria de Retinoblastoma, las mutaciones en línea germinal de genes de Rb son comunes. Las mutaciones en líneas germinales del gen de p53 conllevan a un alto riesgo de formación de tumores malignos, incluyendo Osteosarcoma (Síndrome Li-Fraumeni).^{22, 32} El producto del gene de p53 en células normales aumenta en respuesta a daño en el DNA y dirige a la célula a experimentar apoptosis, del mismo modo con el producto del gen de Rb.³⁶ Aunque las mutaciones de líneas germinales tanto de los genes p53 y Rb son raras, éstos son alterados en la mayoría de muestras de tumor de Osteosarcoma porque la mayoría de éstos tumores universalmente han tenido alteraciones genéticas que inactivan las vías supresoras tumorales de Rb y p53.

Existen otros oncogenes alterados en células tumorales de Osteosarcoma. Esto incluye la amplificación de producto del gen MDM2 “Murine double minute 2”, amplificación del gen CDK4 “Cyclin dependent kinase 4”.²⁹ La amplificación de la región 12q13 que contiene a los genes MDM2 y CDK4 puede activar ambas vías de p53 y Rb, y en efecto, estas alteraciones raramente coexisten con las expresadas en Rb o p53. Aunque es claro que los genes supresores tumorales y oncogenes están relacionados con la aparición de Osteosarcomas, no está claro cuál de esos eventos ocurre primero.³²

Otros autores han sugerido que los Osteosarcomas tienen una etiología viral, basada en el hecho de que los sarcomas óseos pueden ser inducidos en animales seleccionados por virus. Por ejemplo, hámsteres inyectados con extracto de células libres de Osteosarcoma humano desarrollan Osteosarcoma, y algunos Osteosarcomas humanos contienen virus de simio 40 (SV40) “Simian virus 40”. Un estudio en 1997 demostró que el 50% de las muestras de Osteosarcoma tenían incorporado DNA de SV40. Otro estudio en 1998 mostró que no había correlación entre la presencia de SV40 y mutación de p53 o Rb. Estos datos no son convincentes para que los virus sean el factor etiológico principal en Osteosarcoma.^{24, 32}

1.1.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Antes de establecer el diagnóstico de Osteosarcoma deben realizarse diversas pruebas y procedimientos (Tabla 4). La evaluación inicial comprende los aspectos que se muestran a continuación:

TABLA 4. Pruebas y procedimientos para la evaluación inicial de un paciente con OS.

PRUEBA	PROCEDIMIENTO
Historia Clínica Completa	Se remarca la presencia de dolor, inflamación y aumento de volumen en el sitio del tumor primario.
Examen Físico	Puede palparse una masa de tejido blando en el sitio del tumor primario
Exámenes de Laboratorio	<p>Los principales estudios de laboratorio comprenden la biometría hemática, velocidad de sedimentación globular, pruebas de función hepática y renal, química sanguínea con calcio y fósforo; fosfatasa alcalina y ácida, proteína C reactiva, factor reumatoide y antiestreptolisinas.</p> <p>Se reporta que sólo la fosfatasa alcalina y la lactato deshidrogenasa (LDH) tienen valor pronóstico; y se han observado que cuando estos valores son superiores de 900 UI/L se asocia un desenlace fatal (muerte) a corto plazo.</p>

**EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO
COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®**

<p align="center">Exámenes de gabinete</p>	<ul style="list-style-type: none"> • En las radiografías simples puede apreciarse que la localización de la lesión, el tipo de reacción periosteal, los márgenes y los cambios en el tejido blando, ayudan a identificar el tipo de tumor y a predecir su agresividad. • El uso de radiografías usualmente incluye la tomografía computarizada o las imágenes de resonancia magnética para evaluar la extensión del tumor, para localizar la masa de tejido blando comprometido intra o extracompartimental. • La gammagrafía ósea muestra actividad ósea intensa, su principal indicación es detectar lesión a nivel medular y metástasis a distancia. Esta técnica puede detectar metástasis en tejidos blandos antes que la radiología, especialmente en pulmón. • Con el uso de Tomografía por Emisión de Positrones (PET) permite disponer de una técnica para evaluar el metabolismo glucídico en tumores de alto grado o de alto recambio celular. Usa como trazador la molécula de deoxiglucosa marcada con Flúor18 (FDG), la que queda atrapada en el espacio intracelular. • Esto resulta un arma de capital importancia al diagnóstico médico, puesto que muestra qué áreas del cuerpo tienen un metabolismo glucídico elevado, que es una característica primordial de los tejidos neoplásicos.
<p align="center">Biopsia</p>	<p>En general hay 2 tipos de biopsia: la excisional (cuando el cirujano remueve la masa completamente) y la incisional (sólo se remueve una pequeña parte del tumor para su evaluación) que puede ser abierta o cerrada. El tipo de biopsia a realizarse debe ser determinado cuidadosamente por</p>

EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO
COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®

	<p>la evaluación del tamaño y localización del tumor.</p> <p>El diagnóstico definitivo requiere un examen histológico del tumor, que habitualmente se obtiene mediante la biopsia y así determinar el grado histopatológico de Osteosarcoma.</p>
--	--

Modificado de Cortés Rodríguez, et al, 2010 y Sánchez Torres, et al, 2011.

Una herramienta útil para establecer el diagnóstico y determinar el tipo de tratamiento quirúrgico más conveniente al paciente y el pronóstico, es el sistema propuesto por Enneking.²² Al momento del diagnóstico, aproximadamente del 15 al 20% de los pacientes con Osteosarcoma presentan metástasis detectable mediante radiografía donde el sitio más frecuente de las metástasis es el pulmón.^{6, 10}

1.1.6 TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO DE VIDA.

En las tres últimas décadas se han logrado sustanciales progresos en cuanto al tratamiento de los tumores óseos malignos, ya que considerando un equipo multidisciplinario se abarcan diferentes áreas.⁶

El tratamiento empleado se basa en los siguientes puntos:

a) QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

Para tratar con éxito a los pacientes debe usarse quimioterapia sistémica que se aplica de manera intravenosa o intraarterial. El concepto de quimioterapia neoadyuvante que es la que se administra antes del tratamiento quirúrgico, Actualmente se utilizan en promedio tres ciclos mensuales antes de la cirugía.

Los principales agentes activos (Tabla 5) que se aplican desde hace varios años a nivel internacional y en nuestro país son el Cisplatino, Doxorrubicina y altas dosis de Metotrexate y Ciclofosfamida. Este tratamiento favorece la reducción del tumor, su recalcificación limita su extensión y permite llevar a cabo una cirugía de preservación que posibilita conservar el miembro afectado para que el paciente recupere su autonomía motriz. En términos generales, el grado de necrosis que produce la quimioterapia es importante para determinar el manejo quirúrgico y tiene valor pronóstico para la sobrevivencia del paciente. Cuando la necrosis es superior al 98% puede considerarse que la quimioterapia ha sido efectiva y el paciente ha respondido adecuadamente.^{20,}
29

TABLA 5. Características generales de los antineoplásicos comúnmente utilizados en Quimioterapia

QUIMIOTERAPÉUTICO	PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	EFFECTOS SECUNDARIOS
Ciclofosfamida	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. (Mycek et al, 2004)	Puede producir mielosupresión, estreñimiento, anorexia, cistitis, microhematuria, azoospermia, fibrosis pulmonar crónica, pancreatitis aguda.

**EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO
COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®**

Doxorrubicina	Antraciclina que se acopla a aminoazúcares; ejerciendo su acción citotóxica mediante la formación de radicales libres, aumenta la fragmentación de DNA e inhibe la síntesis de ácidos nucleicos. (Mycek et al, 2004)	Induce Trombocitopenia, anemia, hipoxia tisular, hemorragia, leucemia mielógena aguda, hepatomegalia, derrame pleural, edema pulmonar, disfunción ventricular, alopecia, hiperpigmentación de piel y uñas.
Metotrexato	Posee actividad antiproliferativa e inmunosupresora por inhibir competitivamente a la enzima dihidrofolato reductasa (DFR), enzima clave en el metabolismo del ácido fólico que regula la cantidad de folato intracelular disponible para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Impide la formación de tetrahidrofolato necesario para la síntesis de ácidos nucleicos. (Mycek et al, 2004)	Puede suprimir la hematopoyesis y provocar anemia. Toxicidad renal así como toxicidad hepática, trastornos pulmonares como neumonitis aguda, produce reacciones dérmicas como necrólisis epidérmica tóxica.
Cisplatino	Metal pesado, perteneciente a los complejos de coordinación del platino, aumenta las especies reactivas del oxígeno y peróxido orgánico, inactivando las enzimas antioxidantes. (Mycek et al, 2004)	Induce toxicidad renal, pérdida de audición, náuseas, mielodepresión, vómito, anorexia, edema facial, disnea y taquicardia.

b) CIRUGÍA

Los adelantos que se han hecho en el manejo quirúrgico de estas neoplasias en los últimos años implican mayor tasa de supervivencia de los pacientes con estas enfermedades. El principal método local para erradicar el Osteosarcoma es la cirugía, ya que es una neoplasia relativamente resistente a la radioterapia.¹⁴ El tipo de intervención para el paciente depende del tipo de tumor, su

localización y la extensión de la enfermedad, aunque la extirpación del tumor primario generalmente se da después del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.^{6, 20}

La elección del tipo de cirugía (amputación *versus* resección/reconstrucción) depende de la edad del paciente, la localización del tumor, del compromiso de las estructuras neurovasculares y de la presencia o ausencia de fractura patológica antes o durante la inducción de la quimioterapia neoadyuvante.⁶

Se ha encontrado que los tumores malignos que cursan con una fractura patológica provocan mayor riesgo para que el paciente presente metástasis pulmonares. Para lograr la reconstrucción del miembro afectado hay básicamente tres opciones. La elección del procedimiento depende de la localización del tumor y de la edad del paciente:

- Autoinjerto de hueso. Pueden usarse autoinjertos no vascularizados como el de pelvis o autoinjertos vascularizados como el de la fíbula. Si la extensión del defecto es pequeña, frecuentemente estos autoinjertos funcionan bien.⁶
- Aloinjerto de hueso estructural. Puede ser intercalar u osteoarticular. La principal complicación que presentan estos tipos de injerto es la dificultad para incorporarlos al hueso del paciente y la facilidad con la que se puede producir una fractura. Los aloinjertos osteoarticulares pueden usarse en la reconstrucción de cualquier articulación (húmero proximal, fémur distal o tibia proximal).^{29, 38, 42}
- Endoprótesis metálica. Es un reemplazo manufacturado para el hueso afectado, generalmente hecha de acero o titanio. Es una opción que provee estabilidad inmediata al paciente. Debe ser pensada con cuidado para pacientes menores de ocho años por la inmadurez esquelética de los niños antes de esta edad. La principal complicación de este procedimiento son las infecciones que suelen presentarse hasta en el 35% de los casos.⁴²

Cirugía de conservación de miembro

Ante lesiones que afecten la extremidad superior o inferior, la cirugía de conservación del miembro puede lograr un control local de la enfermedad, sin sacrificar el miembro y preservando un resultado funcional aceptable. El grado de necrosis inducida por la quimioterapia y la resección tumoral con márgenes adecuados son los factores pronósticos más importantes para el control local de la enfermedad.³⁴

Amputación

Se indica la amputación para el control local del Osteosarcoma. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la amputación no elimina la posibilidad de recidiva local, ya que siempre existe el riesgo de recidiva tumoral en el sitio de la amputación.³¹ Esta recidiva se atribuye a la extensión tumoral intramedular extensa. Entre los factores que disminuyen la probabilidad de recidiva local están el margen quirúrgico amplio y la buena respuesta histológica a la terapia neoadyuvante.³⁵

c) QUIMIOTERAPIA DE CONSOLIDACIÓN

Se utilizan en promedio seis ciclos (altas dosis de metotrexate y/o ciclofosfamida) después de la cirugía para reducir los restos tumorales que pudieran haber quedado. Se comenzó a utilizar la quimioterapia posoperatoria y la supervivencia a los 5 años mejoró de menos de 20% a un 40-60%.¹⁵ Los regímenes de quimioterapia utilizados en estudios realizados incluyeron el metotrexate en altas dosis.⁴²

Sin embargo, los agentes citotóxicos y citostáticos son inespecíficos y muy tóxicos, produciendo diversos efectos adversos como son la pérdida de cabello, náuseas, dolor de cabeza, fiebre, efectos nefrotóxicos, cardiotóxicos, leucopenia, pérdida de peso.^{19, 31}

PRONÓSTICO

Los indicadores de pronóstico hacia Osteosarcoma incluyen, grado de enfermedad en el diagnóstico, tamaño y localización del tumor, respuesta hacia la quimioterapia y resección quirúrgica.^{31, 42} El pronóstico de sobrevida a 5 años aumentó del 60 al 75% para los pacientes con enfermedad localizada, mientras que para pacientes con metástasis al diagnóstico, la sobrevida a cinco años apenas alcanza un 20%.^{19, 35}

La metástasis pulmonar es la forma más común de diseminación a distancia. El promedio de supervivencia después de una reincidencia es menor a 1 año. La eliminación de una recurrencia potencial de metástasis pulmonar aumenta las posibilidades de supervivencia.^{19, 22}

1.1.7 ANTECEDENTES EN OSTEOSARCOMA.

En 1975 Levin reportó 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 ($p < 0.01$) en la sobrevida y en la respuesta inmunitaria celular de tipo citotóxica, comparando con pacientes que recibieron Factor de Transferencia no específico.

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

Fase I: Son pacientes que presentan tumoración primaria pequeña, y con ausencia de lesión de tipo metastásica, con niveles normales de linfocitos totales y linfocitos T en sangre periférica y su respuesta inmunitaria 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: Los pacientes presentan lesión primaria grande y evidencia de lesión metastásica, con una respuesta citotóxica muy disminuida o nula, con bajos niveles de linfocitos T y linfocitos totales. Por lo que estos pacientes no presentan una respuesta inmunitaria de tipo celular efectiva en contra del tumor.²⁸

Como conclusión plasmada en el trabajo, se describe que existe desventaja en pacientes con metástasis y masas tumorales de gran tamaño, limitando así la eficacia del Factor de Transferencia específico. Mientras que en pacientes clínicamente libres de metástasis son excelentes candidatos para recibir inmunoterapia.

1.2 INMUNOTERAPIA

El concepto de inmunoterapia en el área de las ciencias de la salud incorpora el uso de componentes del sistema inmunitario, incluyendo anticuerpos, citocinas y células dendríticas para tratar varias enfermedades tales como el cáncer, alergias, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes. La inmunoterapia también incluye el uso de vacunas para la prevención de alergias y tumores.³ Esta modalidad de terapia añade nuevas dimensiones a la práctica clínica, ofreciendo mucho más especificidad, alta eficacia, terapia dirigida, baja toxicidad, pocos efectos secundarios y una mejor tolerancia.

Pese al desarrollo de las técnicas modernas de cirugía, quimioterapia y radioterapia, frecuentemente sobreviven algunas células malignas a estas terapias y se diseminan en el organismo, haciendo necesario el desarrollo de tratamientos complementarios a los actuales. Uno de estos es la manipulación del sistema inmunitario para combatir tumores, lo que se denomina inmunoterapia del cáncer.^{12, 41}

Los objetivos fundamentales que persigue la inmunoterapia como tratamiento ante tumores son: superar los mecanismos de escape tumoral, eliminando la inmunosupresión producida por los factores derivados del tumor¹⁹, restaurar la función de éstas células y los linfocitos T, estimular la inmunidad específica que deberá destruir las células tumorales⁴¹ y aumentar la inmunogenicidad de los antígenos asociados a tumor.¹²

En los últimos años, se han desarrollado diferentes clasificaciones de inmunoterapia en el tratamiento de cáncer, dividiéndola de manera tradicional en inmunoterapia pasiva y en inmunoterapia activa, en la tabla 6 se muestran ejemplos de ambas:

TABLA 6. Agentes inmunoterapéuticos usados para el tratamiento del cáncer.

INMUNOTERAPIA	INESPECÍFICA	ESPECÍFICA
PASIVA	Transferencia de células mononucleares activadas con citocinas (Células LAK)	Anticuerpos Monoclonales como AcM Anti TGFβ ³⁴
		Transferencia de linfocitos

**EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO
COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®**

		infiltrantes de tumor (TIL)
ACTIVA	Inducción de respuesta inmunitaria de manera inespecífica (BCG, IFN- γ ó IFN- α , IL-2)	Inducción de respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos tumor específicos (Factor de Transferencia Específico) Terapia Celular Adoptiva (Células Dendríticas (DC activadas <i>in vitro</i>) ³⁴)

Modificada de Díaz Molina et al, 2012, Winbauer et al 2012.

La mayoría de estos tratamientos aún se encuentra en investigación y algunos de ellos resultan excesivamente costosos para el paciente, como por ejemplo, la aplicación de anticuerpos monoclonales (anti-TGF β combinado con CD activadas).⁴⁸

La inmunoterapia contra el cáncer se basa en el principio de que el sistema inmunitario del paciente es capaz de generar una respuesta inmunitaria contra las células tumorales. Los primeros antecedentes de reportes de inmunoterapia en cáncer datan de la década de 1890, cuando William Coley administró por primera vez una vacuna (inyección de bacterias vivas) para el tratamiento de pacientes con cáncer.^{12, 41}

A partir de las décadas de 1980-1990, cuando se lograron aislar linfocitos T citotóxicos (CTL por sus siglas en inglés) con actividad antitumoral en sangre periférica, ganglios linfáticos y tejido tumoral. Desde ahí se ha producido un creciente interés por utilizar el sistema inmune como herramienta para tratar el cáncer.⁷

Los agentes inmunoterapéuticos son una terapia complementaria usada para estimular la inmunidad antitumoral y para mejorar la respuesta clínica hacia tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer. Un agente que ha sido considerado en el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer es el extracto dializable de leucocitos (DLE) o factor de transferencia (FT), el cual no ha demostrado efectos secundarios o toxicidad. En este trabajo proponemos su uso como inmunoterapia coadyuvante por reportes anteriores en donde se han observado resultados favorables.^{13, 14, 23}

1.3 FACTOR DE TRANSFERENCIA

1.3.1 DEFINICIÓN

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

En 1940 Landstainer y Chase²⁵ describieron la transferencia de la respuesta inmunitaria celular (RIC) al inocular células de exudado peritoneal de cobayos sensibilizados a tuberculina o cloruro de picrilo a cobayos no sensibilizados, observando que estos últimos habían adquirido una RIC hacia dichos antígenos. Más tarde en 1949, Lawrence²⁷, demostró que la transferencia de la RIC, también se daba entre humanos, al transferir linfocitos viables de una persona con una intradermorreacción (IDR) positiva a la tuberculina a una persona con IDR negativa a dicho antígeno. Posteriormente en 1955 Lawrence⁷, demostró que la transferencia de la RIC se mantenía al utilizar extractos solubles de leucocitos.

En la actualidad se sabe que los extractos dializables de leucocitos (DLE, por sus siglas en inglés) son la fracción que se dializa, en una membrana con corte molecular de 12KDa, y que proviene del rompimiento de leucocitos, estos DLE son capaces de transferir la RIC.^{25, 27}

1.3.2 COMPOSICIÓN

Sandler y colaboradores en 1975^{7, 27}, demostraron por primera vez que los DLE contienen diversas especies moleculares. Actualmente se sabe que los DLE, están compuestos por más de 200 moléculas diferentes, con la capacidad de modular la respuesta inmunitaria celular.

En los DLE existen dos fracciones principales; la primera es la **antígeno inespecífica**, en donde se encuentran moléculas por debajo de 3.5 KDa, algunas de estas moléculas ya están identificadas (prostaglandinas, nicotinamida e histamina), aunque no se sabe si se encuentran biológicamente activas⁷; la otra fracción es la **antígeno específica**, su peso es entre 3.5 a 6 KDa y son de naturaleza peptídica; dentro de esta fracción se encuentran los factores de transferencia (FT)²³, que posiblemente corresponden en número a la cantidad de experiencias inmunitarias del individuo de donde se obtuvieron los DLE.^{13, 23}

1.3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y MECANISMO DE ACCIÓN

Aunque se desconoce el mecanismo de acción de los DLE, se sabe de manera general que tienen efectos inmunomoduladores²³, esto se puede observar, en las propiedades reguladoras estudiadas en una diversidad de enfermedades humanas, desde autoinmunes hasta inmunodeficiencias, entre otras. En los últimos años se han realizado estudios *in vitro*, para conocer sus actividades biológicas como: Análisis de la proliferación, activación celular y producción de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-2, IL-12, RANTES, OPN), observándose que los efectos sobre la proliferación, la activación y la secreción de citocinas son dependientes de la concentración a la cual sean utilizados los DLE.¹³

1.3.4 USOS CLÍNICOS

Los DLE se han utilizado como agentes inmunomoduladores en diversos grupos de enfermedades: infecciones (virales^{13, 43}, micóticas¹⁴, bacterianas⁷ y parasitarias²³), inmunodeficiencias severas²¹, hipersensibilidades²⁷, autoinmidades²⁸ y como inmunoterapia adyuvante en neoplasias.²⁷ En la tabla 7 se aprecian las distintas enfermedades en las que se ha usado al DLE como terapia.

Con respecto a las aplicaciones clínicas enfocadas a neoplasias. Franco-Molina y colaboradores experimentaron con el DLE, usándolo como agente inmunoterapéutico hacia pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar fase uno. Como resultados de la administración de DLE se indujo una actividad inmunomoduladora (aumentando el número total de leucocitos y las subpoblaciones de linfocitos T, tales como linfocitos T cooperadores CD4+, linfocitos T citotóxicos CD8+ y células NK CD56+) aumentando así la calidad de vida de los pacientes.³⁴

Fernández y colaboradores evaluaron el efecto del DLE en la mielosupresión inducida por la quimioterapia en pacientes con leucemia aguda. En los pacientes tratados con DLE el número de leucocitos aumentó. No hubo evidencia que el DLE acelerara la proliferación de células leucémicas, en cambio sí es seguro para acelerar la recuperación de células hematopoyéticas.¹⁵

TABLA 7. Aplicaciones clínicas del Extracto Dializable de Leucocitos

I.- Inmunodeficiencias	IV.- Neoplasias
<ol style="list-style-type: none"> 1. Síndrome de Wiskott-Aldrich 2. Ataxia telangiectasia 3. Inmunodeficiencia severa combinada 4. Anomalia de Di George 5. Disgamaglobulinemia 6. Síndrome de Hiper IgE 7. Deficiencia selectiva de CD4 8. Enfermedad Granulomatosa Crónica 9. Inmunodeficiencia Común Variable 10. Hipo o Agammaglobulinemias 11. Deficiencia selectiva de IgA 12. Neutropenias cíclicas 13. Deficiencias en fagocitosis 14. VIH 15. Asociadas a enfermedades crónicas como DM 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cáncer de estómago 2. Cáncer de próstata 3. Cáncer de pulmón 4. Cáncer de colon 5. Osteosarcoma 6. Cáncer de mama 7. Carcinoma nasofaríngeo 8. Hipermefroma 9. Metástasis
II.- Enfermedades Infecciosas	V.- Hipersensibilidad
<p>A.- Hongos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Candidiasis mucocutánea crónica 2. Histoplasmosis diseminada 3. Coccidioidomicosis diseminada 4. Queratitis micótica <p>B.- Virus</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Citomegalovirus 2. Herpes zóster cutáneo 3. Queratitis Estromal Herpética 4. Sarampión 5. Varicela 6. Hepatitis 7. Molusco contagioso <p>C.- Bacterias</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tuberculosis 2. Lepra 3. Micobacteriosis por <i>M. avium</i> 4. Brucelosis 5. Gram positivas 6. Gram negativas <p>D.- Protozoarios</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Leishmaniasis cutánea 	<ul style="list-style-type: none"> • Asma bronquial • Dermatitis atópica • Rinitis alérgica • Urticaria y angioedema • Conjuntivitis alérgica • Alergia a alimentos • Alergia a medicamentos
III.- Enfermedades autoinmunitarias	VI.- Otros
<ol style="list-style-type: none"> 1. Lupus eritematoso sistémico 2. Artritis reumatoide 3. Esclerosis múltiple 4. Síndrome de Sjögren 5. Espondilitis anquilosante 6. Enfermedad Inflamatoria Intestinal 7. Síndrome de Behçet 	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de fatiga crónica • Depresión

1.3.5 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS.

El Factor de Transferencia se prepara de acuerdo al método descrito por Lawrence, 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.^{25, 27}

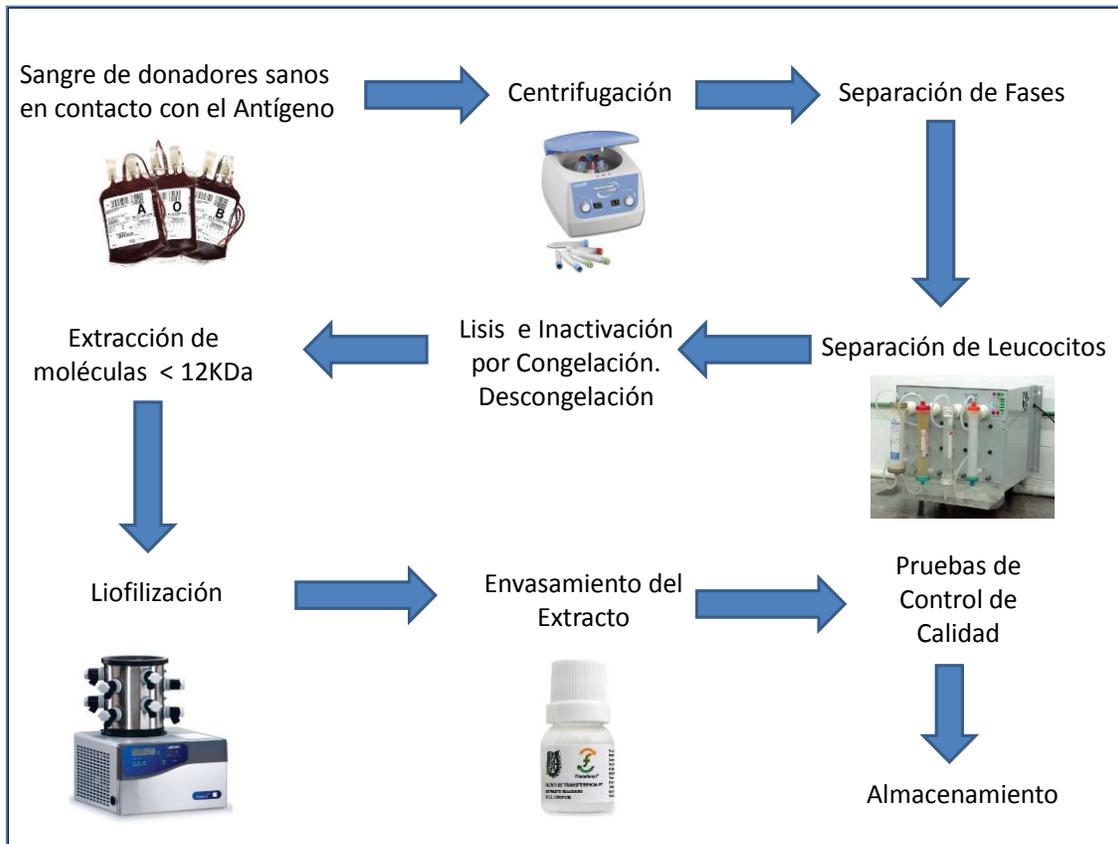


FIGURA 6. Proceso de Obtención del Factor de Transferencia.

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) ver figura 6; 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 sensibilizado.^{46, 47}

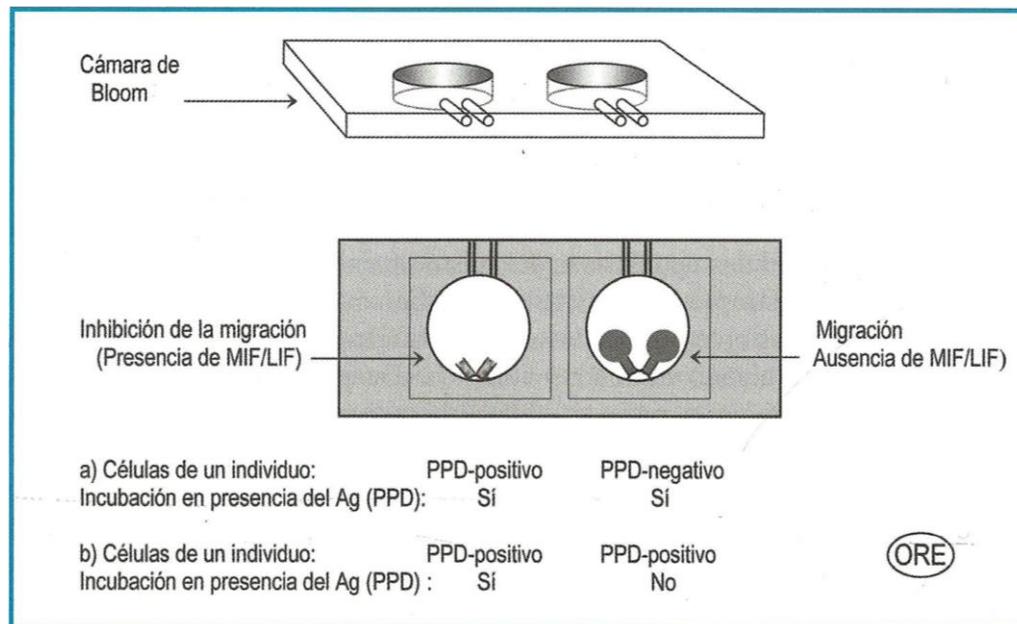


FIGURA 7. Componentes para realizar la prueba de LIF

La prueba de LIF se utiliza para medir la competencia inmune celular de un individuo hacia antígenos potencialmente peligrosos. En la parte superior del esquema se muestra el aspecto general del dispositivo usado en esta prueba (cámara de Bloom); en la parte inferior del mismo, se ejemplifican los posibles resultados encontrados: (Ver Figura 7)

- En presencia del antígeno, las células de un individuo PPD+ producen LIF y éste inhibe la migración de los leucocitos (la prueba es positiva). Las células de un individuo sin inmunidad celular hacia PPD (células PPD negativas) no producen LIF aún en presencia del antígeno; en este caso ocurre la libre migración de las células (la prueba es negativa)
- En presencia del antígeno las células de un individuo PPD+ producen LIF y éste inhibe la migración de los leucocitos (la prueba es positiva. En ausencia del antígeno, las células del individuo PPD+ no producen LIF y entonces ocurre la libre migración de los leucocitos (la prueba es negativa)

1.4 GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNITARIO E INMUNOVIGILANCIA

Debido a que las células que participan, el sistema inmunitario juega un papel relevante en el desarrollo de tumores óseos a continuación se resumirán los componentes más importantes y su relevancia en la inmunovigilancia.

La primera fase de cualquier respuesta inmunitaria consiste en el reconocimiento de un agente extraño o patógeno y la posterior generación de una respuesta efectora destinada a la destrucción y eliminación del patógeno. La respuesta inmunitaria se divide en: una respuesta inmunitaria **Innata** y otra respuesta inmunitaria de tipo **Adaptativa**.

Una de las diferencias que existe entre ambos tipos de respuesta es la alta especificidad de la adaptativa hacia el antígeno que la generó y la intensidad de la respuesta al ir aumentando en número de exposiciones al mismo agente patógeno: el sistema inmunitario adaptativo “recuerda” al agente infeccioso y es capaz de impedir que provoque una enfermedad, es decir que genera memoria. Las dos características principales de la respuesta inmunitaria adaptativa son la especificidad y la memoria.⁴⁶

Las células que participan principalmente en las respuestas inmunitarias son los leucocitos: Un grupo importante de leucocitos son las células fagocíticas, entre las que se encuentran los monocitos, los macrófagos y los polimorfonucleares (Neutrófilos). Estas células endocitan a los microorganismos, los ingieren y los destruyen. Como los sistemas de reconocimiento que utilizan son primitivos y carentes de especificidad y les permiten unirse a una amplia variedad de productos microbianos, estos leucocitos son mediadores de respuestas innatas. Su misión es formar una primera línea de defensa frente a la infección.⁴⁸

Otro grupo importante de leucocitos son los linfocitos. La participación de estas células es esencial en todas las respuestas inmunitarias adaptativas, ya que reconocen de forma específica patógenos individuales, independientemente de que éstos se localicen en el interior de las células del hospedero o en el exterior de las mismas en los líquidos tisulares o en la sangre.

Los linfocitos no se pueden distinguir morfológicamente, pero si por sus características fenotípicas y sus funciones especializadas, estos se dividen en tres subpoblaciones: los linfocitos T, los linfocitos B y las células Asesinas Naturales (NK). Algunas características de éstas células se muestran en la tabla 8.

TABLA 8. Características generales de las subpoblaciones linfocitarias.

CLASE	FUNCIONES PREDOMINANTES	FENOTIPOS DE SUPERFICIE	PORCENTAJE DE LINFOCITOS TOTALES		
			SANGRE PERIFÉRICA	GANGLIOS LINFÁTICOS	BAZO
Linfocitos B	Producción de anticuerpos	CD19+ CD21+	10 – 15	20 – 30	50 – 60
Linfocitos T cooperadores	Estimulación del crecimiento y diferenciación de linfocitos B. Activación de macrófagos por citocinas secretadas	CD3+ CD4+ CD8-	50 – 60	20 – 30	30 – 40
Linfocitos T citotóxicos	Lisis de células infectadas por virus, células tumorales y aloinjertos	CD3+ CD8+ CD4-	20 – 25	15 – 20	10 – 15
Linfocitos T reguladores	Regulación de respuestas inmunitarias	CD3+ CD4+ CD25+	5 – 10	<1	<1
Células NK	Lisis de células infectadas por virus, células tumorales, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo	CD56+ CD16+	10 – 15	<1	<1

Modificada de Parslow et al 2002 y Abbas 2004.

1.4.1 LINFOCITOS B

Se desarrollan y maduran en la médula ósea, su función principal consiste en secretar anticuerpos en la sangre y de este modo impedir la proliferación de invasores extraños. Tales células constituyen el principal tipo celular que participa en la inmunidad humoral. Estas células también desempeñan funciones adicionales en el sistema inmunitario. Tal es el caso de funcionar como células presentadoras de antígeno al procesar y mostrar las sustancias extrañas, de manera que los Linfocitos T puedan reconocerlas.

Los linfocitos B participan en la respuesta contra tumores mediante la producción de anticuerpos, donde la mayoría de los anticuerpos están dirigidos contra autoantígenos. Los linfocitos B en el infiltrado inflamatorio inducen la liberación de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) promoviendo la angiogénesis lo que facilita la diseminación de las células neoplásicas a través de los nódulos linfáticos.^{1, 34}

1.4.2 LINFOCITOS T

LINFOCITOS T COOPERADORES (CD3+CD4+)

Los linfocitos T cooperadores del inglés “helper” corresponden a un subgrupo de linfocitos T que posee como marcador clásico de membrana la molécula CD4+. Deben su nombre al importante papel que cumplen colaborando con las respuestas de otras células del sistema inmunitario tales como linfocitos T citotóxicos, macrófagos, linfocitos B y neutrófilos.³⁹ Dentro de esta categoría podemos encontrar los siguientes linajes de linfocitos:

LINFOCITOS TH1

Los linfocitos Th1 son células que se activan por las citocinas IL-12 e IFN- γ secretadas por las células dendríticas. La IL-12 promueve una mayor expansión y diferenciación de los linfocitos Th1. Los linfocitos Th1 activados producen IL-2, IFN- γ , TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) y linfo toxina (TNF- β ó LT- α).²¹

La IL-2 secretada por los linfocitos Th1 estimula la proliferación de linfocitos T. Además permite la activación de linfocitos B, macrófagos y células NK. El IFN- γ estimula a los linfocitos Th1 y el crecimiento de células B, la producción de IgG, inhibe a los linfocitos Th2, y finalmente activa a los macrófagos^{21, 44}

La principal función de los linfocitos Th1 es la activación de macrófagos. De esta manera, los linfocitos Th1 cumplen un rol fundamental en la eliminación de microorganismos intracelulares. La

activación del macrófago por parte del linfocito Th1 estimula la potenciación de sus mecanismos microbicidas como la formación de óxido nítrico y superóxido para la destrucción de las bacterias. Además, aumentan las moléculas MHC de clase II, con lo cual se aumenta la presentación antigénica del macrófago a otras células T.²¹

LINFOCITOS TH2

Los linfocitos Th2 son células que son inducidas potencialmente por la presencia de IL-4 a partir de células TCD4 indiferenciadas. Producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. La principal función de los linfocitos Th2 es la activación y expansión clonal de los linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas, en especial de isotipo IgG, IgA e IgE. La IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 son factores de crecimiento para células B, en tanto, la IL-10 inhibe la activación de los macrófagos.^{18, 21}

Además los linfocitos Th2 participan en el cambio de clase de inmunoglobulina hacia IgE, la cual cobra especial importancia en procesos alérgicos y en la inmunidad frente a parásitos.¹⁸

LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (CD3+CD8+)

Los linfocitos T citotóxicos representan una población linfocitaria que posee el marcador de membrana CD8+. Su respuesta efectora principal se encuentra dirigida a la eliminación de células infectadas por virus o células cancerosas. Reconocen péptidos unidos a moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) mediante su receptor TCR. Tras su activación, se expanden gracias a la IL-2 secretada por los linfocitos Th1, aumentando de ésta manera el número de células efectoras contra un antígeno en particular.¹⁸ Para ejercer su función citotóxica cuentan con los siguientes mecanismos:

- 1) **Perforinas:** Es una proteína presente en los gránulos citoplasmáticos de las células citotóxicas que produce poros en las membranas de las células blanco. A través de los poros penetran otras perforinas granulares como las granzimas y la granzosina, que en conjunto, causan la muerte por lisis o necrosis, de la célula tumoral.^{44, 49}
- 2) **Granzimas:** Ingresan a la célula blanco a través de los poros generados por las perforinas. Activan la procaspasa 3 y 8 en la célula diana activando así la apoptosis de ésta. Se reconocen las granzimas A, B, H, K y M.
- 3) **Ligando de Fas** también llamada (FasL, CD95L, CD178): Su ligando, la molécula Fas (CD95) se expresa en células bajo estrés (por ejemplo células infectadas por virus o células cancerosas). La interacción entre Fas y su ligando induce la apoptosis en células blanco.³⁸

LINFOCITOS T REGULADORES

Los linfocitos T reguladores (Treg) también conocidos como linfocitos T supresores constituyen una población de linfocitos que juegan un papel fundamental en la regulación del sistema inmunitario y en la tolerancia ante antígenos propios.³⁹ Tienen la capacidad de regular la activación y función de células T y B.

Son células T que expresan la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) en forma constitutiva, por lo tanto son linfocitos T CD4+ CD25+. Es una molécula indispensable en la generación y manutención de células T reguladoras naturales. Las células T reguladoras expresan el factor de transcripción Forkhead box P3 (FoxP3) el cual controla su desarrollo. El transcriptor FoxP3 tiene efectos transactivadores (regulación transcripcional positiva) induciendo a aumentar la expresión de CD25, CTLA-4 (antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico), y GITR (receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides) y efectos represores (regulación transcripcional negativa) inhibiendo la producción de IL-2, NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados) y NF- κ B (factor nuclear Kappa Beta).^{18, 44}

Las células T reguladoras desempeñan un papel crucial en el microambiente de enfermedades frente a tumores, su presencia puede suprimir las funciones efectoras de linfocitos T CD4+ Y CD8+, específicos de tumor, promoviendo así su desarrollo. El mecanismo de supresión inmunitario que utilizan estas células implica la secreción de IL-10 y TGF- β que inhiben la maduración de células dendríticas utilizando un mecanismo dependiente de CTLA-4 para producir indolamina 2,3-dioxigenasa, que convierte el triptófano en quinureninas inductoras de la apoptosis de linfocitos T.

1.4.3 CÉLULAS NATURAL KILLER

Las células NK constituyen la tercera estirpe de células de tipo linfoide, se encuentran en sangre, bazo y médula ósea y en muy baja proporción en ganglios linfáticos. Su función esencial de estas células es identificar y destruir células blanco infectadas o que sufren procesos neoplásicos. A diferencia de la actividad de los linfocitos T citotóxicos, no requiere la expresión de antígenos acoplados al MHC-I en la célula blanco y se produce de forma espontánea, es decir, sin una fase de sensibilización previa.⁴

Estas células son eficientes en la destrucción de células tumorales. Son la primera línea de defensa frente a células tumorales, y participan en el rechazo de células tumorales trasplantadas, prevención de metástasis, regulan la proliferación de células madre hematopoyéticas en médula ósea y timo. No participan en la destrucción de células tumorales ya establecidas, su actividad en sangre periférica tiende a desaparecer al progresar la enfermedad.¹⁵

1.5 RESPUESTA INMUNE FRENTE A CÁNCER

1.5.1 RESPUESTA INNATA

Las células NK tienen la capacidad de destruir muchos tipos de células tumorales, especialmente células que tienen una expresión de moléculas MHC de clase I reducida, lo cual les permite escapar de la lisis mediada por los linfocitos T citotóxicos CD8+.¹ Así pues, las células NK responden a la ausencia de MHC clase I, debido a que el reconocimiento de esta molécula provee señales inhibitorias para las células NK⁴², algunos tumores pierden la expresión de moléculas MHC clase I, quizá como consecuencia a una selección en contra de células que expresan MHC de clase I por los linfocitos T citotóxicos, estos mecanismos alterados promueven que los tumores sean blanco perfecto para la actividad de células NK.^{1, 44, 50}

Se sabe también que las células NK expresan en su superficie las moléculas FcγRIII (Receptor de la fracción cristalizante de la IgG) también conocida como CD16 las cuales tienen 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, este mecanismo es denominado Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos de las siglas en inglés ADCC.^{1, 21, 44}

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 la capacidad de unirse a la IgG libre, lo cual confirma 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 citocinas en las células NK, particularmente IFN-γ, y al mismo tiempo induce la desgranulación de la célula NK que está en contacto con la célula blanco, provocando así la apoptosis de la misma.^{1, 4}

1.5.2 RESPUESTA ADAPTATIVA

Existen dos tipos de respuesta inmune adaptativa; la inmunidad humoral e inmunidad celular. En la inmunidad humoral participan las moléculas denominadas anticuerpos, los cuales son producidos por las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B, mientras que en la inmunidad celular participan principalmente los linfocitos T.¹

RESPUESTA HUMORAL

Los anticuerpos pueden destruir a las células tumorales activando el complemento o mediante el fenómeno de ADCC, donde las células NK y macrófagos portadores de receptores Fc median la destrucción de las células tumorales, tal como se describió con anterioridad.⁴⁴

RESPUESTA CELULAR

En esta respuesta inmunitaria se encuentran diversas poblaciones linfocitarias encargadas de eliminar o bien, controlar el crecimiento y proliferación de las células tumorales, entre estas poblaciones se encuentran los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y linfocitos T cooperadores (CD4+).

1,4, 21

A) LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (CD8+)

Estas células son el principal mecanismo de inmunidad anti-tumoral ya que llevan a cabo la destrucción de las células tumorales, esta subpoblación linfocitaria desempeña su función de vigilancia reconociendo y destruyendo células malignas que expresan péptidos derivados de células mutantes o de proteínas de virus oncogénicos, que son presentados en asociación con las moléculas MHC clase I.¹

B) LINFOCITOS T COOPERADORES (CD4+)

Esta subpoblación linfocitaria desempeña su función antitumoral produciendo citocinas (por ejemplo la IL-2) que cooperan con el desarrollo y diferenciación de los linfocitos T citotóxicos.³⁸ Asimismo, las células T cooperadoras específicas a hemoantígenos tumorales pueden secretar citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), que pueden aumentar la expresión de moléculas MHC clase I por la célula tumoral y aumentar así la capacidad citolítica de los linfocitos T citotóxicos. Es posible también que el IFN- γ active macrófagos para destruir a las células tumorales.^{1, 21, 51}

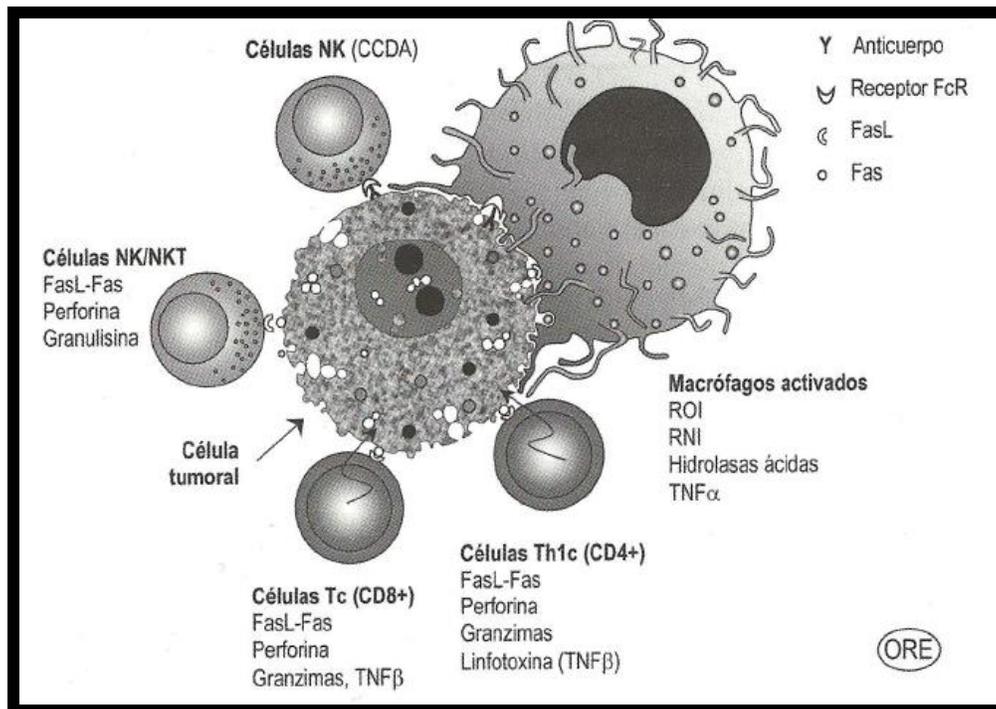


FIGURA 8. Poblaciones celulares que participan en el control del desarrollo tumoral.

Dentro de la respuesta inmunitaria celular contra tumores, los linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos y células NK desarrollan un papel importante en el control y/o eliminación de células tumorales por medio de diferentes mecanismos, como por ejemplo, mediante la producción de interferón gamma, en el caso de los linfocitos T citotóxicos, o bien mediante la liberación de granzimas y perforinas por parte de las células NK. El receptor transmembranal Fas, una vez que se ha unido a su ligando FasL, interactúa con un factor asociado a apoptosis, activando el complejo cisteinil-aspartato proteasas (caspasa), estas son proteínas clave en la transducción y ejecución de señales apoptóticas, se han descrito once caspasas en células humanas que provocan una degradación proteínica bien definida hasta llegar a los cuerpos apoptóticos.^{1, 4, 44}

Diversos estudios realizados in vitro con las células linfoides y las células tumorales de una persona con alguna neoplasia han demostrado que las células linfoides tienen la capacidad de matar a las células tumorales. Las células linfoides que han sido estudiadas incluyen a las células T CD8+, células T CD4+, NK y NKT, y a los macrófagos activados por las células T. En conjunto, la muerte de las células blanco ocurre por apoptosis y necrosis, a través de la participación de perforinas, granulinas, radicales libres del oxígeno (ROI) y el nitrógeno (RNI), enzimas hidrolíticas y por la interacción del ligando Fas-FasL inductora de apoptosis.^{50, 51}

1.6 CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una tecnología que simultáneamente mide y analiza múltiples características físicas de partículas individuales, generalmente células a medida que fluyen en la dispersión a través de un haz de luz. Las propiedades medidas incluyen el tamaño de partícula, granularidad o complejidad interna y la intensidad de fluorescencia. Estas características son determinadas usando sistema de acoplamiento óptico-electrónico. Un citómetro se compone de tres sistemas principales: fluido, óptico y electrónico.^{38, 49}

- El sistema de fluido transporta partículas en una corriente de haz de láser para ser analizadas.
- El sistema óptico consta de rayos láser para iluminar las partículas de las muestras que son transportadas en el fluido, así como de filtros de luz para dirigir las señales de luz resultantes a los detectores.
- El sistema electrónico reconoce las señales de luz detectadas en señales electrónicas que pueden ser reconocidas por la computadora. Una serie de detectores en el punto en el que el chorro de líquido atraviesa el rayo de luz. Uno se coloca en línea con el rayo de luz (a este detector se lo conoce como FSC, por *Forward Scatter* o detector de Dispersión Frontal), y varios angularmente a la trayectoria del rayo (a estos se los conoce como SSC, por *Side Scatter*, o detectores de Dispersión Lateral); además de uno o más detectores de fluorescencia.

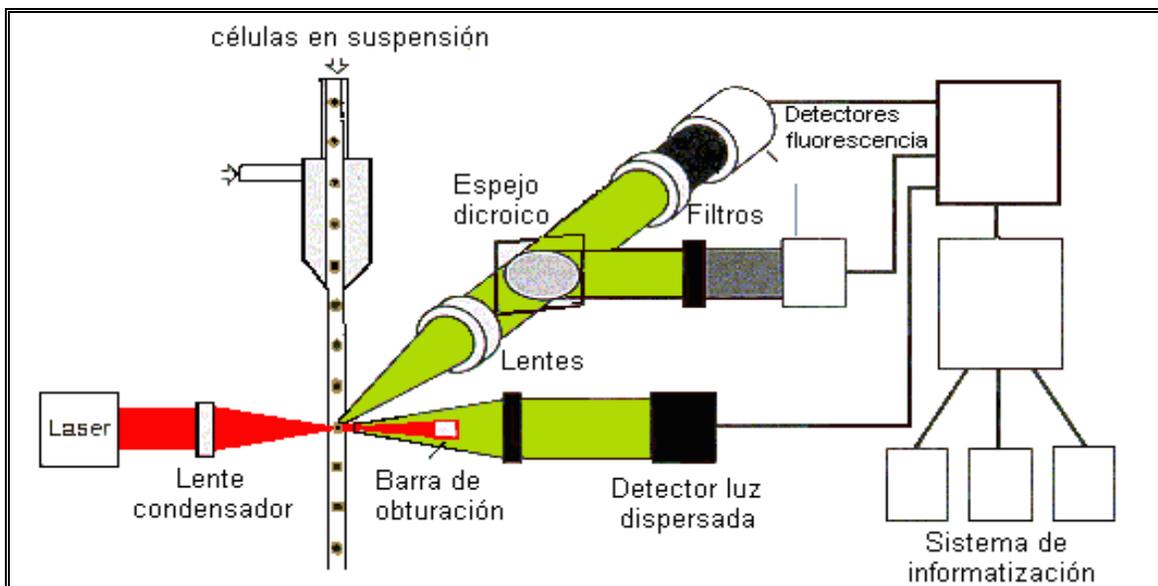


FIGURA 9. Componentes de un citómetro de flujo.

La producción de un número cada vez mayor de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a epitopos de antígenos presentes en células humanas ha impulsado enormemente la utilización de la citometría de flujo para la identificación y clasificación de células tanto normales como patológicas. Su empleo se basa en la identificación de antígenos mediante anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos. El empleo de fluorocromos que siendo excitados en longitudes de onda similares emiten en diferente zona del espectro luminoso, amplía a su vez el campo de aplicaciones de la citometría de flujo al poder combinar el uso en una misma muestra de diferentes anticuerpos monoclonales. El isotiocianato de fluoresceína, la ficoeritrina y el PerCP son en la actualidad los fluorocromos más empleados en el marcaje de anticuerpos monoclonales. Todos ellos se excitan a 488nm (luz azul) si bien emiten en la zona del verde, naranja y rojo, respectivamente.^{49, 50}

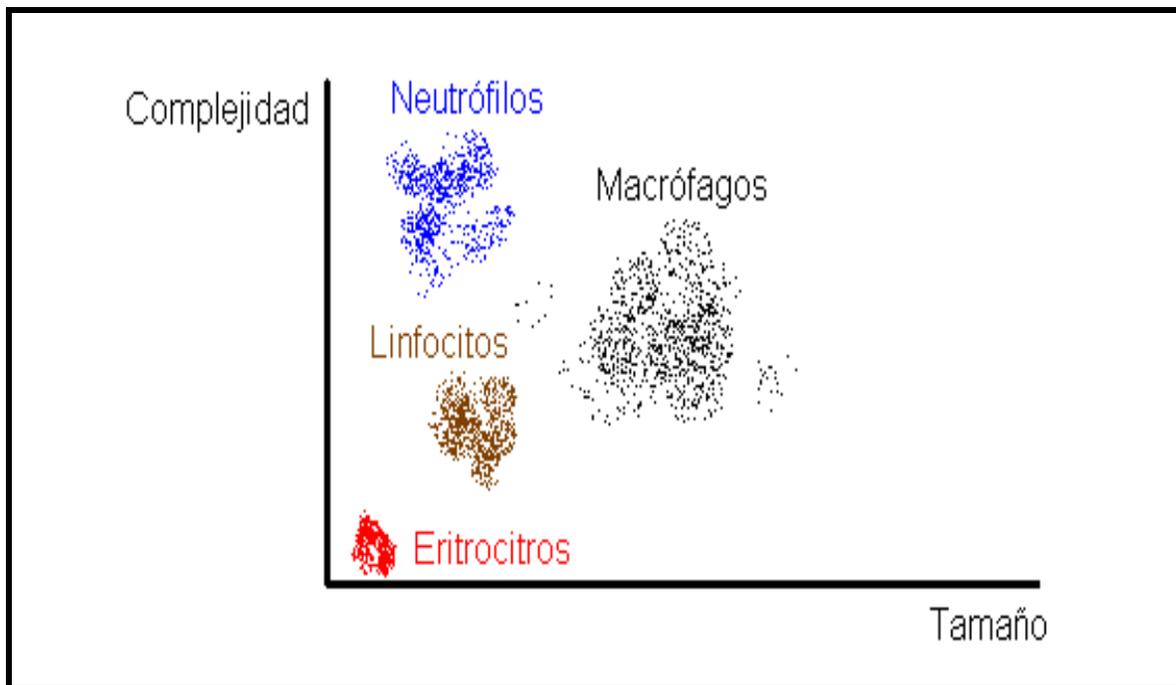


FIGURA 10. Gráfico que muestra varias secciones de puntos, donde cada punto representa a una célula por individual

La figura ejemplifica en puntos de una muestra de sangre periférica, en donde el eje de las “X” representa el tamaño celular (FSC) y en el eje de las “Y” la complejidad o granularidad citoplasmática (SSC), de acuerdo a la dispersión de la luz dada por el tamaño y la forma del núcleo podemos identificar la región donde se ubican los linfocitos y PMN (Polimorfonucleares),

2. JUSTIFICACIÓN

En los pacientes con OS de diagnóstico tardío, se reporta una sobrevida del 15 al 20% de los casos, aún con el tratamiento multimodal. Por lo que es necesario buscar opciones como la inmunoterapia (Transferón®) que coadyuven a una mejor respuesta al tratamiento e impacte en la calidad de vida de estos pacientes.

Es importante determinar si existe relación entre el número de: Linfocitos T cooperadores ($CD3^+ CD4^+$), Linfocitos T reguladores ($CD3^+ CD4^+ CD25^+$), Linfocitos T citotóxicos ($CD3^+ CD8^+$) y Células Natural Killer ($CD3^- CD56^+$) y la respuesta al tratamiento coadyuvante con Transferón®, así como la modificación de la progresión de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

Si en el Osteosarcoma de diagnóstico tardío se presenta una pobre respuesta mediada por las células NK y Linfocitos T Citotóxicos CD3+CD8+, entonces se espera que al coadyuvar con un tratamiento inmunomodulador a base Transferón, se modificará el tiempo de sobrevida y aumentará el número de células leucocitarias y linfocitarias de los pacientes analizados.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el impacto clínico a través de tiempo de supervivencia, calidad de vida y mejora de la respuesta inmunitaria por la determinación de: Linfocitos T cooperadores (CD3⁺ CD4⁺), Linfocitos T reguladores (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺), Linfocitos T citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺) y Células Natural Killer (CD3⁻ CD56⁺), después del uso de Transferón® (Factor de transferencia) como coadyuvante al tratamiento convencional de los pacientes que presentan Osteosarcoma (OS).

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Monitorear el curso clínico de los pacientes con Osteosarcoma tratados y no tratados con Transferón®, evaluando el tiempo de supervivencia al inicio y al final del estudio.
- Determinar el número absoluto y porcentual de leucocitos, Linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+), Linfocitos T reguladores (CD3+CD4+CD25+), Linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) y Células Natural Killer (CD3-CD56+), en sangre periférica al inicio, durante y al final del tratamiento.
- Determinar si existe alguna correlación entre el estado de la enfermedad y el porcentaje de poblaciones leucocitarias y linfocitarias de los pacientes incluidos en este estudio antes y después del tratamiento coadyuvante con Transferón®.

5. MODELO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio piloto, longitudinal, comparativo, abierto en pacientes diagnosticados con Osteosarcoma los cuales fueron divididos al azar, de forma pareada en edad y sexo en cuatro grupos de estudio y se evaluó la respuesta al tratamiento convencional (quimioterapia y cirugía) solo o combinado con Transferón®.

El seguimiento de los pacientes incluidos en este estudio se realizó como mínimo a dos años desde el inicio del tratamiento. Se tomaron muestras sanguíneas para las determinaciones inmunológicas al inicio, durante y al final del tratamiento.

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se trabajó con 18 pacientes con diagnóstico de Osteosarcoma, de acuerdo a la clasificación de Enneking se encontraron en etapas II y IV, que acudieron al Instituto Nacional de Rehabilitación en el servicio de tumores óseos y se dividieron al azar de forma pareada en edad y sexo en cuatro grupos.

- **Grupo 1.** Un Paciente con metástasis que recibió 3 ciclos de Quimioterapia neoadyuvante, cirugía conservadora o radical y 3 a 6 ciclos de Quimioterapia de consolidación.
- **Grupo 2.** Cuatro pacientes con metástasis que recibieron 3 ciclos de Quimioterapia neoadyuvante, cirugía conservadora o radical, 3 a 6 ciclos de Quimioterapia de consolidación y 10 unidades de Transferón® vía oral por mes, administrados durante los primeros 6 meses de su tratamiento y se mantuvieron con 2 unidades por semana hasta completar dos años de seguimiento posteriores al tratamiento médico quirúrgico.
- **Grupo 3.** Nueve pacientes sin metástasis que recibieron 3 ciclos de Quimioterapia neoadyuvante, cirugía conservadora o radical, 3 a 6 ciclos de Quimioterapia de consolidación y 10 unidades de Transferón® vía oral por mes administrados durante los primeros 6 meses de su tratamiento y se mantuvieron con 2 unidades por semana hasta completar dos años de seguimiento posteriores al tratamiento médico quirúrgico.
- **Grupo 4.** Cuatro pacientes sin metástasis que recibieron 3 ciclos de Quimioterapia neoadyuvante, cirugía conservadora o radical y 3 a 6 ciclos de Quimioterapia de consolidación.

5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de OS
- Pacientes que firmaron la carta consentimiento informado para participar en este estudio (Ver Anexo 1)

5.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes que no acudieron a sus citas de seguimiento en el servicio de tumores óseos del INR o interrumpan su tratamiento.
- Pacientes que decidieron abandonar el protocolo.
- Eliminación de la muestra si esta fue insuficiente o lísada.

5.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con otras enfermedades óseas
- Pacientes con enfermedades concomitantes (renales, cardíacas, o Gastrointestinales)
- Pacientes con enfermedades de origen inmunológico.
- Mujeres embarazadas o en período de lactancia.

5.5 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO Y DE SUS ESCALAS DE MEDICIÓN.

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Tratamiento 1: Tratamiento convencional multimodal o multidisciplinario (quimioterapia neoadyuvante (Doxorrubicina, Cisplatino, Metotrexate y/o Ciclofosfamida), la resección quirúrgica que implican la eliminación macroscópica de la masa tumoral y la quimioterapia de consolidación)

Tratamiento 2: Tratamiento convencional multimodal o multidisciplinario más Transferón® específico.

VARIABLES DEPENDIENTES:

- Sobrevida a lo largo del estudio (Meses)
- Número de Leucocitos (Células/mm³),
- Número de Linfocitos T (Células/mm³),
- Porcentaje de CD3+CD8+ (Células T Citotóxicas), CD3+CD4+ (Células T Cooperadoras), CD3+CD4+CD25+ (Células T Reguladoras)
- Porcentaje de CD3+ CD56+ (Células NK)

DEFINICIÓN CONCEPTUAL

Tiempo de sobrevida: Periodo en el que el paciente se encuentra sin evidencia clínica de actividad tumoral.

Número y % de Subpoblaciones celulares: Cantidad de células leucocitarias cuantificadas en relación de una unidad de medida.

DEFINICIÓN OPERACIONAL

Tiempo de sobrevida; Son los meses en el que el paciente se encuentre vivo. La OMS considera 5 años sin evidencia clínica de enfermedad como curación.

Las subpoblaciones leucocitarias: Serán consideradas como la cantidad de células presentes en las muestras de sangre periférica obtenidas al inicio, durante y al final del tratamiento medido en valores porcentuales o absolutos de células por mm³

5.6 ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTO CONVENCIONAL MULTIMODAL

Se administraron 3 ciclos mensuales de quimioterapia neoadyuvante con combinación de agentes terapéuticos (Doxorrubicina, Cisplatino, Metotrexate y/o Ciclofosfamida), resección quirúrgica conservadora o radical (eliminación macroscópica de la masa tumoral o de miembro afectado) y de 3 a 6 ciclos de quimioterapia de consolidación (altas dosis de Metotrexate y/o Ciclofosfamida).

5.7 ADMINISTRACIÓN DE EXTRACTO DIALIZADO DE LEUCOCITOS (EDL ó DEL)

Se administró 1 unidad de Transferón®, vía oral, un día antes de la quimioterapia, 1 durante la quimioterapia (3 días de quimioterapia por ciclo) y posteriormente se administró 1 unidad cada tercer día como dosis de mantenimiento hasta el siguiente ciclo de quimioterapia (un total de 10 unidades por 6 meses). Al término de los ciclos de Quimioterapia de consolidación se mantuvo un mes más a los pacientes con dos unidades por semana hasta concluir los dos años del protocolo.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron por una prueba estadística no paramétrica (Método de Kruskal Wallis) que 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 porcentaje de sobrevida se realizó la prueba de Mantel Cox que permitió evaluar la eficacia de un tratamiento en dos poblaciones separadas. Las pruebas estadísticas y las gráficas que se muestran en este trabajo fueron elaboradas con el programa Graph_Pad Prism 5.1.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 PRODUCCIÓN DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA ESPECÍFICO (F_{Te})

El F_{Te} 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 que desarrolla un tumor (biopsia) que previamente fue tipificado como Osteosarcoma por especialistas en la unidad de Histopatología del INR.

6.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se llevó a cabo una toma de 5 mL de sangre periférica por punción venosa utilizando tubos (Becton Dickinson®) con EDTA como anticoagulante, ésta muestra es necesaria para el análisis del fenotipo linfocitario y leucocitario.

6.3 REACTIVOS

- ❖ Líquido de Turk (Hycl, Número de catálogo; 980)
- ❖ Colorante Wright-Giemsa (Hycl. Número de catálogo: 840)
- ❖ Solución de lisis 1x (Becton Dickinson Biosciences, Número de Catálogo: 340182),
- ❖ Solución PBS 1x, Paraformaldehído 1% y anticuerpos monoclonales que a continuación se describen:
 - γ FITC y PE (Catálogo: 340 182, BD Biosciences)
 - CD45 FITC (Beckman Coulter Company) + CD14 PE (Catálogo: 340 182, BD Biosciences).
 - CD19 PE + CD56 FITC.(Catálogo: 340546, Becton Dickinson)
 - CD3PercP + CD4 FITC + CD25 PE (Catálogo: 341 134, Becton Dickinson).
 - CD8 PE (Catálogo: 12-0089-73, eBioscience)

6.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- ❖ Citómetro de flujo (FACS-Calibur de BD)
- ❖ Microscopio óptico (Marca Carl Zeiss Company, Modelo 1104J13303)
- ❖ Micropipetas de volúmenes (Finnipipette Labsystems: 0.2-2μL, 5-40μL, 10-100μL, 40-200μL, 200-1000μL y 1-5mL)

- ❖ Cámara de Neubauer (Marca: Proper Lumicyte. Modelo 090001)
- ❖ Vórtex (Marca: Genie. Modelo 29789)
- ❖ Centrifuga (Marca Solbat. Modelo J-12)
- ❖ Tubos Falcon Axygen 15mL
- ❖ Tubos Eppendorf 1.5mL

6.5 METODOLOGÍA

6.5.1 CUENTA TOTAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA

- Con la muestra sanguínea contenida en tubo con EDTA, se preparó una dilución con colorante o líquido de Turk 1:20 en un tubo Eppendorf, se mezcla en vórtex, esto es, para provocar la hemólisis de los eritrocitos a causa del ácido acético, y la tinción con azul de metileno de los glóbulos blancos.
- Posteriormente la suspensión de células se aplicó por capilaridad en la cámara de Neubauer (Figura 7), ésta se colocó en el microscopio óptico, enfocando los cuadros con el objetivo a 10x.

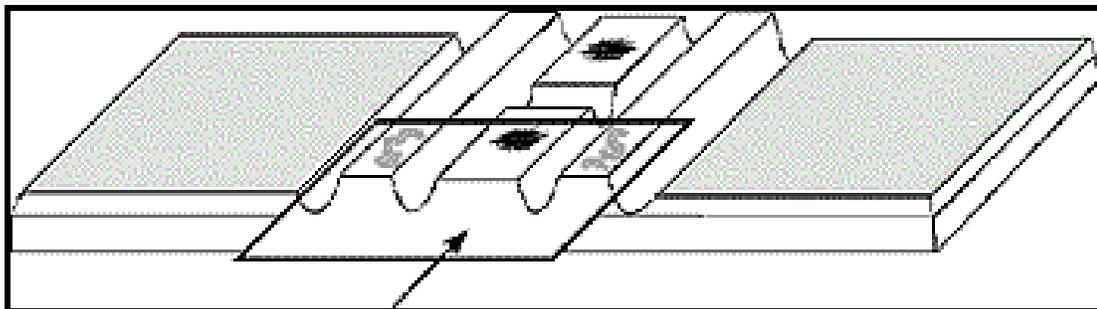


FIGURA 11. Ejemplo de una cámara de Neubauer

- La cámara de Neubauer está dividida en nueve cuadrantes de 1 milímetro por lado cada uno, los cuadrantes superiores e inferiores (L), (cuatro) están divididos a su vez en 16 cuadrantes (Figura 8).
- Se llevó a cabo el conteo de las células presentes en los cuatro cuadrantes, que están divididos en 16 cada uno (L), se tomaron en cuenta a todas las células presentes, excepto aquellas que se encontraron sobre las líneas que salían o que delimitaban a los cuadrantes.

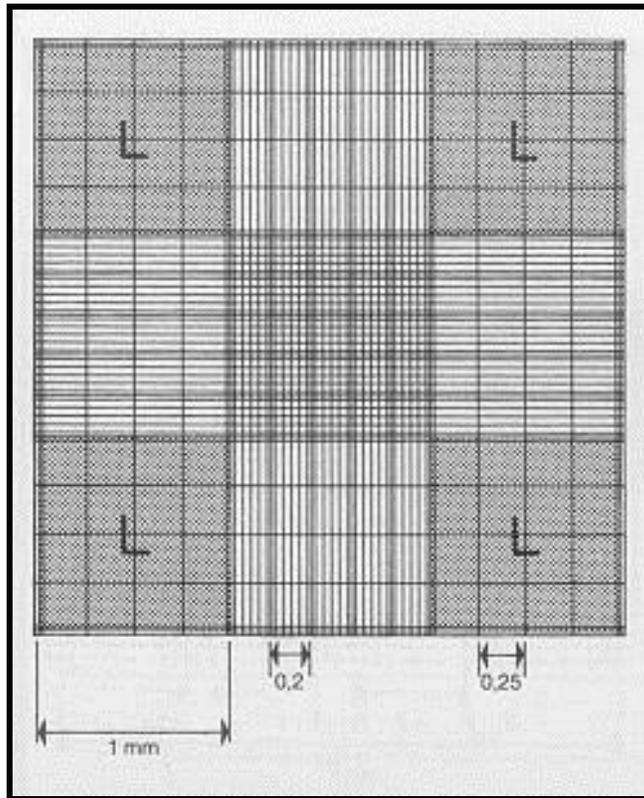


FIGURA 12. Distribución de los cuadrantes de la cámara de Neubauer

El cálculo del número de leucocitos totales por mL se obtuvo a partir la siguiente fórmula:

$$\text{Número de leucocitos totales} = \frac{N \times 20 \times 10}{4}$$

4

Donde:

N = Suma de los leucocitos encontrados en las 4 retículas

20 = Título de la dilución

10 = Corrección de la cámara para llevar a 1 mL

4 = Número de retículas.

6.5.2 CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA

- Se realizó un extendido sanguíneo en un portaobjetos con 10µL de sangre periférica contenida en tubo con EDTA, posteriormente el extendido se secó al aire y se tiñó por la técnica de Wright Giemsa, durante 5 minutos. Se adicionó solución reguladora y se oxigenó por 5 minutos hasta observar una placa metalizada sobre el colorante, y trascurrido el tiempo se enjuagó verticalmente al chorro de agua. (Figura 9)

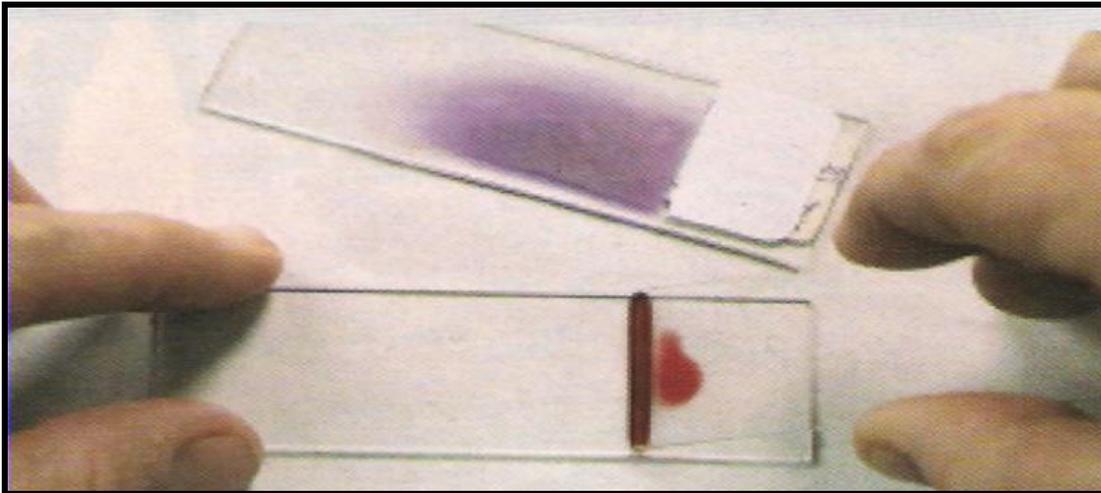


FIGURA 13. Extendido de sangre periférica en portaobjetos para realizar una tinción

- Se observa en el microscopio óptico con el objetivo 100x y aceite de inmersión.

6.5.3 DETERMINACIÓN DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS POR TINCIÓN DIRECTA.

Se llevó a cabo la evaluación de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias por medio del análisis por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales (conjugados a diferentes Fluorocromos) por medio de una tinción de superficie directa, llevando así una comparación de la intensidad de luz emitida por la detección de señales de dispersión de la luz láser y emisión de la fluorescencia del citómetro de flujo. La tinción se realizó de la siguiente manera:

- Se utilizaron 6 tubos de Falcon para citómetro de flujo y se adicionaron a cada uno, 5µL de Anticuerpos monoclonales (AcM) correspondientes, en condiciones de esterilidad y oscuridad, de acuerdo al siguiente orden:
 - TUBO 1: IgG1 FITC + IgG2PE (Control de Isotipo)
 - TUBO 2: CD45 FITC + CD14 PE (Control de población de linfocitos)
 - TUBO 3: CD19 PE (Linfocitos B) + CD56 FITC (Células NK)
 - TUBO 4: CD3 Percp (Linfocitos T) + CD4 FITC + CD25 PE (Linfocitos T Cooperadores)
 - TUBO 5: CD8 PE (Linfocitos T Citotóxicos)
- Posteriormente se adicionaron a cada tubo 30µL de sangre periférica con EDTA seguido de una agitación vigorosa con Vórtex incubando los tubos por 20 minutos en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 600µL de solución de Lisis 1x a los 6 tubos correspondientes, y se volvió a realizar una agitación vigorosa con el Vórtex, para después incubar las muestras por un tiempo de 10-12 minutos en oscuridad. Después se centrifugaron los 6 tubos a 80 gravedades durante 5min, al término, se decantaron y se lavaron con 1000µL de una solución de PBS 1x, para después homogenizar nuevamente con el Vórtex, y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos. Finalmente se decantaron y se fijaron las muestras con 400µL de una solución de paraformaldehído al 1% y se colocaron en refrigeración hasta su análisis en el citómetro de flujo

6.5.3.1 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Para llevar a cabo la cuantificación de los linfocitos totales (CD3+), linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+), citotóxicos (CD3+CD8+), reguladores (CD4+CD25+), células NK (CD56+) y linfocitos B (CD19+) se analizaron por medio de un citómetro de flujo FACS-Calibur de BD con el Software CellQuest Pro de BD.

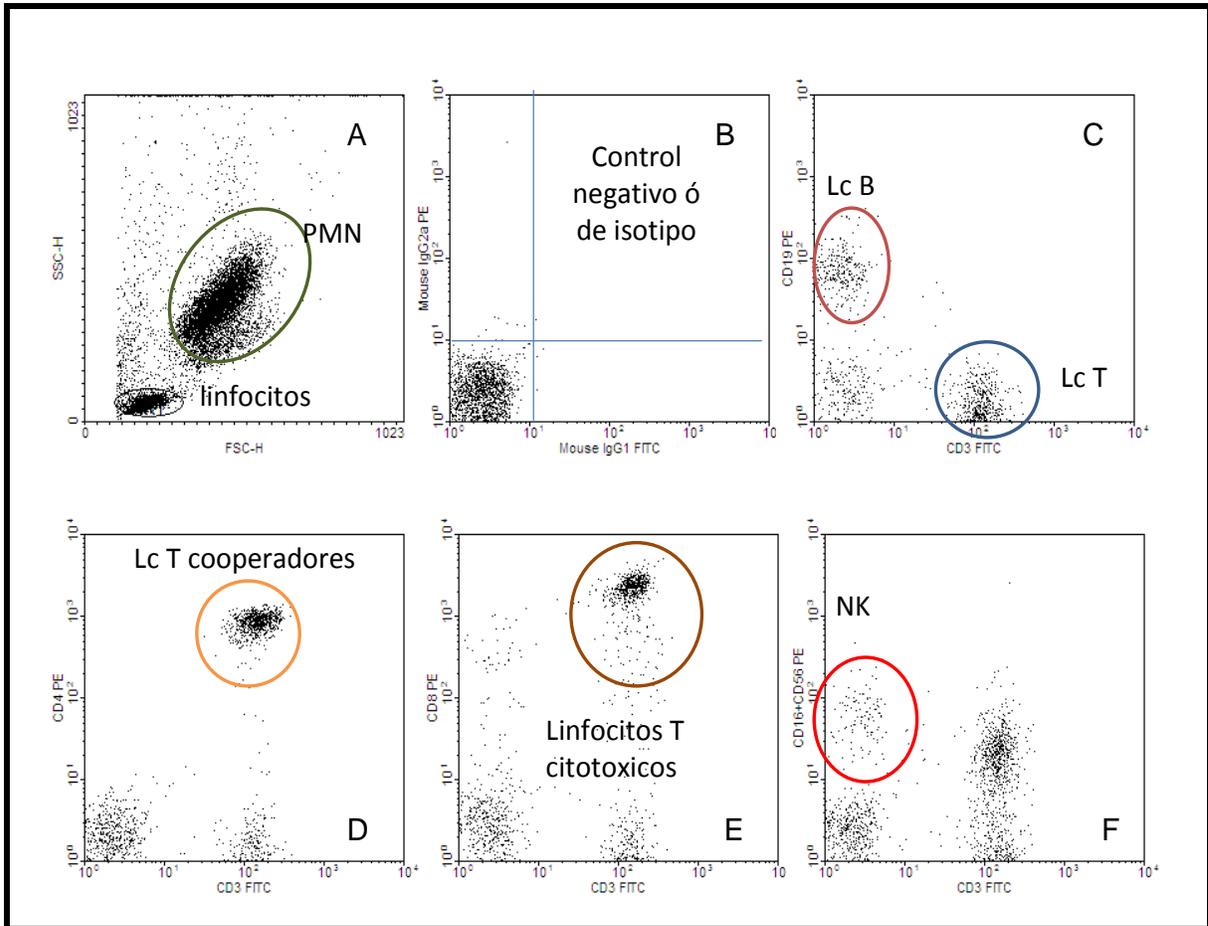


FIGURA 14. Gráfica con puntos de las poblaciones linfocitarias obtenidas por citometría de flujo, realizando tinción directa para cada uno de los marcadores diferenciales de población.

En este gráfico se seleccionó a la población de linfocitos y a partir de esta región se llevó a cabo la identificación de las subpoblaciones linfocitarias de acuerdo a los marcadores de superficie específicos y al % de fluorescencia, para lo cual se incluyó un control negativo (B) denominado como control de Isotipo, en donde se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra Inmunoglobulina de ratón conjugados a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) y a Ficoeritrina (PE) que nos permiten determinar el % de señales de fluorescencia inespecífica. Ver Figura 13.

7. RESULTADOS

TABLA 9. Características generales de los pacientes.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES	
CARACTERÍSTICAS	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR/ (PORCENTAJE)
EDAD	24.42 ± 12.29 años
ADOLESCENTES (13-16 AÑOS)	3 (16.67%)
JÓVENES ADULTOS (17-28 AÑOS)	11(61.11%)
ADULTOS (29- 65 AÑOS)	4 (22.22%)
SEXO	
MASCULINO	11 (61.11%)
FEMENINO	7 (38.89%)
LOCALIZACIÓN	
FÉMUR	7 (38.90%)
TIBIA	6 (33.33%)
HUMERO	5 (27.77%)
CLASIFICACIÓN DE ENNEKING	
METÁSTASIS	5 (26.32%)
NO METÁSTASIS	13 (72.22%)
GRADO HISTOLOGICO	
OSTEOBLÁSTICO	11 (61%)
CONDROBLÁTICO	6 (33%)
NO DETERMINADO	1 (6%)

**EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO
COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®**

TABLA 10. Aspectos clínicos de pacientes con metástasis.

Paciente	Edad/Sexo	Fecha Dx	Grado Histológico	Clasificación Enneking	Sobrevida
AGJ	28/F	ENERO 2008	CONDROBLÁSTICO	IV	18 MESES
AJMM	21/M	MARZO 2011	OSTEOBLASTICO	III	14 MESES
EBA	20/M	MAYO 2008	OSTEOBLÁSTICO	IV	24 MESES
JCNP	17/M	FEBRERO 2006	OSTEOBLASTICO	IV	12 MESES
HMS	18/M	NOVIEMBRE 2006	OSTEOBLÁSTICO	IV	14 MESES

TABLA 11. Aspectos clínicos de pacientes sin metástasis

Paciente	Edad/Sexo	Fecha Dx	Grado Histológico	Clasificación Enneking	Sobrevida
CMRA	24/F	AGOSTO 2008	CONDROBLÁSTICO	II	60 MESES
MOCH	21/F	OCTUBRE 2006	CONDROBLÁSTICO	II	60 MESES
MLCA	38/F	OCTUBRE 2008	NO DETERMINADO	II	11 MESES
ESSV	62/F	ABRIL 2010	CONDROBLÁSTICO	II	36 MESES
VFC	14/F	JUNIO 2007	OSTEOBLASTICO	II	19 MESES
MRE	36/F	AGOSTO 2008	OSTEOBLÁSTICO	II	36 MESES
RJD	25/M	NOVIEMBRE 2007	OSTEOBLÁSTICO	II	8 MESES
ERO	14/M	JULIO 2009	CONDROBLÁSTICO	II	36 MESES
URE	19/M	MAYO 2010	OSTEOBLÁSTICO	II	24 MESES
RLC	18/M	JULIO 2010	OSTEOBLÁSTICO	II	18 MESES
OLM	42/M	JULIO 2010	OSTEOBLASTICO	II	28 MESES
MSG	14/M	FEBRERO 2006	OSTEOBLASTICO	II	14 MESES
LEDM	18/M	OCTUBRE 2010	CONDROBLÁSTICO	II	24 MESES

7.1 EVALUACIÓN CLÍNICA

Se incluyeron dieciocho pacientes de edades entre 14 a 62 años, en una relación de 11 hombres y 7 mujeres con diagnóstico de Osteosarcoma como tumor primario en fase II y IV (de acuerdo a la clasificación de Enneking) de los cuales cinco presentaban metástasis al inicio del protocolo y trece sin evidencia de lesión metastásica. En la tabla 9 se muestran las características generales de los pacientes donde se observa que existe una alta frecuencia en fémur (38.90%) seguido de la tibia (33.33%) y el húmero (27.77%). De acuerdo al reporte histológico realizado por el laboratorio de patología del INR el 61% (once pacientes) presentaron tumor óseo de origen osteoblástico, 33% (seis pacientes) de origen condroblástico y 6% (un paciente) de origen no determinado.

A los pacientes se les tomaron muestras de sangre periférica al inicio, durante y al finalizar su tratamiento durante un periodo de dos años para evaluar su respuesta inmune al tratamiento multidisciplinario sin y con coadyuvante de Transferón® así como su evolución clínica de acuerdo al tiempo de sobrevida.

7.2 DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS AL INICIO DEL TRATAMIENTO.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las Evaluaciones Inmunológicas, realizadas al inicio del estudio en donde se comparan los parámetros con respecto a la condición inicial de los grupos de pacientes (presencia o ausencia de metástasis en el diagnóstico inicial). Los datos obtenidos se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis considerando un nivel de significancia de 0.05 con un intervalo de confianza del 95%.

Al inicio del estudio observamos que 6 de 13 pacientes (46.2%) sin lesiones metastásicas presentaron valores inferiores a 5000 leucocitos/mL de sangre. Mientras que 2 de 5 pacientes (40%) con presencia de lesiones metastásicas presentaron valores inferiores como se muestra en la figura 15.

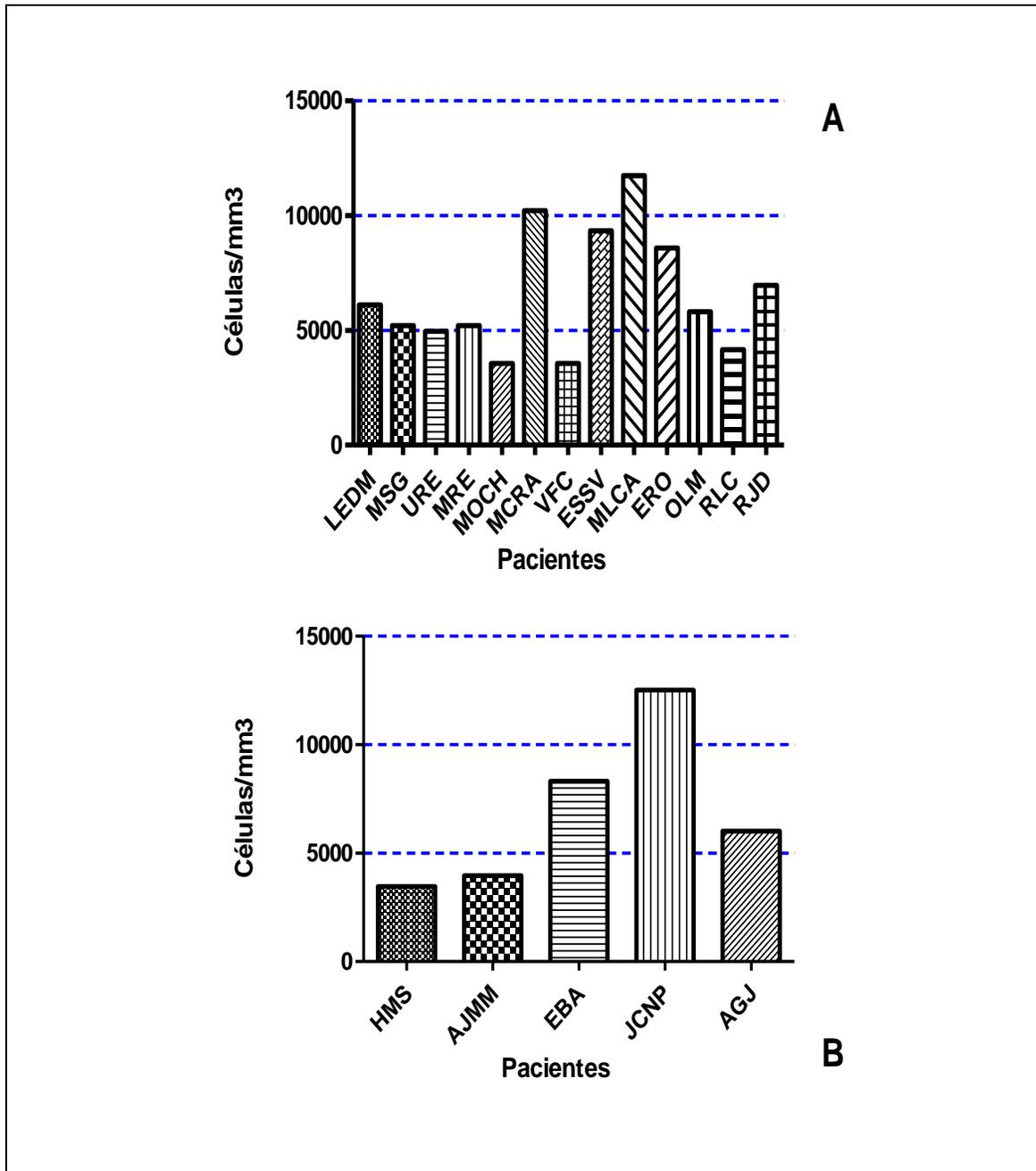


FIGURA 15. Evaluación de Leucocitos de pacientes con Osteosarcoma al inicio del Estudio. **A.** Representa a pacientes sin metástasis. **B.** Pacientes con metástasis.

En cuanto a la cuantificación del número de linfocitos T (CD3⁺) 9 de los 13 incluidos (69.2%), presentaron valores por debajo de 2000 linfocitos T/mL de sangre periférica, de los cuales 4 pacientes (30.76%) tienen valores por debajo de 1000 células/mL considerado como el valor mínimo obtenido del grupo de referencia. Para el caso de los pacientes con metástasis cuatro de los cinco incluidos presentaron valores por debajo del valor promedio normal, ver Figura 16.

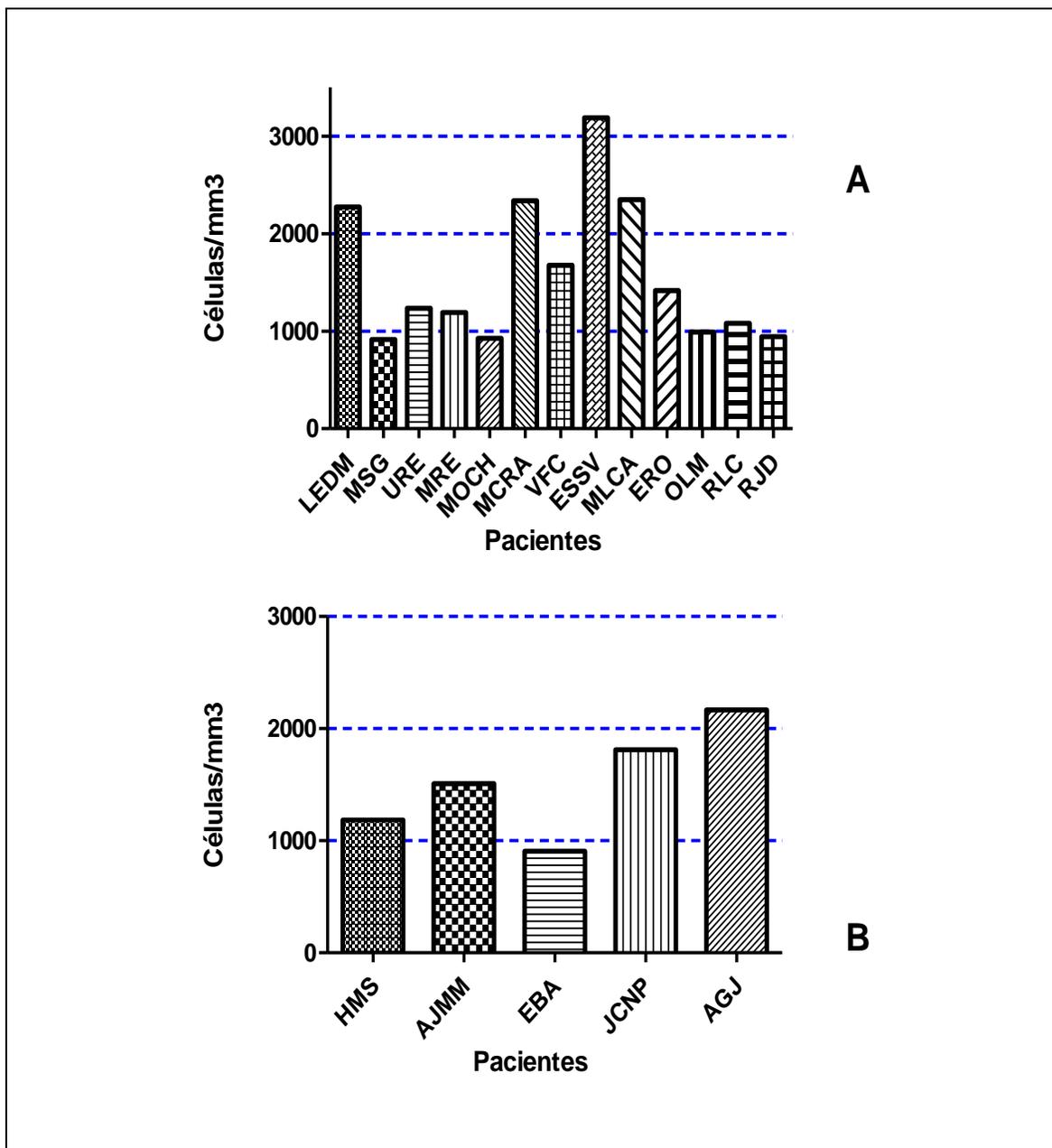


FIGURA 16. Evaluación de Linfocitos T totales (CD3⁺) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del Estudio. **A.** Representa a pacientes sin metástasis. **B.** Pacientes con metástasis.

En cuanto a la cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores ($CD3^+ CD4^+$) y citotóxicos ($CD3^+ CD8^+$), observamos que tanto el grupo de pacientes con OS grado III (92%, 12 de los 13 pacientes incluidos) y grado IV (100%, 5 de los 5 pacientes), presentan valores por debajo del valor promedio normal para linfocitos T cooperadores, ver Figura 17

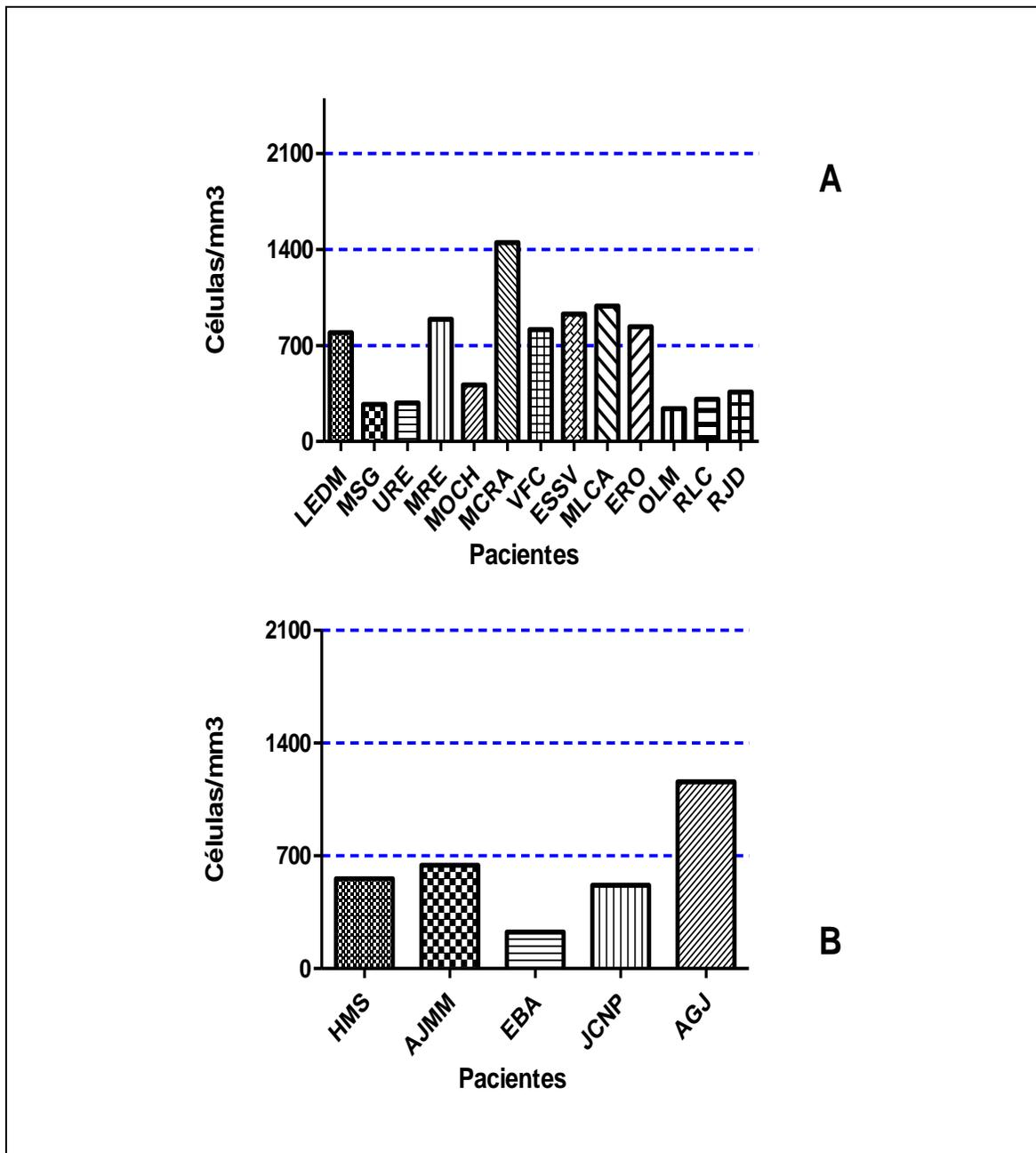


FIGURA 17. Evaluación de Linfocitos T Cooperadores ($CD3^+ CD4^+$) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del Estudio. **A.** Representa a pacientes sin metástasis. **B.** Pacientes con metástasis.

De la evaluación de células CD4⁺ CD25⁺, observamos que en el grupo de pacientes sin metástasis 76.9% (10 de los 13 pacientes incluidos en este grupo) y en el grupo con metástasis 60% (3 de los 5 pacientes incluidos), se encuentran por debajo de 60 células/mL valor mínimo obtenido del grupo de referencia (individuos sanos de la misma edad y sexo), ver Figura 18.

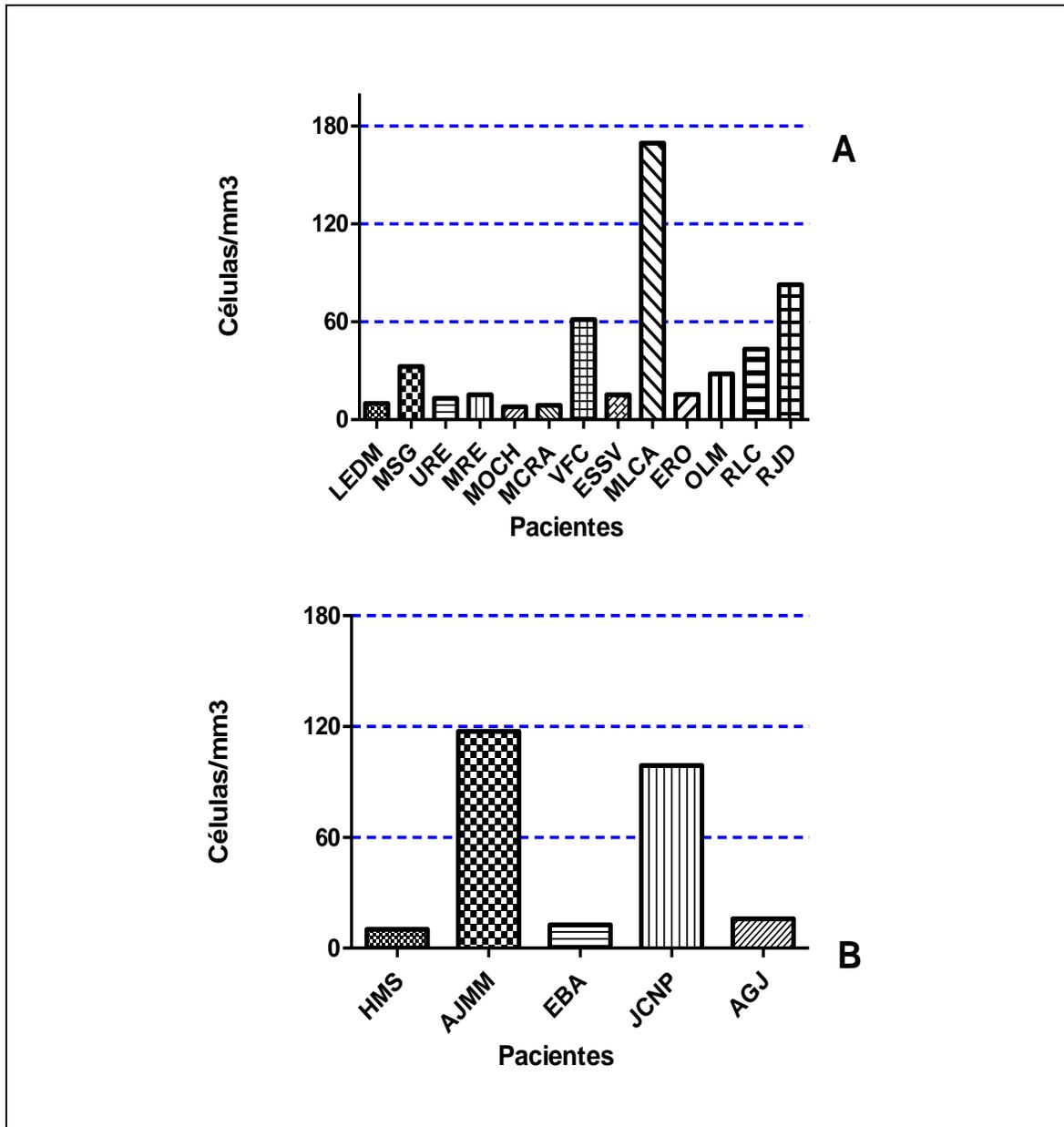


FIGURA 18. Evaluación de Linfocitos T Reguladores (CD4+CD25+) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del Estudio. **A.** Representa a pacientes sin metástasis. **B.** Pacientes con metástasis.

Para los linfocitos T citotóxicos observamos que 84.6% (once de trece pacientes) y 80% (4 de cinco pacientes), presentan valores por debajo de lo normal, ver Figura 19.

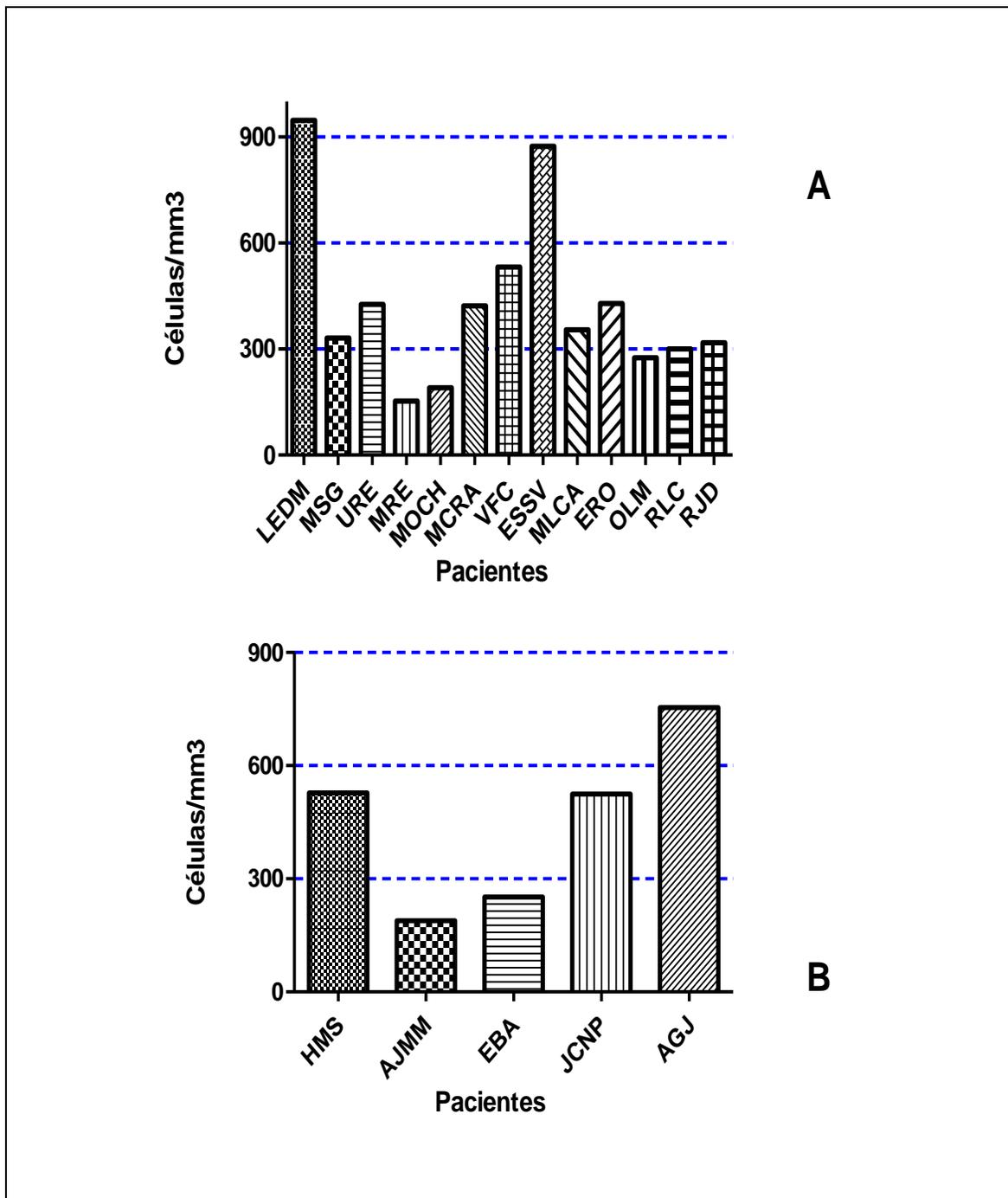


FIGURA 19. Evaluación de Linfocitos T Citotóxicos (CD3+CD8+) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del Estudio. **A.** Representa a pacientes sin metástasis. **B.** Pacientes con metástasis.

En cuanto a la cuantificación de las células Natural Killer (NK, CD56⁺). 61.5% de los pacientes del grupo libre de metástasis, OS grado III (ocho de trece pacientes) y 2 de los cinco incluidos en el grupo con metástasis (OS grado IV), presentan valores por debajo del valor mínimo normal (300 células/mL), ver Figura 20.

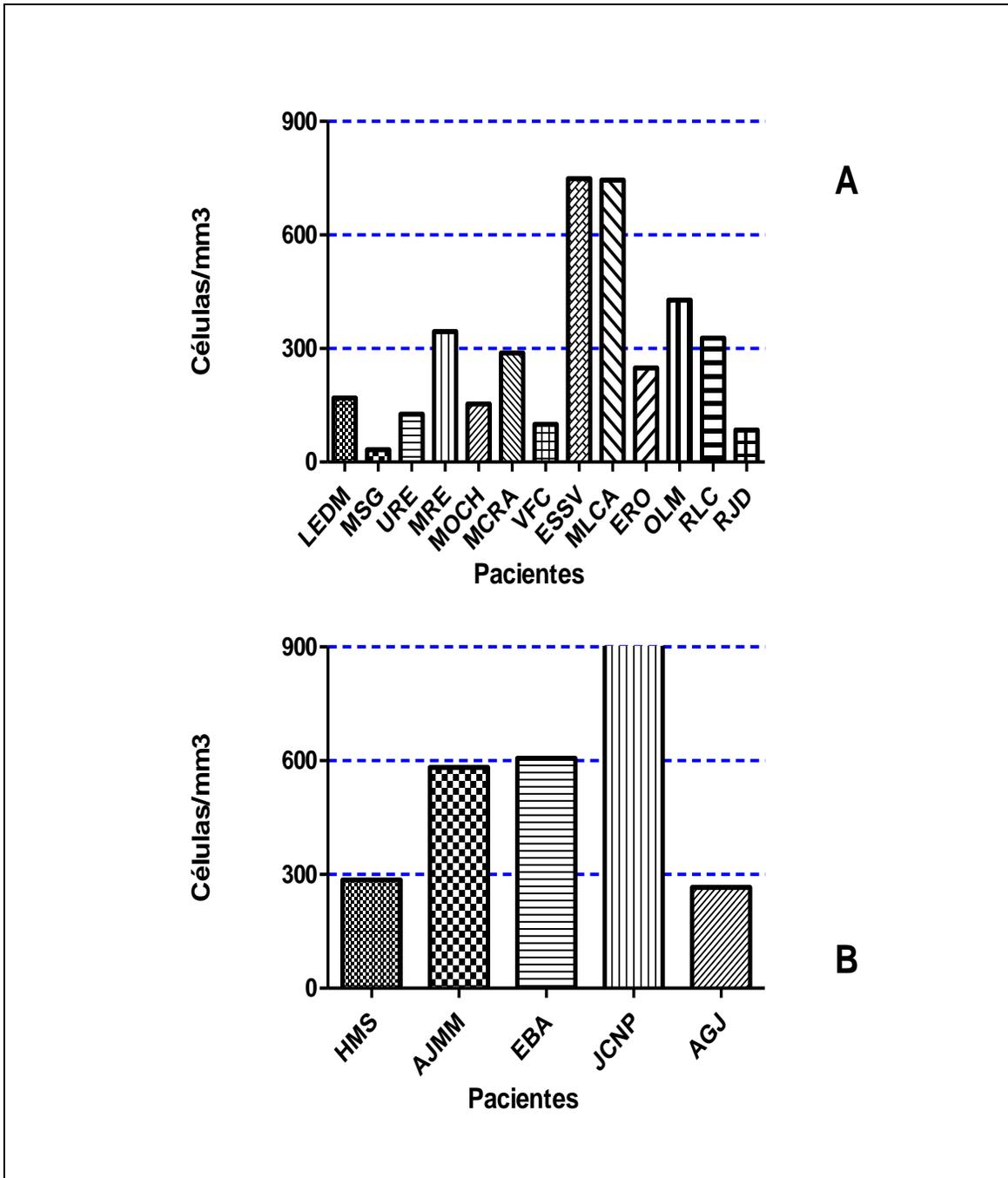


FIGURA 20. Evaluación de Células NK (CD3-CD56+) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del Estudio. **A.** Representa a pacientes sin metástasis. **B.** Pacientes con metástasis.

En cuanto a la cuantificación de las poblaciones de linfocitos B (CD19⁺), se observa que 10 de los 13 pacientes del grupo sin metástasis (OS grado III), presentan valores por debajo de 500 células/mL y cinco de los cinco pacientes incluidos en el grupo con metástasis (OS grado IV) tuvieron valores por debajo de 250 células/mL comparando con los valores promedio y mínimo obtenidos del grupo de individuos sanos, ver Figura 21.

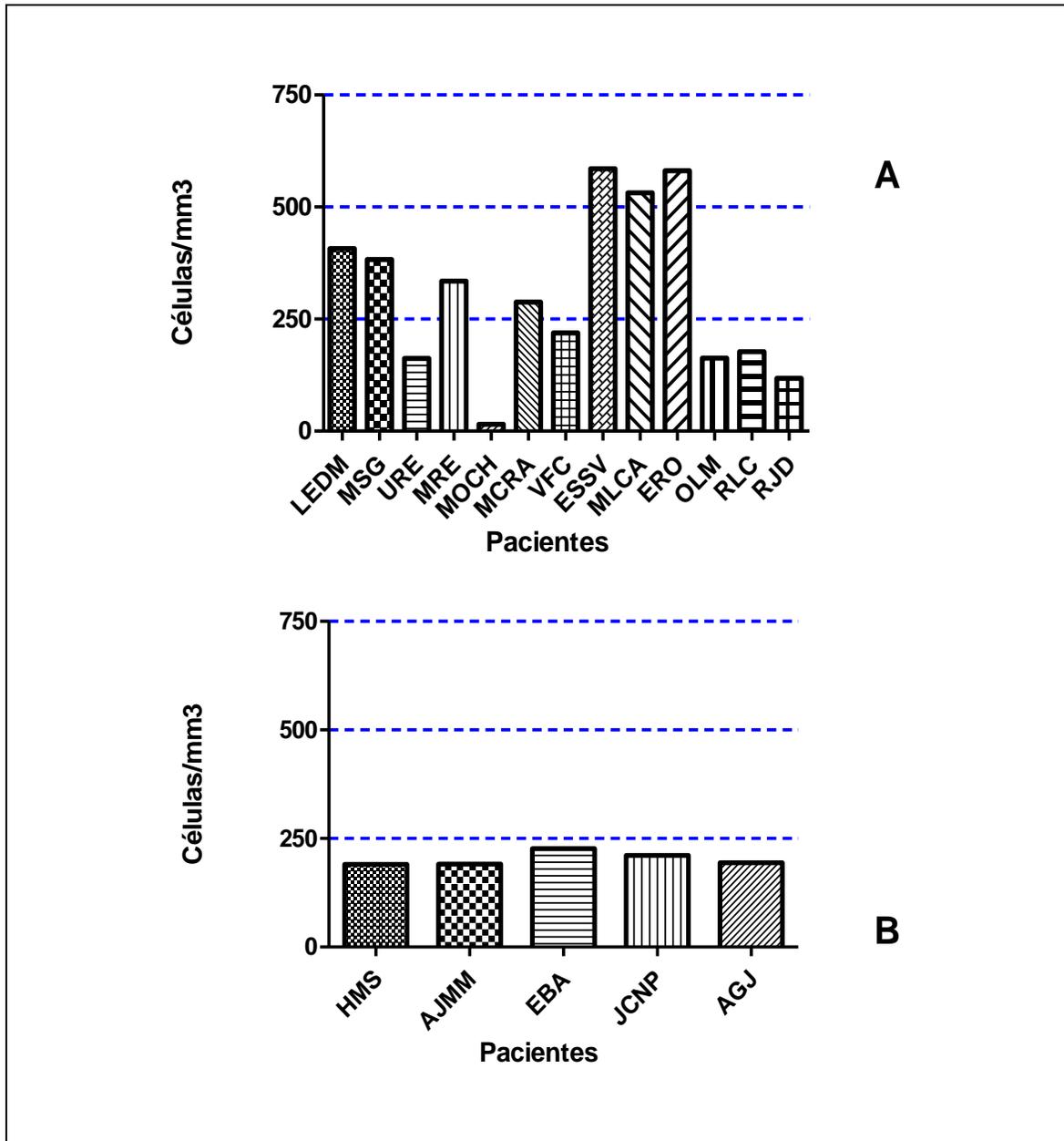


FIGURA 21. Evaluación de Linfocitos B (CD19⁺) de pacientes con Osteosarcoma al inicio del Estudio. **A.** Representa a pacientes sin metástasis. **B.** Pacientes con metástasis

7.3 DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS POST TRATAMIENTO.

En cuanto a las evaluaciones inmunológicas realizada, se observó que los cinco pacientes con presencia de metástasis que recibieron tratamiento coadyuvante con Transferón® (22B) mantuvieron sus valores promedio de leucocitos dentro del intervalo de referencia (obtenido del grupo testigo sano) en comparación con el paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional a base de quimioterapia (22A), el cual presentó valores por debajo de 4000 leucocitos/mL, lo que indica una supresión del número de estas células con respecto al grupo que recibió Transferón® en donde 4 de los cinco pacientes presentaron valores por arriba de 4000 leucocitos/mL.

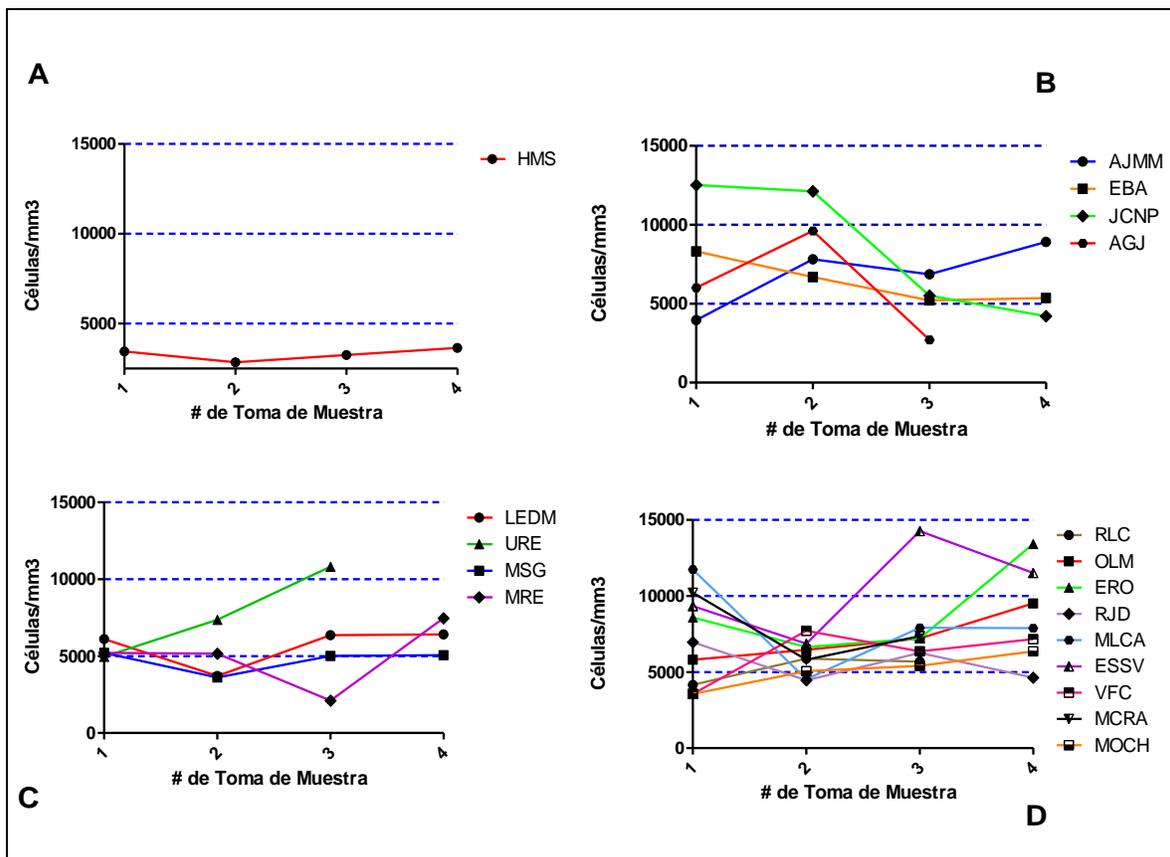


FIGURA 22. Evaluación de Leucocitos de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. **A.** Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. **B.** Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. **C.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. **D.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante.

EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®

En el grupo de pacientes libres de metástasis se observa un comportamiento similar a los de metástasis cuyos valores de leucocitos con el tratamiento de quimioterapia (22C), disminuye a lo largo de dos años de seguimiento y en el caso del grupo que recibe quimioterapia más Transferón® (22D), sus valores se mantienen en los rangos de referencia (obtenidos del grupo de individuos sanos de la misma edad y sexo que los pacientes incluidos en este grupo), ver Figura 22.

En la determinación del número de linfocitos T cooperadores ($CD3^+ CD4^+$), observamos de manera general que en el paciente con presencia de metástasis (23A) y los pacientes sin metástasis (23C) que reciben tratamiento multimodal convencional disminuyen significativamente con respecto a su toma inicial. Asimismo en las secciones 23B y 23D se aprecia que los pacientes con y sin metástasis que recibieron Transferón® como coadyuvante se aprecia una disminución del número de células durante el periodo de tratamiento, ver Figura 23.

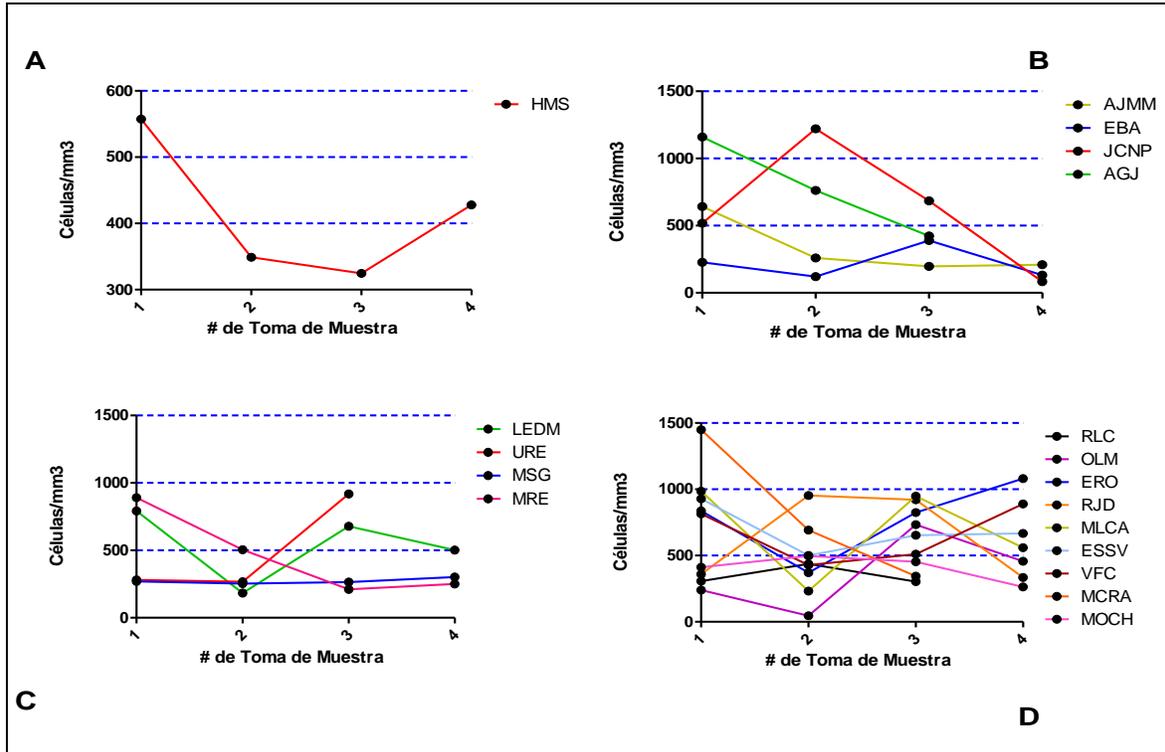


FIGURA 23. Evaluación de Linfocitos T Cooperadores ($CD3^+ CD4^+$) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. **A.** Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. **B.** Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. **C.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. **D.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante.

EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®

En el caso de los linfocitos T reguladores ($CD4^+ CD25^+$), observamos que en el paciente con presencia de metástasis que recibe tratamiento multimodal convencional (24A) y pacientes con metástasis que reciben tratamiento multimodal convencional más coadyuvante de Transferón® (24B) 50% de cada grupo presentaron una tendencia a la disminución de los valores iniciales, ver Figura 24.

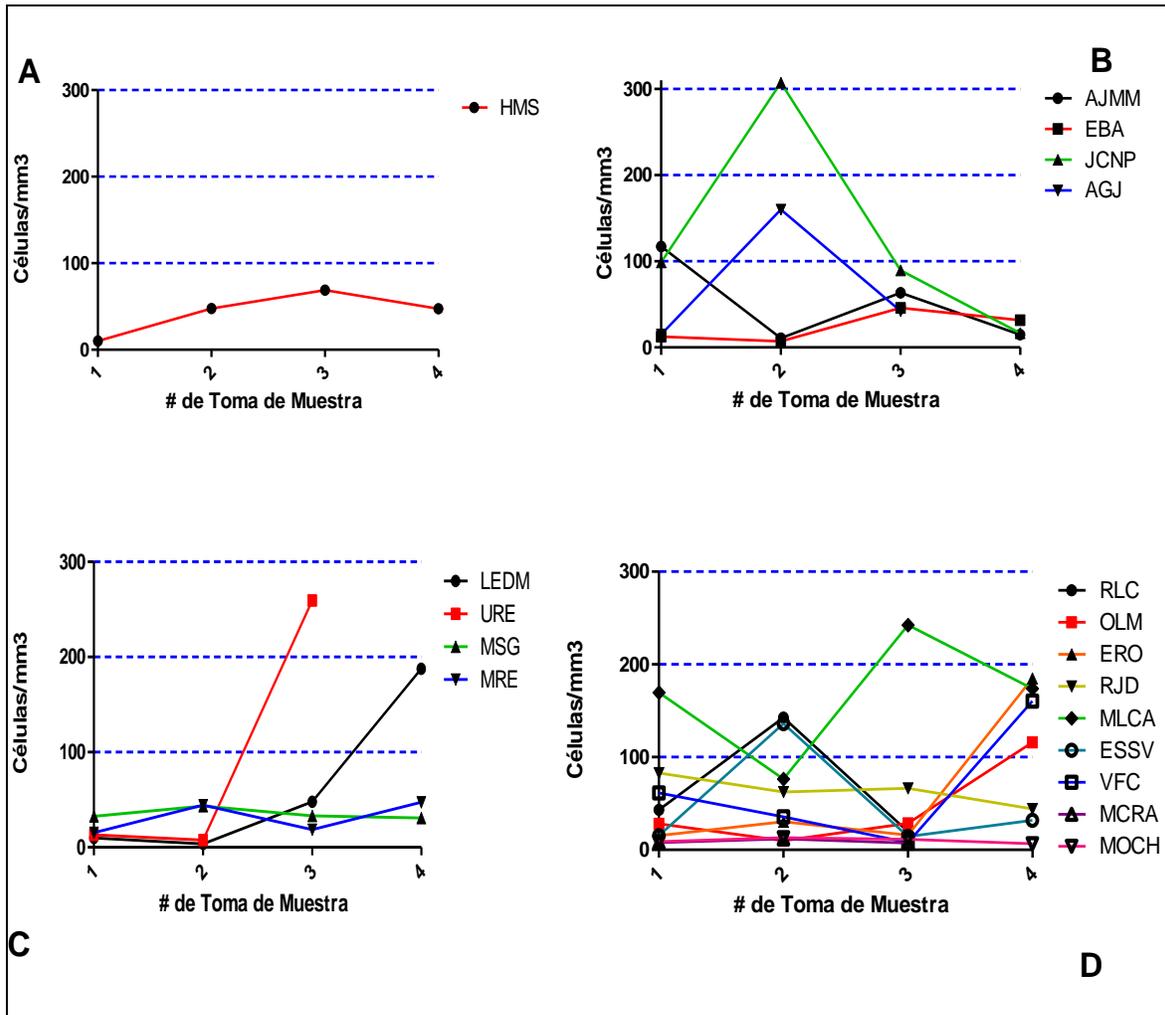


FIGURA 24. Evaluación de Linfocitos T Reguladores ($CD3^+ CD4^+ CD25^+$) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. **A.** Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. **B.** Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. **C.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. **D.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante.

EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®

Con respecto a la cuantificación del número de linfocitos T citotóxicos ($CD3^+ CD8^+$) observamos que en el paciente con lesiones metastásicas (25A), que recibe tratamiento multimodal convencional presenta una disminución significativa del número de estas células de 527 células/mL a 303 células/mL. En el caso del grupo de pacientes con metástasis que recibe tratamiento coadyuvante con Transferón® (25B), observamos que a diferencia de lo que ocurrió en el paciente que solo recibe tratamiento de quimioterapia el número de estas células se mantuvo dentro de los límites medio y promedio de los valores de referencia.

La cuantificación del número de linfocitos T citotóxicos ($CD3^+ CD8^+$) de los pacientes sin evidencia de lesión metastásica que reciben tratamiento convencional y/o Transferón® (25D), donde 5 de los 9 pacientes incluidos en este grupo que recibieron Transferón® presentaron un aumento en el número de sus células ex vivo, dos de ellos disminuyeron y uno se mantuvo en los rangos de referencia, mientras que en el grupo de pacientes que sólo recibieron tratamiento multimodal convencional (25C), el 50% de los pacientes mostró aumento en sus números de células, ver Figura 25.

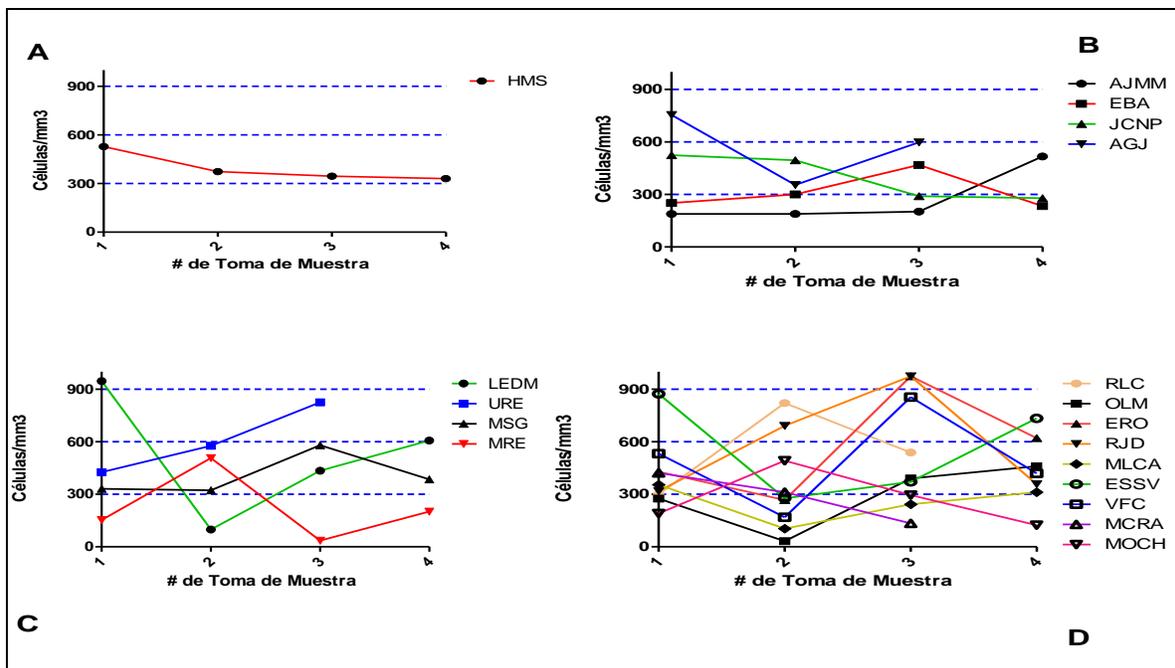


FIGURA 25. Evaluación de Linfocitos T Citotóxicos ($CD3^+ CD8^+$) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. **A.** Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. **B.** Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. **C.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. **D.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante.

EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®

Con respecto a las células NK (CD3⁺CD56⁺), se puede apreciar que en el caso del grupo de pacientes sin evidencia de lesión metastásica que recibieron Transferón® (26D) aumentaron el número de estas células en el 66.66% de los pacientes incluidos (6 de 9 pacientes) con respecto a inicio del tratamiento con Transferón y comparando con el grupo que solo recibe tratamiento multimodal con quimioterapia (26C). Para el caso de pacientes con metástasis que recibieron Transferón® como coadyuvante (26B) dos de cuatro pacientes evaluados mostraron un aumento de su número de células al final del tratamiento, mientras que el paciente que recibió solo tratamiento multimodal convencional sus valores fueron disminuyendo hasta su último seguimiento, ver Figura 26.

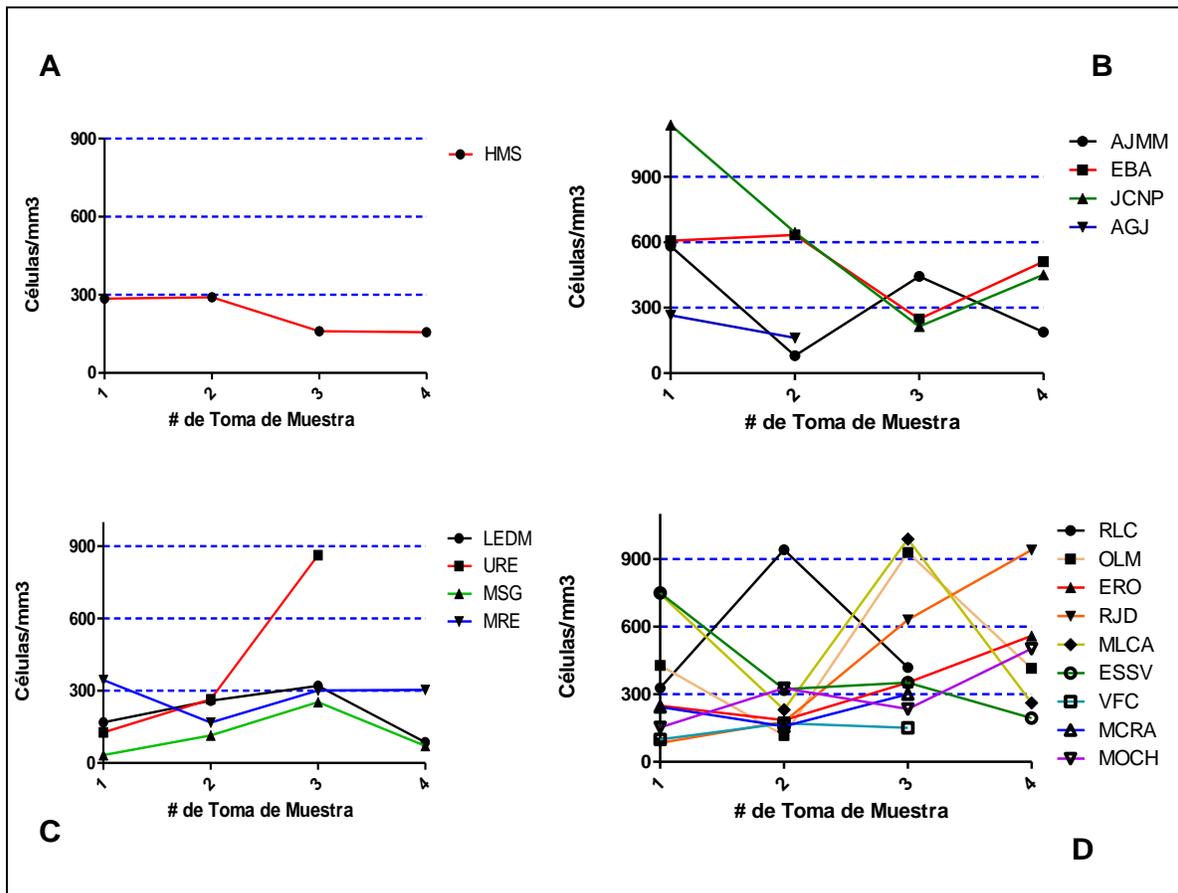


FIGURA 26. Evaluación de Células NK (CD56+) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. **A.** Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. **B.** Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. **C.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. **D.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante.

EVALUACIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE PACIENTES CON OSTEOSARCOMA QUE RECIBEN TRATAMIENTO COADYUVANTE CON TRANSFERÓN®

En cuanto a la cuantificación de linfocitos B (CD19+) observamos que se aprecia un aumento en el número de células de 5 de los 9 pacientes incluidos en el grupo de pacientes que recibieron Transferón® (27D) con respecto al inicio de su tratamiento y comparando los resultados con el grupo que solo recibió tratamiento multimodal con quimioterapia (27C). Por otro lado, los resultados obtenidos en pacientes diagnosticados con metástasis con tratamiento multimodal convencional más Transferón® (27B) y sin coadyuvante (27A) se observó una disminución en los valores al final del tratamiento, ver Figura 27.

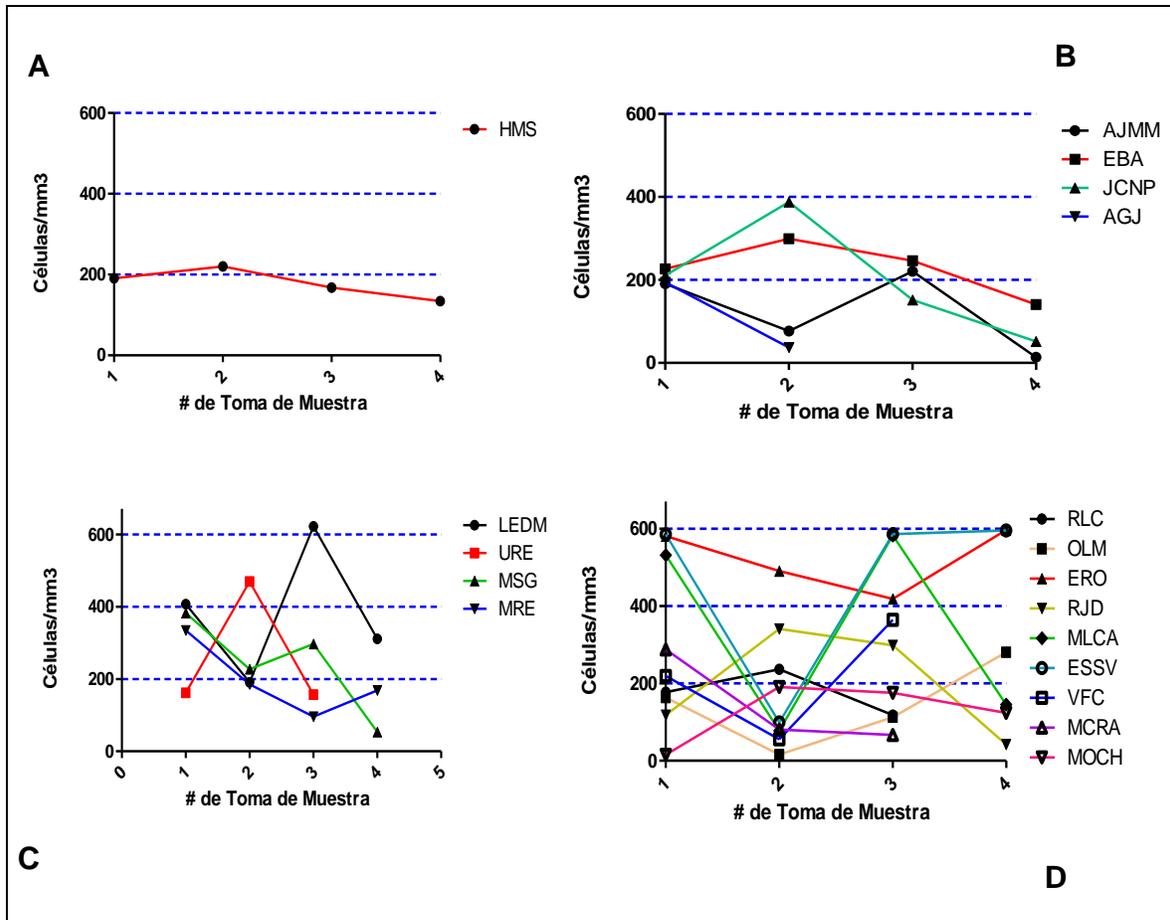


FIGURA 27. Evaluación de Linfocitos B (CD19+) de pacientes con Osteosarcoma post tratamiento. **A.** Representa al paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional. **B.** Pacientes con metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante. **C.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional. **D.** Pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento multimodal convencional más Transferón® como coadyuvante.

7.4 TIEMPO DE SOBREVIDA

Se determinó el tiempo de supervivencia de los pacientes en meses, considerando desde la fecha del diagnóstico clínico e histopatológico inicial y la fecha de defunción. Se muestra en las ordenadas el tiempo en meses de supervivencia y en las abscisas el porcentaje de pacientes. En donde de acuerdo a la prueba estadística de Mantel-Cox, se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.01$) al comparar los grupos de pacientes sin metástasis que recibieron el tratamiento convencional más coadyuvante de Transferón® (grupo 3) y el que recibió solo tratamiento convencional (grupo 4). De acuerdo a esto se observa mayor supervivencia en el grupo 3 que recibió Transferón® con respecto al grupo 4, ver Figura 28.

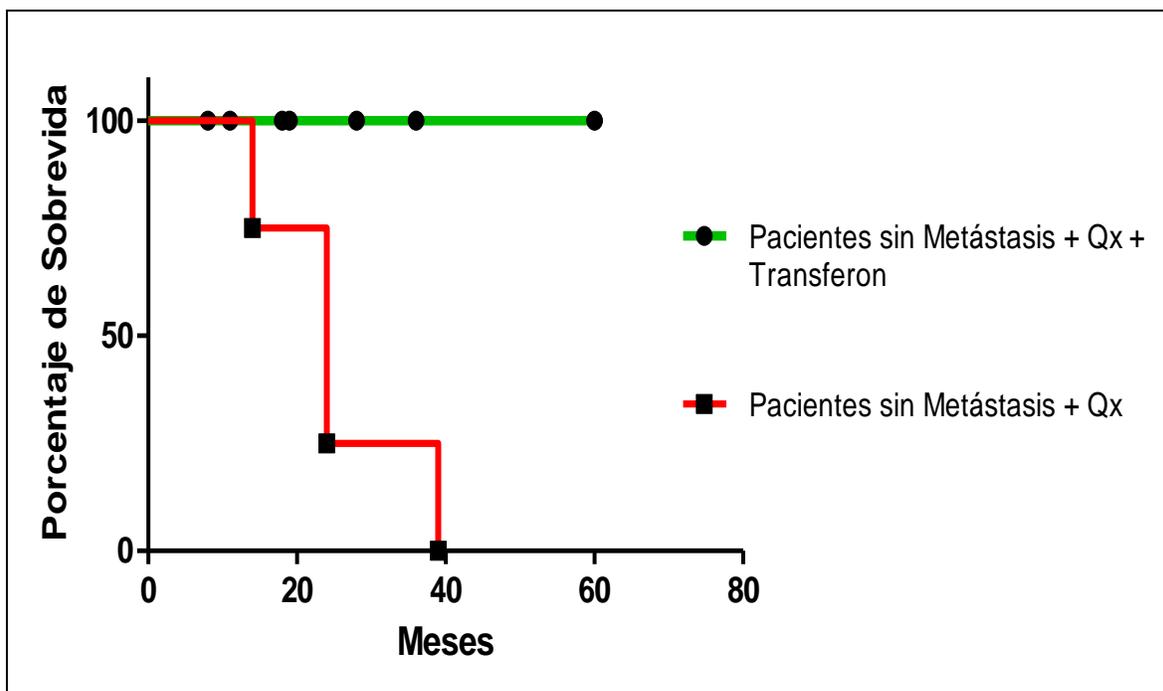


FIGURA 28. Escala de supervivencia de pacientes de Osteosarcoma después de 2 años de seguimiento.

8. DISCUSIÓN

EVALUACIÓN CLÍNICA.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos observar que las características generales de los pacientes corresponden a lo reportado en otros estudios. En este trabajo incluimos 18 pacientes con diagnóstico de tumor óseo primario, de los cuales el 61.11% de los pacientes fueron del sexo masculino y el 38.89% femenino, en estudios oncológicos se indican que la incidencia de Osteosarcoma de acuerdo al sexo es de 2:1 (Hombres: Mujeres), dicha neoplasia tiene mayor incidencia en las edades de 10 a 25 años¹¹ y en nuestro grupo de pacientes el rango de edades fue de 14 a 62 años con una edad promedio de 24 años, y con un 61.11% de los casos en el intervalo de edad de 17 a 28 años, considerados como jóvenes adultos, en los cuales se presenta la mayor incidencia de los casos reportados. En el 38.90% de los casos la localización afectada fue el fémur, seguido de la tibia y el humero, lo cual corresponde con la presencia de este tipo de neoplasias en huesos largos como lo reporta Cortés R et al, 2010.¹⁰

Con respecto a la clasificación histológica el tipo de tumor que se presentó con mayor incidencia fue el osteoblástico con un 61% y el condroblástico con un 33% lo cual corresponde a lo reportado por Gómez, et al, 2012. Donde el 50% de las muestras de pacientes analizados fueron de origen osteoblástico.^{19, 35}

Se observó que 26.32% (5 pacientes de los 18 incluidos), presentaron metástasis de inicio de acuerdo a la clasificación de Enneking son de grado IV y 72.22% (13 de los 18 pacientes incluidos), se encontraron sin evidencia de lesión metastásica al inicio del estudio. Sin embargo, dada la clasificación y el tipo de extensión fueron catalogados de grado III. De acuerdo a estudios de sobrevida en estos pacientes se pronostica que en el caso de los pacientes con diagnóstico de OS grado IV el tiempo estimado es de 3 a 5 meses y para los de grado III, de 17 meses de sobrevida aún con el tratamiento multimodal convencional^{6, 38}

Actualmente el tratamiento multimodal convencional está basado en quimioterapia y la resección quirúrgica ofrece un porcentaje de vida menor al 15% en estadios avanzados de la enfermedad⁹, en la actualidad se desarrollan nuevas estrategias basadas en el uso de la inmunoterapia debido al papel importante que juega la inmunorregulación en el control del proceso tumoral y así también sobre la regulación en la remodelación ósea en tumores óseos³⁸. Por lo que en este trabajo nos interesó evaluar el efecto coadyuvante de un inmunorregulador como el Transferón® al tratamiento multimodal convencional (quimioterapia neoadyuvante, tratamiento quirúrgico y quimioterapia adyuvante), evaluando la respuesta clínica (sobrevida) e inmunológica (poblaciones y subpoblaciones linfocitarias).

Existen muy pocos trabajos que indiquen el papel de las células linfoides y sus subpoblaciones en Osteosarcoma por lo que en este trabajo nos enfocamos en evaluar algunos componentes celulares tales como: Linfocitos T cooperadores (CD3⁺ CD4⁺), Linfocitos T reguladores (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺), Linfocitos T citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺) y Células Natural Killer (CD3⁻ CD56⁺) como responsables en la mediación de la respuesta inmune en este tipo de neoplasia.

EVALUACION DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

En cuanto a las evaluaciones inmunológicas *ex vivo* en muestras de sangre periférica de los pacientes sin y con presencia de metástasis, al inicio del estudio se observó que estadísticamente sus valores son similares a los valores cuantificados del grupo de individuos sanos (libres de OS y otras patologías). Sin embargo, podemos comentar que la determinación del número de leucocitos en sangre periférica representa un parámetro clave en el inicio del tratamiento con quimioterapia y del pronóstico de respuesta al mismo, debido al grado de agresividad de los fármacos citotóxicos y citostáticos, ya que uno de los efectos adversos es la supresión del número de estas células¹⁷. Por lo que si en un inicio presentaron valores inferiores a los de referencia, es un indicativo de que posiblemente no se podrá dar la continuidad programada en el protocolo de quimioterapia, lo cual podría implicar una pobre respuesta al tratamiento.

En el caso de la cuantificación del número del número de linfocitos T (CD3⁺), observamos que de acuerdo a los resultados obtenidos, éstos nos indican que los pacientes con OS presenten cierta supresión del número de linfocitos T y sus subpoblaciones cooperadoras y citotóxicas, lo cual implica una pobre respuesta de tipo celular, correspondiendo a lo reportado por Markiewicz et al, 2012³⁰.

Con la evaluación de células CD4⁺ CD25⁺ se observó que las células se encontraron por debajo de los valores normales indicando que posiblemente no esté ocurriendo una activación de la respuesta celular efectora mediada por la IL-2 sobre las células T cooperadoras ya que recordemos que la molécula CD25 es el receptor para la IL-2, citocina importante durante la activación celular temprana, esto quizá debido a que uno de los posibles mecanismos de evasión de tumores óseos es la falta de una ineficaz presentación antigénica, y debido a que hasta ahora no existen reportes sobre un antígeno tumoral específico para OS hace pensar que no ocurre una presentación antigénica eficiente y específica, que induzca la síntesis de IL-2 y por ende la expresión del receptor, lo cual puede ser un factor determinante en la ausencia de una inmunidad antitumoral, como lo reportado por Ostrand-Rosenberg 2008, donde indica que los tumores malignos bloquean la respuesta inmunitaria antitumoral, favoreciendo un ambiente supresor que permite la progresión del tumor.³⁹

Existen algunos reportes que indican la presencia de antígenos tumorales en Osteosarcoma asociados con otros tumores, que pueden funcionar como posibles blancos terapéuticos tales como: HER-2, MAGE, los miembros de la familia GAGE, NY-ESO-1 y el PBF-, por lo que en trabajos posteriores sería interesante evaluar su expresión en biopsias de pacientes con diagnóstico de OS en los diferentes grados de acuerdo a la clasificación de Enneking y su posible eficacia en la activación de una respuesta celular antitumoral.^{2, 30}

En cuanto a la cuantificación de las poblaciones de linfocitos B (CD19⁺), ya que son células importantes en la respuesta citotóxica mediada por anticuerpos en contra de las células tumorales, el hecho de que los pacientes con OS grado III y IV presenten valores disminuidos, indica que es probable que en los casos avanzados de este tipo de tumores, ocurra una supresión de este tipo de respuesta debido quizá a los mecanismos de escape de los tumores, uno de ellos la baja expresión de moléculas HER-2 evitando la activación de los Linfocitos T, como lo reporta Ahmed, et al, 2009 y por ende la falta de cooperación entre linfocitos T cooperador y el Linfocito B, lo cual implica una ineficaz producción de anticuerpos específicos contra la célula tumoral (Osteosarcoma).⁴⁵

Para el caso de las células Natural Killer (CD3⁻CD56⁺) debido al papel que desempeñan son fundamentales en la respuesta de inmunidad antitumoral, el hecho que en nuestros pacientes los valores se encuentren disminuidos es un indicativo de la razón por la que se hayan identificado en estadios avanzados de la enfermedad (grado III y IV, según la clasificación de Enneking). Debido a esto es necesario buscar opciones de tratamiento que nos permitan inducir su proliferación y potenciar su respuesta efectora en la inmunidad antitumoral, como lo propuesto en este trabajo con el uso de Transferón®, como un inmunomodulador de la respuesta inmunitaria de tipo celular, que aunque está demostrada su función sobre la transferencia de la inmunidad celular al modificar esta, es posible que coopere con la modificación de la inmunidad dependiente de anticuerpos.²⁹

De manera general podemos comentar que en la cuantificación de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias (CD3⁺, CD19⁺, CD56⁺, CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ y CD3⁺ CD8⁺) en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de tumor primario de OS grado III y grado IV, existen valores disminuidos en el número de células de sangre periférica, lo cual implica posiblemente una supresión de la respuesta de tipo celular mediada por éstas. Sin embargo, es conveniente considerar que el hecho que estas células se encuentren por debajo de los valores normales no implica que no sean funcionales o efectivas para la vigilancia inmunológica, por lo que sería conveniente evaluar su función efectora y otros mediadores en estudios posteriores. No obstante, dado el grado avanzado del tumor en nuestros pacientes, podemos inferir que el tumor óseo está desarrollando mecanismos de escape que evitan ser reconocidos y en consecuencia eliminados por las células que participan en la respuesta inmunitaria antitumoral de tipo citotóxica

(células NK y linfocitos T CD8+), lo cual correspondería con lo reportado Whiteside 2010, que plantea dos hipótesis que podrían explicar el escape tumoral a la respuesta inmunológica y su progresión. Una de las propuestas aceptadas es la inestabilidad genética en los tumores (mutaciones constantes) y otra el desarrollo de una tolerancia inmunológica al tumor, por el desarrollo de un micro-ambiente inmunológico que evita la reactividad de las células que participan en la respuesta antitumoral.³³

EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA POST TRATAMIENTO.

En cuanto a las evaluaciones inmunológicas realizadas se observó que los pacientes con presencia de metástasis que recibieron tratamiento coadyuvante con Transferón® mantuvieron sus valores promedio de leucocitos dentro del rango de referencia (obtenido del grupo control sano) en comparación con el paciente con metástasis que recibió tratamiento multimodal convencional a base de quimioterapia, el cual presentó valores por debajo de los normales, lo que indica una supresión del número de estas células con respecto al grupo que recibió Transferón®, es importante mencionar que en este grupo se respetó el protocolo de ciclos de quimioterapia programadas, lo que representa una ventaja debido que favorece el manejo de los pacientes y de alguna manera evita la progresión tumoral.

En el caso de los grupos de pacientes libres de metástasis se observa un comportamiento similar a los de metástasis cuyos valores de leucocitos con el tratamiento de quimioterapia, se disminuye a lo largo de dos años de seguimiento y en el caso del grupo que recibe quimioterapia más Transferón®, sus valores se mantienen en los rangos de referencia (obtenidos del grupo de individuos sanos de la misma edad y sexo que los pacientes incluidos en este grupo). Por lo que podemos comentar que aparentemente el Transferón® está ayudando a contrarrestar los efectos citotóxicos relacionados con la disminución del número de leucocitos, ya que existen reportes que indican que después de recibida la quimioterapia los pacientes cursan por leucopenia^{16,18}

Esto corresponde por lo reportado en otros estudios en donde se observa que pacientes con otros tipo de tumores como: leucemia aguda, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, que reciben tratamiento de quimioterapia y posterior coadyuvante con Factor de Transferencia, presentan una recuperación de los niveles de Leucocitos y Neutrófilos posterior a la quimioterapia, quizá relacionado con la capacidad de estimular la síntesis CSF, que se reporta en diversos trabajos.^{24, 27, 29, 37}

En cuanto a la determinación del número de linfocitos T cooperadores (CD3⁺ CD4⁺) y su activación temprana natural (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺), observamos de manera general que en el paciente con presencia de metástasis y el grupo de pacientes sin metástasis que recibe tratamiento multimodal

convencional disminuyen los números significativamente con respecto a su toma inicial con un valor de $p = 0.004$ y 0.032 respectivamente, en el caso del grupo de pacientes con y el grupo de pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento coadyuvante con Transferón® estadísticamente no se observó diferencia significativa en el número de células $CD3^+ CD4^+$ con respecto a la toma inicial (con un valor de $p = 0.07$ y 0.067 , respectivamente). Sin embargo, en la figura 19 se observa aparentemente una disminución del número de estas células, que probablemente está relacionada con los efectos supresores de la quimioterapia o del propio tumor.²

En el caso de las células $CD4+CD25+$, observamos que en los pacientes con presencia de metástasis en ambos grupos (con tratamiento multimodal convencional sin y con coadyuvante de Transferón®) se observa que 50% de los pacientes de cada grupo presentaron una tendencia a la disminución de los valores iniciales con una diferencia estadística no significativa de 0.32 y 0.13 respectivamente y 50% de ellos aumentaron con un valor de p mayores a 0.05, por lo que podemos comentar que no existió un cambio significativo con respecto a sus tomas iniciales. Considerando el papel de estas células en una respuesta efectora temprana y su posible asociación con una respuesta de tipo supresora el hecho de que no se haya modificado sus valores iniciales, está indicando que quizá el tumor este desarrollando mecanismos de evasión tumoral que evitan la activación temprana de los linfocitos T $CD4^+$, debido quizá a la mutación de los antígenos tumorales específicos de OS y en consecuencia una ineficaz presentación antigénica. Lo cual lo podríamos confirmar si en estudios futuros se analiza la expresión de antígenos específicos relacionados con el OS y su posible mutación durante la progresión de la neoplasia, así como la determinación de la síntesis de IL-2 por células T activadas y la expresión de su receptor, adicional a la búsqueda de otros marcadores de activación celular .^{16, 46}

Con respecto a la cuantificación del número de linfocitos T citotóxicos ($CD3^+ CD8^+$) observamos que en el paciente con lesiones metastásicas, que recibe tratamiento multimodal convencional presenta una disminución significativa del número de estas células de 527 células/mL a 303 células/mL, esto puede deberse a los efectos citotóxicos de la quimioterapia y/o a que en el microambiente generado por el tumor se generan factores que favorecen la inducción de la apoptosis de las células $CD3^+ CD8^+$ ó bien su supresión.^{46, 47} En el caso del grupo de pacientes con metástasis que recibe tratamiento coadyuvante con Transferón®, observamos que a diferencia de lo que ocurrió en el paciente que solo recibe tratamiento de quimioterapia el número de estas células se mantuvo dentro de los límites medio y promedio de los valores de referencia, por lo que podemos comentar que probablemente el tratamiento con Transferón® está evitando la supresión de estas células. Sin embargo, sería interesante en estudios futuros cuantificar localmente (*in situ*), la presencia de estas células y su respuesta específica contra antígenos tumorales asociados a OS.

En el caso de los pacientes sin evidencia de lesión metastásica que reciben tratamiento convencional y pacientes con tratamiento convencional más Transferón®, no se observó un cambio significativo con respecto a su toma inicial en el número de las células CD3⁺ CD8⁺, observando una respuesta heterogénea en ambos grupos. Sin embargo, es importante hacer notar que 5 de los 9 pacientes incluidos en este grupo que recibió Transferón® presentaron un aumento en el número de sus células *ex vivo*. El hecho de que se observara un aumento del número de células es favorecedor en el posible buen pronóstico de la evolución de la enfermedad, ya que en algunos reportes indican que un número elevado de células CD3⁺ CD8⁺ favorece la sobrevida de estos pacientes⁴⁶, lo cual puede explicar el porqué en este grupo se obtuvo una mayor sobrevida con respecto a los que recibieron sólo tratamiento multimodal con quimioterapia.

En cuanto a la cuantificación de linfocitos B (CD19⁺) observamos que en los resultados de los pacientes sin metástasis y pacientes con metástasis más tratamiento coadyuvante con Transferón® no hubo diferencia significativa ($p = 0.11$ y $p = 0.08$ respectivamente), no obstante, se aprecia un aumento en el número de células con respecto al inicio de su tratamiento y comparando los resultados con el grupo que solo recibió tratamiento multimodal con quimioterapia. Por otro lado, los datos obtenidos en pacientes diagnosticados con metástasis con y sin Transferón como coadyuvante se presentó una diferencia significativa ($p = 0.03$ y $p < 0.05$ respectivamente),

Como sabemos los Linfocitos B son células relevantes en la respuesta citotóxica mediada por anticuerpos en contra de las células tumorales. El hecho por el cual los pacientes con Osteosarcoma grado IV presenten valores disminuidos, indica que probablemente en los casos avanzados de este tipo de tumores, exista una supresión de este tipo de respuesta debido quizá a los mecanismos de escape de los tumores, uno de ellos la baja expresión de moléculas HER-2 evitando la activación de los Linfocitos T, como se ha mencionado anteriormente. A diferencia de los pacientes sin metástasis que recibieron Transferón®, el aumento de éstas células genera que haya cooperación entre linfocitos T cooperadores y Linfocitos B, lo cual implica la producción de anticuerpos específicos contra las células tumorales.

Con respecto a las células NK (CD3-CD56+) observamos que en los pacientes sin metástasis y pacientes con metástasis que recibieron tratamiento coadyuvante con Transferón® no se observó diferencia estadística significativa ($p = 0.06$ y 0.08 respectivamente) sin embargo se puede apreciar que en el caso del grupo sin lesión metastásica aumentaron el número de estas células. Es importante comentar, que los pacientes que aumentaron el número de células NK también aumentaron las células T CD8+, lo cual es un indicativo de que el tratamiento coadyuvante con Transferón® este favoreciendo la respuesta inmunitaria antitumoral, como lo reportan en otras

investigaciones donde se observa aumento de estas poblaciones en pacientes que presentan otro tipo de neoplasias.^{15, 16, 23, 43} Por lo que sería interesante en investigaciones futuras analizar la capacidad citotóxica de estas células *ex vivo* posterior al tratamiento y/o determinar su presencia en los infiltrados tumorales *in situ*.

EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE SOBREVIDA.

En cuanto al tiempo de supervivencia se observó que el 100% en los pacientes sin metástasis y en el grupo de pacientes con metástasis, en ambos grupos que recibieron tratamiento coadyuvante con Transferón® después de dos años de seguimiento aumentaron significativamente ($p = 0.01$) el tiempo de supervivencia en comparación con lo encontrado en el grupo de pacientes que recibió el tratamiento multimodal convencional en donde se observa que el tiempo de supervivencia fue de 14 a 40 meses como máximo y en el caso del grupo que recibe coadyuvante con Transferón® aumentó hasta 60 meses.

Estos resultados son relevantes, ya que lo reportado en algunas otras investigaciones en pacientes con Osteosarcoma que reciben tratamiento de quimioterapia, se estima un tiempo de supervivencia alrededor de 3 a 5 meses en pacientes con metástasis (grado IV, de la clasificación de Enneking), y en el caso de los pacientes libres de metástasis grado III, con posibilidad de desarrollo temprano de metástasis un tiempo estimado de aproximadamente 17 meses, por lo que el hecho que en el caso de nuestro grupo de pacientes sin metástasis que recibe coadyuvante con Transferón® presenten una supervivencia de 60 meses es alentador para el manejo de estos pacientes, al comparar con los resultados de las evaluaciones inmunológicas una posible explicación de este aumento quizá esté relacionado con la posible participación de las células T CD8⁺ y células NK, poblaciones que aumentaron su número posterior al tratamiento coadyuvante, como se mencionó atrás. Estos resultados corresponden con lo reportado en otras investigaciones donde indican que niveles aumentados de estas células son de buen pronóstico para la vida de los pacientes con este tipo de tumores.^{5, 16, 17}

9. CONCLUSIONES

- De manera general los pacientes con grado avanzado de tumor óseo (grado III y IV), presentaron disminución del número de células linfoides (CD3⁺, CD19⁺, CD56⁺, CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ y CD3⁺ CD8⁺) en comparación con el grupo de donadores libres de Osteosarcoma y otras infecciones compartiendo la misma edad y sexo que los pacientes incluidos.
- Los 15 pacientes incluidos con diagnóstico de tumor óseo maligno grado III y IV, 61.1% fueron del sexo masculino, con una mayor frecuencia en el intervalo de edad entre 14 a 28 años, con una distribución de: 61% de tipo osteoblástico y 33% de origen condroblástico Y con una preferencia en su localización sobre huesos largos (fémur, tibia y humero).
- El tratamiento Coadyuvante con Transferón® mantuvo el número de leucocitos de sangre periférica de pacientes que recibieron tratamiento multimodal convencional con quimioterapia, lo cual permitió que este grupo de pacientes recibiera los ciclos de quimioterapia programados.
- Se observó que el grupo de pacientes sin metástasis que recibieron tratamiento coadyuvante con Transferón® presentaron un aumento en el 60% de los pacientes en el número de linfocitos T citotóxicos y células Natural Killer, células importantes en la inmunidad antitumoral, lo cual contribuyó posiblemente a la buena respuesta al tratamiento multimodal convencional en estos pacientes y al aumento en el tiempo de sobrevida a 60 meses con respecto al grupo que solo recibe tratamiento multimodal convencional a base de quimioterapia.
- El tratamiento con Transferón®, puede ser un una opción favorable en la inmunoterapia coadyuvante en pacientes con diagnostico de Osteosarcoma.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas Abul K, Lichtman Andrew, Pillai Shiv. 2009. Inmunología Celular y Molecular. Séptima Edición. Elsevier Saunders. 413-436.
2. Ahmed N, Salsman V, Yvon E, Louis C, Perlaky L, Winfried S, Klenierman E, Pule M, Rooney C, Heslop H, 2009. Immunotherapy for Osteosarcoma: Genetic Modification of T Cells Overcomes Low Levels of Tumor Antigen Expression. *Molecular Therapy*. 17 (10): 1779-1787.
3. Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutiérrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, González A. 2011. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers* 3: 3279-3330.
4. Ben-Eliyahu S, Page G, Schleifer SJ. 2007. Stress, NK cells and cancer: Still a promissory note. *Brain, Behavior and Immunity* 21: 881-887.
5. Bermúdez Balbuena V, López Durán A, Isunza Ramírez A. 2012. Osteosarcoma osteoblástico multicéntrico. Informe de Caso. *Acta Ortopédica Mexicana*. 25(4) 232-241.
6. Bernal Cáceres LE, Páez Aguirre SF. 2012. Osteosarcoma, experiencia en un hospital de tercer nivel. *Gaceta Mexicana de Oncología* 11 (5): 314-318.
7. Burger DR, Vandembark AA, Daves D, Anderson WA Jr, Vetto RM, Finke P. 1976. Human transfer factor: fractionation and biologic activity. *The Journal Of Immunology*. 117(3):789-96.
8. Brittenden J, Ross J, 2000. Natural Killer Cells and Cancer. *American Cancer Society*. 77, 7: 1226-1243.
9. Chan P, Boriani S, Fourney DR, Biagini R, Dekutoski MB, Fehlings MG, Ryken TC, Gokaslan ZL, Vrionis FD, Harrop JS, Schmidt MH, Vialle LR, Gerszten PC, Rhines LD, Ondra SL, Pratt SR, Fisher CG. 2009. An assessment of the reliability of the Enneking and Weinstein-Boriani-Biagini classifications for staging of primary spinal tumors by the Spine Oncology Study Group. *Spine (Phila Pa 1976)*. 34:384-391.
10. Cortés Rodríguez R, Castañeda Pichardo G, Tercero Quintanilla G. 2010. Guía de diagnóstico y tratamiento para pacientes pediátricos con Osteosarcoma. *Archivos de Investigación Materno Infantil*. II (2): 60-66.

11. Cuevas Urióstegui ML, Villasis-Keever MA, Fajardo Gutiérrez A. 2003. Epidemiología del cáncer en adolescentes. *Salud Pública Mexicana* 45 (1): S115-S123.
12. Díaz Molina VL, Peniche Castellanos A, Fierro Arias L, Ponce Olivera RM. 2012. Osteosarcoma Periférico. *Revista Médica y Quirúrgica*. 10 (2): 123-136.
13. Estrada-Parra S, O Velasco. Castrejon, F Rébora, ML Díaz, J Padierna 1983. Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. *Salud Pública de México* 25:589-599.
14. Estrada Parra S, et al 1998. Comparative study of transfer factor and aciclovir in the treatment of herpes Zóster. *International Journal of Immunopharmacology*. Department of Immunology, National School of Biological Sciences, National Polytechnic Institute. 20:521-535.
15. Fernández O, Díaz N, Morales E, Toledo J, Hernández E, Rojas S and Madriz X. 1993. Effect of transfer factor on myelosuppression and related morbidity induced by chemotherapy in acute leukaemias. *Brithish Journal of Haematology* 84: 423-427.
16. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-García ME. Castillo-Tello P, García de la Fuente A, Mendoza RD, Garza RG, Támez-Guerra RS and Rodriguez-Padilla C. 2008. IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyre extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non.small cell lung cancer patients. *Cytotherapy* 10: 490-496.
17. Fujisawa T, Yamaguchi Y, Kimura H, Arita M, Baba M, Mitsutoshi S, 1994. Adjuvant Immunotherapy of Primary Resected Lung Cancer with Transfer Factor. *Journal of Cancer*. 54: 663-670.
18. Gómez Lucía E. 2007. El complejo principal de histocompatibilidad en el manual de inmunología. Pearson Prentice Hall. 117-136.
19. Gómez Martínez R, Silva Padilla N, Guitérrez de la O M, 2012. Osteosarcoma metastásico al diagnóstico: características clínicas y pronóstico. *Gaceta Mexicana de Oncología* 11 (5) 296-299.

20. Janes-Hedder H, Keene N. Childhood cancer. A parent's guide to solid tumor cancers. Second edition. O'Reilly Cambridge. EU 2002: 164-181.
21. Janeway C, Murphy K, Travers P. 2008. Immunobiology. Seventh Edition. Garland Science. 213-234.
22. Jawad MU, Scully SP. 2010. Enneking Classification: Benign and Malignant Tumors of the Musculoskeletal System. Clinical Orthopaedics and Related Research. 468:2000-2002.
23. Kirkpatrick CH, 2000. Transfer Factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. Molecular Medicine 6: 332-341.
24. Ladanyi M, Gorlick R. 2000. Molecular pathology and molecular pharmacology of osteosarcoma. Pediatric Pathologic and Molecular Medicine; 19: 391-413.
25. Landstainer K, Chase MW. 1942. Experiments of Transfer of Cutaneous Sensitivity to Simple Compounds. Journal of Experimental Medicine. 71:231. 112-125.
26. Lara HH, Ixtepan Turrent L, Garza Treviño EN, Tamez Guerra R, Rodríguez Padilla C. 2010. Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant. Experimental and Therapeutic Medicine. 1: 425-431.
27. Lawrence HS.1955. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. J Clin Invest 34: 219-228.
28. Levin AS, Byers BS, Fudenberg HH, Wybran J, Johnston JO. 1975. Osteogenic sarcoma; immunologic parameters before a during immunotherapy with tumor specific transfer factor. Journal of Clinical Investigation. 55; 487-97.
29. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. 2004. Biology and Therapeutic advances for Pediatric Osteosarcoma. The Oncologist 9: 422-441.
30. Markiewicz K, Zeman K, Kozar A, Wozniak W. 2012. Evaluation of selected parameters of cellular immunity in children with Osteosarcoma at diagnosis. Medical Wieku. 16 (3): 212-221.

31. Martínez Macías R, Arizmendi Issasi SA, Flores Vázquez F, Barra Martínez R, Díaz Rodríguez L. 2004. Tratamiento de Osteosarcoma: experiencia de 10 años en el Hospital General de México. 3 (2): 36-37.
32. Mendoza SM, Millar CW. 1998. Integration of SV40 in human osteosarcoma DNA. *Oncogene*; 17:2457-2462.
33. Messerschmitt PJ, Garcia RM, Abdul-Karim FW, Greenfield EM, Getty PJ. Osteosarcoma. *J Am Acad Orthop Surg* 2009; 17(8): 515-527.
34. Muscolo DL, Farfalli GL, Tinao LA, Ayerza MA. 2009. Actualización en Osteosarcoma, *Revista de la Asociación Argentina de Ortopedia y Traumatología*. 84: 85-101.
35. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. 2004. *Farmacología Ilustrada*. Segunda edición. Mc Graw Hill. 123-234.
36. Niembro Zúñiga AM, Castellanos Toledo A, Gutiérrez Castellón P, Cárdenas R, Calderón Elvir C, Rivera Luna R. 2005. Resultado de ocho años en el tratamiento de Osteosarcoma. Experiencia en el Instituto Nacional de Pediatría. *Gaceta Mexicana de Oncología* 4 (3): 69-75.
37. Ni Tang, Wen Xin Song, Jinyong Luo, Rex C. Haydon, Tong-Chuan He. 2008. Osteosarcoma development and Stem Cell Differentiation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 466: 2114-2130.
38. Orfao A, Ciudad J, López A, Macedo A. 2002. La citometría en el diagnóstico clínico. *Universidad de Salamanca*. 111-130.
39. Ostrand-Rosenberg S. 2008. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current Opinion in Genetics & Development*. 18: 11–18.
40. Palomo Colli MA, Peña del Castillo H, Juárez Villegas LE, Lezama del Valle P, Cortés Rodríguez R, Zapata Tarrés M. Resultados del tratamiento de niños con Osteosarcoma en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Gaceta Mexicana de Oncología* 11(5): 306-313.
41. Palomo Colli MA, Peña del Castillo H, Juárez Villegas LE, Lezama del Valle P, Cortés Rodríguez R, Zapata Tarrés M. Resultados del tratamiento de niños con osteosarcoma en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 11 (5) 306-313.

42. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. 2002. Inmunología básica y clínica. Manual Moderno. 10ª edición. México. 48-54.
43. Passalacqua G, Albano M, Ruffoni S. 1995. Nasal immunotherapy to Parietaria: evidence of reduction of local allergic inflammation. American Journal of Respiration and Critical Care Medicine 152: 461-6.
44. Pierz KA, Womer RB, Dormans JP. 2002. Pediatric bone tumors: Osteosarcoma, Ewing's sarcoma, and Chondrosarcoma associated with multiple hereditary osteochondromatosis. Journal of Pediatric Orthopedics. 21: 412-428.
45. Pilotti Vladimiro, Mastrorilli Mario, Pizza G, De Vinci C, Busutti Luciano, Palareti A, Gozzetti G & Cavallari Antonio. 1996. Transfer Factor as an adjuvant to non-small cell lung cancer (NSCLC) Therapy. 9: 117-121.
46. Robles Contreras. 2010. Análisis del perfil de citocinas de las células limbo-epiteliales humanas estimuladas *in vitro* con los extractos dializables leucocitarios. Tesis Experimental
47. Rojas Espinoza O. 2007. Inmunología de Memoria. Tercera edición. Medico-Panamericana. 421-476.
48. Sánchez Torres LJ. Santos Hernández M. 2011. Osteosarcoma. Revista Mexicana 3 (1): 10-19.
49. San José et al. 2002. Introduction to Flow Cytometry: A learning Guide. BD Bioscience 8-52.
50. Whiteside T. 2010. Immune responses to malignancies. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 125: S272-S283.
51. Whiteside TL, Gulley J, Clay TM, Tsang, KY. 2011. Immunologic Monitoring of Cellular Responses in Cancer Vaccine Therapy. Journal of Biomedicine and Biotherapy. 10 (4): 211-223.
52. Wimbauer F, Yang C, Shogren KL, Zhang M, Goyal R, Riester SM, Yaszemski MJ, Maran A. 2012. Regulation of interferon pathway in 2-methoxyestradiol-treated osteosarcoma Cells. Bio Med Central Cancer, 12:93.

ANEXO 1.

Carta de consentimiento informado.



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: Halepi Gonzalez Ramirez de 16 años de edad.

Con domicilio en: Zapotecas 345 Ajusco Capcan
DF

Nombre del representante legal, familiar o allegado: Josmar Ramirez
de _____ años de edad. No de Registro 021983 Cama _____

Con domicilio en: Huismo

En calidad de: Madre

DECLARO

QUE EL DOCTOR: Gonzalez Guerra

Me ha explicado que es conveniente proceder en mi situación a:
Realización de Factor de Transparencia

Por tener diagnóstico: Fibromatosis músculo esquelética
antebrazo izquierdo

Todo acto médico diagnóstico o terapéutico, sea quirúrgico o no quirúrgico, lleva implícito una 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.