

11218
10



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES

CENTRO MEDICO LA RAZA

REJ

Identificación de Metastasis
Medulares Tempranas en
Pacientes con Cáncer
de Mama



TESIS DE POSTGRADO

Que para obtener el Título de
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA

Presenta
María Fabiola Vizcarra Reyes



IMSS

México, D. F.

Marzo de 1995

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO LA RAZA :

- DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA
- TITULO DEL PROTOCOLO:
 ** IDENTIFICACION DE METASTASIS MEDULARES
 TEMPRANAS EN PACIENTES CON CANCER DE -
 MAMA ** .

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

- 1) Dr. José González Llavén, Jefe del Depto. de Hematología Hospital de Especialidades C.M.R., Instituto mexicano del Seguro Social; Seris y Zaachila, México, D.F.

COLABORADORES:

- 2) Dr. Jorge Vela Ojeda, Hematólogo, Hospital de Especialidades del C.M.R., misma dirección.
- 3) Q.F.B. Laura Montiel Cervantes, Sección de Citometría de Flujo; Laboratorio de Hematología Especial, hospital de Especialidades del C.M.R.
- 4) Dra. Laura Díaz de León, Anatomopatóloga, Hospital de Especialidades del U.M.R.
- 5) Q.F.B. Aurora García Manzano, Sección de Hemostasia y -- Trombosis, Laboratorio de Hematología Especial, Hospital de Especialidades del C.M.R.
- 6) Dr. Cesar Lacelis Castañón, Jefe de Oncología Ginecológica, Hospital de Ginecología #3, Centro Médico la Raza.
- 7) Dr. Juan Manuel García Cebada Jefe de Anatomía patológica, Hospital de Ginecología #3, Centro Médico la Raza.
- 8) Dra. Fabiola Vizcarra Reyes, Residente del segundo año - del curso de hematología de post-graduo, UNAM, con sede en el hospital de Especialidades del U.M.R.

-Dirección del Departamento de Hematología, del U.M.R.
Seris y Zaachila, S.n, Col. la Raza, México, D.F.

FALLA DE ORIGEN

LISTA DE FUNCIONES :

- 1) Dr. José González Llavén:
 - responsable del proyecto
 - obtención de recursos materiales, técnicos y humanos.
 - supervisión - realización de análisis final.
- 2) Dr. Jorge Vela Ujeda:
 - Revisión microscópica de laminillas del aspirado de médula ósea de cada paciente, búsqueda de infiltración neoplásica.
- 3) Q.F.B Laura Montiel Cervantes:
 - Búsqueda de receptor para CD45 y citoqueratina, por citometría de flujo en médula ósea y tejido mamario.
 - Determinación de receptor estrogénico y de receptor para u-PA en impronta de tejido mamario y en médula ósea.
- 4) Dra. Laura Díaz de León:
 - Estudio microscópico de Biopsia ósea
 - Tinción de muestra con ematxilina y eosina - PAS y reticulina.
 - Búsqueda de colágena tipo I, con tinción de Masson.
- 5) Q.F.B Aurora García Manzano:
 - Determinación de uPA en plasma.
 - Determinación de uPA en extracto tisular de mama.
- 6) Dr. Cesar Bacelis Castañón:
 - Estadificación de pacientes.
 - establecer si se llenan criterios de inclusión
 - Proporcionar tejido mamario benigno y maligno.
- 7) Dr. Juan Manuel García Cebada:
 - Estudio citopatológico del tejido mamario.
 - determinar Cáncer mamario en el transoperatorio para inclusión y proceder a toma de muestras.
- 8) Dra. Fabiola Vizcarra Reyes:
 - Elaboración de Protocolo
 - Recavar muestras de tejido mamario benigno y maligno proporcionados en ginecología.
 - toma de muestras: Biopsia de hueso Iliaco aspirado de médula ósea con 5 frotis.
.Muestra de Médula 5 cc heparinizados.

CONTENIDO:

Hoja Frontal	0
Lista de Funciones	1
Contenido	2
Titulo	3
I.- Justificación	3
II.-Planteamiento del problema	6
III.-Objetivos	9
IV.- Hipotesis	10
V.- Diseño del estudio	11
VI.- Material y métodos	11
VII.-Población	14
VIII.-Criterios de inclusión	14
IX.- Criterios de no inclusión	14
X.- Criterios de eliminación	14
XI.- variables	15
XII.-Análisis estadístico	17
XIII.-Consideraciones éticas	18
XIV.- financiamiento	19
XV.- Bibliografía	20

ANEXOS:

1-	25
	-población global, a la que da servicio el hospital de Gineco-obstetricia #3 U.M.R.	
2-	25
	-clasificación anatómo-patológica del - cancer de mama.	
3-	27
	- reporte del registro Nacional Del Cancer.	
	- localizaciones anatómicas más frecuentes de tumores malignos en sexo femenino, en México.	

cont..... CONTENIDO:

ANEXOS:

- 4- 31
 - reporte del registro Europeo de Transplante de médula ósea en tumores sólidos (EERT).
 - Transplante autologo de médula ósea en cancer de mama.
- 5- 36
 - Pasos para la elaboración del método de Ficoll-Hypaque, para separación celular.
- 6- 38
 - Hoja de recolección de datos.
- 7- 40
 - Técnica para la cuantificación de activador del plasminogeno tisular tipo urocinasa a nivel plasmático y a nivel tisular.
- 8- 45
 - Presentación de resultados de primera etapa de el estudio.

P R O T O C O L O :

TITULO: ** Identificación de metastasis medulares tempranas en pacientes con cancer de - mama.**

1.- JUSTIFICACION:

El cancer de mama, se encuentra dentro de los primeros 3 lugares de causas de muerte por neoplasias en mujer, en estadísticas mundiales y en México. El Registro Nacional del Cancer, dependiente de la Secretaria de Epidemiologia, en su último informe de 1989 refiere que del total de canceres: el CaCu ocupó el primer lugar con 2,724.000 casos (27.7%), el cancer de mama el segundo con 1,522.000 casos (15.5%) y en el tercer lugar cancer de ovario y anexos con 396.000 casos (4.0%) - ver (anexo #3).

El estudio efectuado en 1970 (1) por la Dra. Elvia Contreras y Col. en Pittsburgh, E.U quienes realizaron 4,000 aspirados de médula ósea y biopsia ósea en pacientes con neoplasias diversas demostró infiltración medular en el 2.6% de las muestras, además de encontrar: fibrosis en el 87% y mieloesclerosis en el 67% de las muestras.

En 1976 (2) el Dr. Gurmuckh y Col. realizaron 6,500 aspirados y biopsias oseas en pacientes con canceres diversos, informando infiltración en dicha area en el 1,5% de los casos, pero muy alto indice de infiltración medular en los canceres de mama. Utilizaron como método diagnostico el aspirado de médula ósea y biopsia osea única en cresta iliaca. De los 101 casos de metastasis, 51 de ellos (53%) fueron secundarios a cancer de mama; las metastasis fueron identificadas de la siguiente manera: el aspirado identificó 30%, y la biopsia un 70%.

FALLA DE ORIGEN

La única manera de confirmar la presencia de metastasis a médula ósea es examinar en forma directa a la misma lo cuál se logra obteniendo muestra por medio de aspirado de médula ósea y biopsia ósea, aunque esta última tiene el mayor índice diagnostico (3)- los dos procedimientos son complementarios.

El Dr. Víctor Grann publicó en 1966, los resultados de un estudio comparativo del aspirado Vs - la biopsia ósea en relación a la sensibilidad para identificación de metastasis medulares. Realizó un total de 225 biopsias y aspirados de los cuales 153 fueron positivos: 93 con biopsias y 60 con aspirado, concluyendo que aunque la biopsia es más específica los dos métodos diagnosticos son complementarios para incrementar la identificación de micrometastasis.

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La identificación de células tumorales fuera del sitio de localización primaria tiene trascendencia para la clasificación de la extensión del tumor y secundariamente implicación terapéutica y pronóstica. El cancer de mama es uno de los tumores donde se han logrado más avances con nuevas estrategias terapéuticas, excelente campo para -- investigar e identificar más tempranamente las metastasis. Los métodos tradicionales de identificación, son el clínico, la imagenología y los histopatológicos. Dentro de estos, la biopsia y aspirado de médula ósea han demostrado un valor complementario para la identificación de metastasis -- oseas. tumores que aparentemente estan en estadios tempranos, modifican su extensión con el uso de estos métodos. La capacidad de metastatizar -- está en relación parcial con el tipo histológico; sin embargo ahora conocemos algunos factores más que incluyen tal cómo la relación Neoplasia-Hemostasis.

En 1992 más de 3000 mujeres en el mundo, recibieron el beneficio del autotransplante de médula ósea como opción terapéutica cuando estas habían agotado ya los demás recursos. más del 50% de -- ellas han logrado sobrevivida libre de enfermedad -- tumoral mayores que con los otros recursos terapéuticos. Sin embargo las recaídas en sitios primarios en donde se había erradicado el tumor ha hecho sospechar y se ha demostrado, en algunos casos, que puede ser causada por contaminación en el auto-transplante por células tumorales.

El planteamiento de el primer problema seria: con que frecuencia las médulas óseas de las pacientes con cancer de mama recién diagnosticadas y sin tratamiento, resultan infiltradas cuando se

FALLA DE ORIGEN

utilizan además de los métodos tradicionales, nuevas técnicas más sencibles y más específicas cómo son : la Inmunohistoquímica y el Inmunofenotipo.

Si este resultado fuese positivo se tendrían que formular otros planteamientos con estos problemas:

- Es posible limpiar la médula ósea contaminada?
- Los auto-transplantes con células tallo periféricas - son una mejor opción que los auto-transplantes de médula ósea para el tratamiento del cancer de mama, dado su menor grado de contaminación?.

El segundo problema que decaemos plantear, esta en relación a la interacción Neoplasia-nemostasia. Esta relación se demostró inicialmente por la inhibición en la invasión el tumor al utilizar heparina, por otra parte la estimulación de la célula tumoral para la mayor expresión del factor tisular por los macrofagos y monocitos. En los últimos años se ha investigado mucho en relación a la célula tumoral y la fibrinólisis así cómo la importancia -- que esta puede tener en la invasión del tumor, dentro de este campo mucho se ha enfocado al activador del plasminogeno tipo urocinasa, Urokinase plasminogen activator (uPA). Algunas neoplasias especialmente digestivas tienen altas concentraciones de uPA en conglomerados tisulares. En el cancer de colon los niveles iniciales de uPA tiene valor pronostico relacionado con la presencia de metastasis; la concentración de uPA se relaciona con la capacidad de invadir. El sustrato de uPA es el plasminogeno y este es el precursor de plasmina, asu vez los sustratos de la plasmina son fibrina, fibronectina, colagena IV, lamininas - etc. todos ellos presentes en la matriz y en la superficie celular y que participan en la integridad celular y tisular, así cómo en las proteínas adhesivas que limitan la migración celular tumoral.

En nuestro estudio el segundo planteamiento del problema seria:

- Cual es la concentración de uPA en las pacientes con cancer de mama, recién diagnosticadas y sin tratamiento?
- Cual es el comportamiento del uPA durante la evolución posterior?
- Tiene el uPA algún valor pronóstico en Ca de ma ma?
- Se relaciona más con algún tipo histológico?
- Se pueden modificar los niveles de uPA?

FALLA DE ORIGEN

III.- OBJETIVOS:

- A) Investigar la incidencia de metastasis a médula ósea en pacientes con cancer de -mama al momento del diagnostico.
- B) Evaluar la sensibilidad y la especificidad des estudio morfologico de aspirado-de médula ósea y biopsia contra el inmu-norenotipo en citometria de flujo en la-detección de metastasis medulares en pa-cientes con cancer de mama recien diag--nosticadas y sin tratamiento.
- C) Determinar la concetración del uPA sérico y tisular, en pacientes con cancer de ma-ma.

IV.- HIPOTESIS

A)
 VERDADERA: * La incidencia de metastasis a médula ósea en pacientes mexicanas con -- cancer de mama, es similar al reportado en otras poblaciones*

NULA: * La incidencia de metastasis a médula ósea en pacientes mexicanas con cancer de mama es distinto al reportado en otras - poblaciones.

B)
 VERDADERA: *La sensibilidad y especificidad en la detección de metastasis a médula ósea es mayor utilizando el inmunofenotipo- con citometria de flujo que con aspirado y- biopsia osea.*

NULA: *La sensibilidad y especificidad en la detección de metastasis a médula ósea es igual que utilizando inmunohistoquímica, que con aspirado y biopsia ósea.*

C)
 VERDADERA: *En pacientes con cancer de ma- ma el activador del plasminogeno tipo uroci- nasa se encuentra elevado a nivel sérico y- tisular.*

NULA: *En pacientes con cancer de mama, -- los niveles séricos de activador del plasmí- nogeno tisular tipo urocinasasa son normales.*

FALLA DE ORIGEN

V.- DISEÑO DEL ESTUDIO:

Es un estudio prospectivo, longitudinal y observacional.

VI.- MATERIAL Y METODOS:

Deberán identificarse y captarse las pacientes con sospecha de cancer de mama, quienes serán sometidas a biopsia de la lesión con estudio histopatológico transoperatorio, en caso de resultar positivo para cancer de mama, se incluirea en el protocolo y la muestra sera dividida en dos porciones: una para estudio histopatológico y otra para técnicas de inmunotipificación, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y cuantificación de uPA en tejidos. Se obtendrán 10 ml de sangre periférica para realizar en esta las mismas técnicas arriba mencionadas.

Se citarán 5 pacientes por semana, para exploración física completa, llenado de hoja de recolección de datos, (anexo #6), posteriormente se realizara aspirado de médula ósea a nivel de cresta iliaca siempre que sea posible, sólo en caso de paciente obesa o falló en la obtención de muestra a nivel iliaco, se realizará en esternón, se utilizará aguja de Osgood llevandose a cabo la técnica usual ya descrita en previos estudios, durante el mismo tiempo se realizara biopsia ósea con aguja de Jamshidi, siguiendo método convencional a nivel de cresta iliaca.

En patología se recibirá el hueso, conservado en formol al 10%, rotulado con una nota diciendo: *protocolo de metastasis medulares*, ahí se procede a descalcificarlo y se obtendrán cortes, que serán teñidos con ematoxilina-eosina, PAS y reticulina, se buscará colagena tipo I con técnica de Masson

FALLA DE ORIGEN

con tinción de reticulina se buscara colágena tipo - III, una vez preparada debidamente la muestra, será estudiada en el microscopio de luz, siempre por el mismo patólogo en busca de datos directos de infiltración: células neoplásicas, así como datos indirectos: osteoesclerosis, fibrosis reticulínica tipo III o fibrosis colágena tipo I.

Al momento de realizar el aspirado de médula ósea se procederá a la toma de 5ml de muestra de la misma y a la realización de 8 frotis de la misma sobre portaobjetos de cristal, estas serán teñidas en el laboratorio de hematología especial por el método de Wright y una vez listas se estudiarán con microscopio de luz, por 2 hematólogos que serán siempre los mismos en búsqueda de células neoplásicas; los 5 ml restantes serán utilizados para llevar a cabo la separación celular utilizando citometría de flujo por el método de ricoll-pypaque, el cual es explicado paso a paso en el anexo #3 de este protocolo: La finalidad de llevar a cabo este método es diluir nuestra muestra con el reactivo de ricoll-paque, centrifugar la muestra por citometría de flujo, de tal manera que por diferencia de densidades celulares estas se separen: el plasma arriba, conteniendo plaquetas, abajo el reactivo, células rojas y granulocitos y en la interfase quedando todas las células mononucleares y entre ellas las células neoplásicas que nos interesan, esta interfase es removida y lavada permitiéndonos observar por separado sólo las células contenidas en esta, siendo de esta manera más específica la búsqueda de células metastásicas. Se utilizarán anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra las líneas celulares específicas de mamario.

Por último de tomará muestra sanguínea en tubo con anticoagulante, la cuál se utilizará para la cuantificación de activador de plasminogeno tipo urocinasa, cuya técnica se describe en el anexo # 7 de este protocolo. El método de ELISA para cuantificar activador de plasminogeno tipo urocinasa, se ha desarrollado a base de la obtención de anticuerpos monoclonales, los cuales fueron obtenidos de ratones BALB/C inmunizados encontrando inicialmente 13 clonas que produjeron anticuerpos contra u-PA y de estos se tomarón los más específicos para conformar el panel, la mayoría de ellos dirigidos contra la cadena ϵ de el u-PA y algunos contra la cadena α . la cuantificación se hara en plasma y será reportada en nanogramos x ml y también en tejido y se reportara en gramo de tejido.

FALLA DE ORIGEN

VII.- POBLACION:

Conformada por mujeres de cualquier edad bajo la jurisdicción de el servicio de oncología en el hospital de gineco-obstetricia #3 del centro médico la raza, con diagnostico histopatologico reciente de cancer de mama, sin haber recibido tratamiento quimio o radioterapeutico, y encontrarse en estadio I-II.

VIII.- CRITERIOS DE INCLUSION:

- mujer
- cualquier edad
- bajo jurisdicción del hospital de Ginecoobstetricia no. 3
- diagnostico histopatologico de cancer de mama.
- Estadio I o II
- no haya recibido quimioterapia
- no haya recibido radioterapia
- aceptación para participar en el estudio.

IX.- CRITERIOS DE NO INCLUSION:

- estadio III-IV
- que haya recibido quimioterapia
- que haya recibido radioterapia
- que tenga enfermedad hematologica previa al dx.
- No aceptación de ingreso

X.- CRITERIOS DE ELIMINACION:

- Dificultad técnica en la toma de muestras
- no acude a cita o abandone seguimiento en U.M.A.
- voluntad de abandonar el estudio
- muerte.

FALLA DE ORIGEN

11.- VARIABLES:

VARIABLE	TIPO	ESCALA
<u>ESTADIO</u>	CUANTITATIVA INDEPENDIENTE	Clasificación anatómopatológica, anexo #2.
<u>INCIDENCIA</u>	CUANTITATIVA DEPENDIENTE	%
<u>ASPIRADO MEDULAR INFILTRADO</u>	CUANTITATIVA DEPENDIENTE	Si/No
<u>BIOPSIA OSEA INFILTRADA</u>	CUANTITATIVA DEPENDIENTE	-FIBROSIS: grado: I II III DAÑO AL ESTROMA: -Léve -moderado -Severo
<u>BICOMETRIA HEMÁTICA:</u>	CUANTITATIVA DEPENDIENTE	
leucocitos totales		menos de 5mil/mm ³ 5mil-10mil/mm ³ mas de 10mil/mm ³
hemoglobina		menos de 6 gr/dl 6-12 gr/dl mas de 12 gr/dl
hematocrito		menos de 35 de 35-45 menos 45
plaquetas		menos de 150mil/mm ³ 150-400mil/mm ³ más de 400mil/mm ³

FALLA DE ORIGEN

VARIABLE	TIPO	ESCALA
<u>CONCENTRACION SERICA u-PA</u>	CUANTITATIVA DEPENDIENTE	menos de 3ng/ml 3ng/ml mas de 3ng/ml
<u>CONCENTRACION TISULAR de u-PA</u>	CUANTITATIVA DEPENDIENTE	
<u>ANALISIS INMUNOHISTO- QUINICO</u>	CUANTITATIVA DEPENDIENTE	No. celulas

XII.- ANALISIS ESTADISTICO

- Analisis de multivarianza:
modelo proporcional de Cox

- Significancia estadística entre
curvas:
Método de mantel-Cox.

FALLA DE ORIGEN

xiii.- CONSIDERACIONES ETICAS:

- a) informar a los pacientes en que consiste el estudio
- b) Hoja de consentimiento firmada
- c) Los procedimientos y normas eticas seguidas en el estudio se --apegan a la declaracion de Hel--sinki y a las normas eticas de --el instituto mexicano del seguro social, asi c'omo al reglamento--para investigaci3n clinica de la Ley General de Salud.

FALLA DE ORIGEN

XIV.- FINANCIAMIENTO:

Inicialmente se hará con fondos de el departamento de hematología (20 millones). posteriormente, si se autoriza por CONACYT se tendrá patrocinio de esta institución.

pendiente desglosar presupuesto:

FALLA DE ORIGEN

XV. -BIBLIOGRAFIA:

- 1- Elvia Contreras, Laurence D. y Robert E. Value of the bone marrow biopsy in the diagnosis of metastatic carcinoma. *Cancer* 1972, 29:778-783.
- 2- Gurmuck Singh, John R. y Volfer B. Bone Marrow examination for metastatic tumor. *Cancer* 1977, 40: 2317 - 2321.
- 3- Bart Chernow, Stephen F. y Wallner. Variable predictive of bone marrow metastasis. *Cancer* 1977, 42:2373 a 2378.
- 4- Victor Grann, John L. y Klaus M. comparative study of bone marrow aspiration and biopsy in patientes with neoplastic disease. *Cancer* 1966, 19:1898 - 1900.
- 5- Yablonski, Sukldkes A. y Catane R. Secondary mielofibrosis with metastatic breast cancer simulating agnogenic myeloid metaplasia: report of a case and review of the literature. *Med and Ped Oncology* 1985, 13:92-96.
- 6- Scott Ringenberg, Donald C. y Michael P. Tumors of unknown origin in the bone marrow. *Arch intern Med* 1986, 146:2027-2028.
- 7- Leslie D. and Col. Detections of breast carcinoma cells in human bone marrow using fluorescence activated cell sorting and conventional cytology. *Am J Clin Pathol*, - 1990, 94 (1): 8-13.
- 8- Mann Goldwin y Col. Immunologic studies of bone marrow at the time primary therapy. *Arch gynecol obstet* 1989, 245: 732-734.
- 9- Obriant et al. elimination of clonogenic breast cancer cell from human bone marrow a comparison of immunotoxin treatment with chemoinmunoseparation using 40-hydroxy ciclofosfamide, monoclonal antibodies and magnetic micropheresis. *Cancer* 1991, 68:1272-8.
- 10- Singletaryse et al. Detection of micrometastatic tumor cell in bone marrow of breast carcinoma patients. *J s surg oncol* 1991, 47:32-36.

FALLA DE ORIGEN

cont.....

- 11- molino et al. A comparative analysis of three different techniques of the detection of breast cancer - cell in bone marrow. cancer 1991, 67:1033-36.
- 12- Bulent A. , Christine L. y mahum G. Metastatic tumor: The complementary role of the marrow aspirate and biopsy. Am J Med Sciences 1991, 302: 211-213.
- 13- Lynda Campbell and martin v. Hematological biochemical and bone scan finding in patients with marrow - carcinoma. Pathology 1991,23: 198-201.
- 14- Obriant A, Spall y Houston P. Elimination of clonogenic breast cancer cell from human bone marrow cancer 1991,23:1272-1277.
- 15- Biel J. et al. Detection of tumor cell in bone marrow cancer, of patients with primary breast cancer: a prognostic factors for distant metastasis. J Clin Oncol 1992, 10:1534-34.
- 16- Junke l and Fries S. Detection of tumor cells in bone marrow: a deciding aidl for adjuvant therapy in node negativo patients with breast cancer. Chirurg; 1992, 62:805-809.
- 17- Fritz Jänicke y Col. Clinical relevance of the Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators- and of their type 1 inhibitor in Breast Cancer. -- Seminars 1991,17(3):303-312.
- 18- Tryggvason A and Col. Extracellular matrix and its enzymatic degradation in tumor invasion. Semin --- thromb Hemost 1992,16:72-83.
- 19- Leen vanke, y col. measurement of urokinase-typa -- plasminogen activator (u-PA) and derivates containing the u-PA serin proteasa domain. Trombosis and -vascular research, university Leuven. Trombosis and haemostasis 1991, vol 6: 233-243.

FALLA DE ORIGEN

- 20- K. Beaupain y Col. Tumor necrosis factor induces a coordinate stimulation of urokinase type plasminogen activator production and cell migration in A-549 cell nodes. Laboratoire immunopharmacologie exp. UPR 405 laboratoire central d'hematologie, - Paris, France.
- 21- Dvorak HF y col. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N Engl J Med 315 --- 1992:1650-1654.

FALLA DE ORIGEN

A N E X O # 1

- POBLACION GLOBAL, A LA QUE DA SERVICIO
EL HOSPITAL DE GINECOLOGIA #3 CRR.

FALLA DE ORIGEN

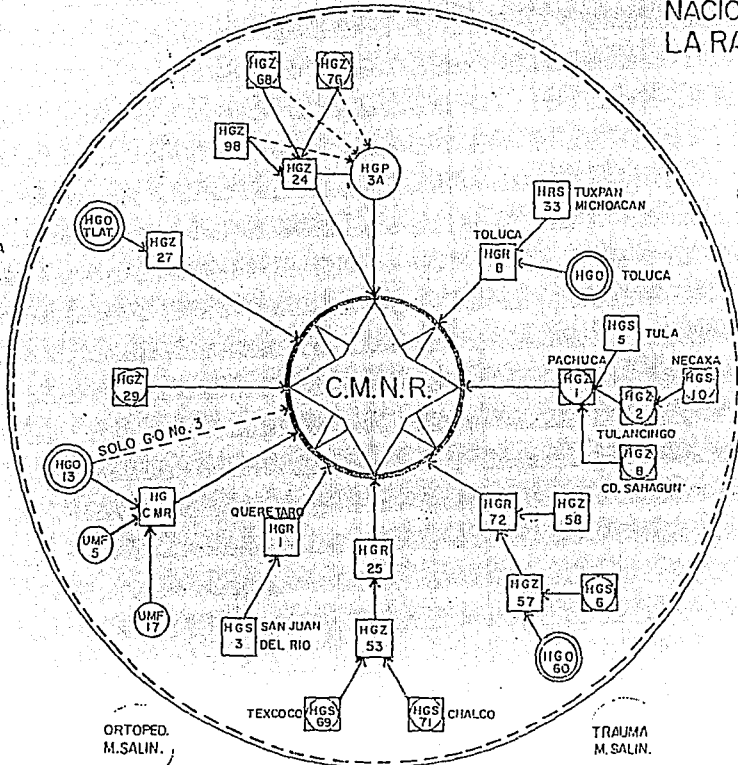


DELEGACION 2 NORESTE DEL D. F.

REGION CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

MEDICINA FISICA COLONIA

MEDICINA FISICA NORTE



ORTOPED. M. SALIN.

TRAUMA M. SALIN.

FALLA DE ORIGEN

A N E X O # 2

- CLASIFICACION ANATOMO-PATOLOGICA
DE EL CANCER DE MAMA

FALLA DE ORIGEN

A N E X O :CLASIFICACION ANATOMOPATOLOGICA :CANCER DE MAMA :

AMERICAN JOINT COMMITTEE

ETAPA I.-

- . Tumor menor de 2 cms
- . No ganglios
- . No metastasis

ETAPA II.-

- . Tumor menor de 5 cms
- . ganglios palpables no fijos
- . no metastasis

ETAPA III.-

- . Tumor mayor de 5 cms
- . tumor cualquier tamaño, con invasión cutánea, o fijo a pared torácica

ETAPA IV.-

- . Con metastasis distantes.

FALLA DE ORIGEN

A N E X O # 3

-
- REPORTE DE EL REGISTRO NACIONAL DE
CANCER
 - SERVICIO DE : SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y
ASISTENCIA (SSA)
 - 20 LOCALIZACIONES ANATOMICAS MAS FRECUEN
TES DE TUMORES MALIGNOS EN SEXO FEMENINO
 - Por frecuencia
 - por edades
 - por tipo de poblacion usuaria

FALLA DE ORIGEN

veinte localizaciones anatómicas principales de los tumores malignos y sus tipos morfológicos en el -- sexo femenino.

DISTRITO FEDERAL 1989.

Núm. Orden	Localización	Lista básica CIE-O-9	Casos	Porcentaje
1	Cérvix	180	2 724	27.7
2	Mama	174	1 522	15.5
3	Linfomas	(200-202)º	405	4.1
4	Ovario y anexos	183	396	4.0
5	Leucemias	(208-208)º	340	3.5
6	Cuerpo del útero	182	322	3.3
7	Estómago	151	297	3.0
8	Glándula tiroides	193	281	2.9
9	Tráquea, bronquios y pulmón	162	230	2.3
10	Encéfalo	191	191	1.9
11	Vesícula y vías biliares	156	163	1.7
12	Tejido conjuntivo	171	152	1.5
13	Recto - Ano	154	144	1.5
14	Colon	153	131	1.3
15	Riñón - Uréter	189	121	1.2
16	Vejiga urinaria	188	119	1.2
17	Vulva - Vagina	184	95	1.0
18	Higado	155	72	0.7
19	Boca, encía y glándulas salivales	142-145	71	0.7
20	Hematopoyético	202	69	10.7
	Piel	173	1 010	10.3
	Las demás		503	5.1
	No especificadas	199	492	5.0
	TOTAL		9 850	100.0

Fuente: registro nacional del cancer/DPG/SSA

FALLA DE ORIGEN

Núm. Orden	Localización	IN - MTV		Incurtada		Metastásica		Diseminada		Desconocida		Total	
		Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
1	Cérvix	747	4.7	1826	11.4	110	0.7	31	0.2	10	0.1	2724	17.0
2	Mama	30	0.2	1251	7.8	200	1.3	30	0.2	10	0.1	1521	9.5
3	Linfomas	0	0.0	172	1.1	402	2.5	319	2.0	77	0.5	970	6.1
4	Próstata	1	0.0	673	4.2	35	0.2	11	0.1	11	0.1	731	4.6
5	Leucemias	1	0.0	11	0.1	5	0.0	673	4.2	1	0.0	691	4.3
6	Estómago	5	0.0	483	3.0	82	0.5	22	0.1	7	0.0	597	3.7
7	Tráquea, bronquios y pulmón	1	0.0	454	2.8	120	0.8	63	0.4	11	0.1	649	4.1
8	Cuerpo del útero	16	0.1	282	1.8	17	0.1	5	0.0	2	0.0	322	2.0
9	Ovario y anexos	0	0.0	305	1.9	72	0.5	15	0.1	3	0.0	395	2.5
10	Encéfalo	2	0.0	409	2.6	12	0.1	5	0.0	7	0.0	435	2.7
11	Glándula tiroidea	2	0.0	268	1.7	67	0.4	7	0.0	7	0.0	351	2.2
12	Vejiga urinaria	7	0.0	384	2.4	16	0.1	3	0.0	9	0.1	419	2.6
13	Testículo	0	0.0	248	1.6	31	0.2	8	0.1	1	0.0	288	1.8
14	Colon	1	0.0	203	1.3	41	0.3	7	0.0	5	0.0	257	1.6
15	Vesícula y vías biliares	5	0.0	149	0.9	34	0.2	20	0.1	2	0.0	210	1.3
16	Melanomas de la piel	3	0.0	237	1.5	27	0.2	18	0.1	9	0.1	294	1.8
17	Recto - Ano	4	0.0	225	1.4	33	0.2	7	0.0	5	0.0	274	1.7
18	Tejido conjuntivo	3	0.0	306	1.9	17	0.1	13	0.1	12	0.1	351	2.2
19	Huesos y articulaciones	2	0.0	154	1.0	14	0.1	7	0.0	2	0.0	179	1.1
20	Laringe	3	0.0	161	1.0	23	0.1	2	0.0	0	0.0	189	1.2
	Piel	36	0.2	1609	10.4	58	0.4	7	0.0	7	0.0	1777	11.1
	Las demás	60	0.4	1106	6.9	128	0.8	194	1.2	21	0.1	1509	9.4
	No especificadas	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	862	5.4	862	5.4
	TOTAL	929	5.8	10976	68.6	1544	9.7	1467	9.2	1081	6.8	15997	100.0

FALLA DE ORIGEN

Año	Tipo de Población						Total	Porcentaje
	Abierta	Porcentaje	Asegurada	Porcentaje	Privada	Porcentaje		
1982	669	37.7	864	48.7	240	13.5	1773	100.0
1983	506	28.4	1013	56.5	260	14.6	1779	100.0
1984	473	24.8	1129	59.3	302	15.9	1904	100.0
1985	479	32.4	712	48.2	286	19.4	1477	100.0
1986	544	30.5	919	51.5	321	18.0	1784	100.0
1987	669	37.0	825	45.6	314	17.4	1808	100.0
1988	634	32.8	911	47.2	386	20.0	1931	100.0
1989	637	41.7	496	32.5	394	25.8	1527	100.0
TOTAL	4611	33.0	6869	49.1	2503	17.9	13983	100.0

FALLA DE ORIGEN

A N E X O # 4

-
- Reporte de el REGISTRO EUROPEO DE TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA EN TUMORES SOLIDOS (EBTM)
 - reporte de la reunion de Estocolmo 1992
 - Transplante Autologo de Médula Ósea en - cancer de mama.
 - Transplante Autologo de Médula Ósea en - Cancer de ovario y esquema de acondicionamiento.

FALLA DE ORIGEN

REGISTRO DE TUMORES SOLIDOS
GRUPO EUROPEO DE TRANSPLANTE:



RENT, Working party, Estocolmo 1992.

FALLA DE ORIGEN

1992 EUROPEAN GROUP OF TRANSPLANTATION OF BONE MARROW
 REGISTER OF SOLID TUMORS:
 CANCER OF BREAST n:134

PARTICIPANTS & INSTITUTIONS:

HOSP. P. CALMETTES MARSEILLE	FRANCE	26 Dr MARANHINI
HOP. S.M. DELLE CROCI RAVENNA	ITALY	24 Dr ROSTI
ELIZABETH HOSP. S. AUSTRALIA	AUSTRALIA	15 Dr DALE
HUDDINGE HOSPITAL HUDDINGE	SWEDEN	12 Dr BJORKSTRAND
HOSP. CLINICO UNIV. VALENCIA	SPAIN	9 Dr GARCIA-CONDE
CENTRE LEON BERARD LYON	FRANCE	7 Pr PHILIP, Dr BIRON
CENTRE R. HUGUENIN ST CLOUD	FRANCE	7 Dr JANVIER
HOP. PAUL BROUSSE VILLEJUIF	FRANCE	7 Dr MISSET, Dr LEMOHNIER
METH. CANCER INST. AMSTERDAM	NETHERLANDS	6 Dr RODENHUIS, Dr SOMERS
UNIVERSITY INNSBRUCK INNSBRUCK	AUSTRIA	4 Dr HUBER, Dr NIEDERWIESER
CENTRE A. LACASSAGNE NICE	FRANCE	4 Dr THYS
HELLENIC CANCER INST. ATHENS	GREECE	3 Dr EFREMEDIS
HOPITAL LAENNEC PARIS	FRANCE	2 Dr ANDRIEU
OSPEDALE A. CARDARELLI NAPLES	ITALY	1 Dr BATTISTA
ACADEMISCH ZIEKEN. MAASTRICHT	NETHERLANDS	1 Dr SCHOOTER
C.H. REGIONAL BESANCON	FRANCE	1 Dr CAHN, Dr PLOUVIER
POLICLI. DI BORGO ROMA VERONA	ITALY	1 Dr CETTO
HOP. BRETONNEAU TOURS	FRANCE	1 Dr COLOMBAT
DEEN HOED C.CENTER ROTTERDAM	NETHERLANDS	1 Dr BONTENHAL, Dr LOWENBERG
HOP. J. BERNARD POITIERS	FRANCE	1 Dr GUILHOT
UNIV. DEGLI STUDI DI PARMA	ITALY	1 Dr RIZZOLI

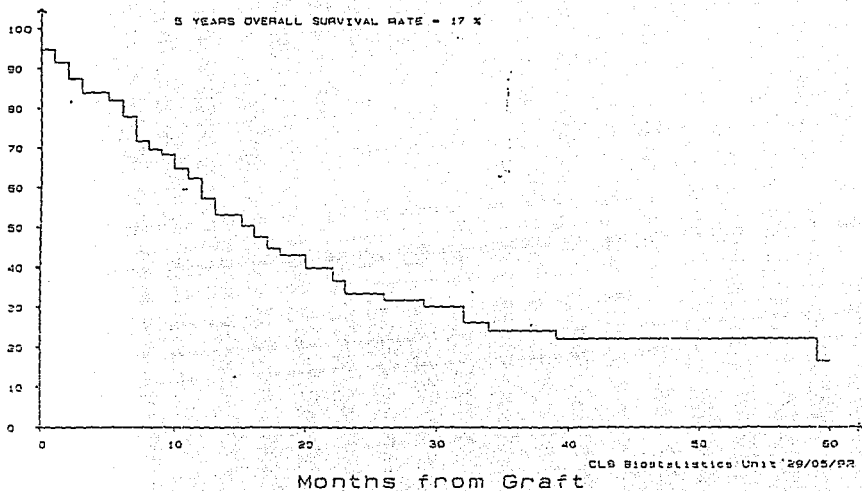
35

EWMT, Working party, Estocolmo 1992.

FALLA DE ORIGEN

EBMT 1992 : CANCER DE MAMA

134 pacientes i con injerto:



EBMT, Working party, Estocolmo 1992.

FALLA DE ORIGEN

GRUPO EUROPEO DE TRANSPLANTE :
 REPORTE DE TRANSPLANTE REALIZADO EN
 PACIENTES CON CANCER DE MAMA :

Since its recent approval in 1990, the EBMT breast cancer registry had collected up to spring 1992, 132 cases coming from 7 centers in Europe and one in Australia.

Mean age of the women was 37.4 years with range 22 to 59 years. Nine cases were transplanted while over 50 years of age. Double graft was performed only in one Center (12 patients). Sixty-eight cases were transplanted while not in progression of their disease (i.e. CR, PR or SD).

Fourteen patients received ABMT adjuvant chemotherapy for high risk breast cancer (more than 10 involved axillary nodes). Toxic death was 4% in the overall population and no patient died during ABMT as adjuvant therapy.

No conclusions can obviously be drawn from these preliminary and scattered data. Few patients were registered while on protocols. Anyway toxic death rate up to now seems independent of age. The outcome of the 24 cases transplanted for inflammatory breast carcinoma seems interesting with nearly half of the patients alive at more than two year follow up.

At the present time an homogeneous update of the registry is warranted and many now centers are collecting ABMT and they will send soon to the data centre (Athens, Geneva, Jerusalem and Amsterdam).

Noteworthy 10 patients are alive with no disease at least two years.

The increasing use of ABMT or PBSC in breast cancer will certainly increase the registered population in the near future and at the end of 1992 more than 200 cases will be joining the EBMT registry.

Many centers (Milan and others) will participate to the registry after their data will be published.

It is not the time for breast cancer to start an European trial because different protocols are ongoing around, but for the end of this year some centers will finish their ongoing local trial and may join a common protocol which will be randomized (i.e. best standard regimen versus high doses and ABMT/PBSC in responding metastatic breast cancer). An interesting feature is the enormous interest that this policy is having in the former Eastern Countries where in the next years many centers will begin to transplant breast cancer patients (Hungary and Czechoslovakia).

When the registry will be increased it will certainly be a formidable tool for all those who will deal with this type of treatment.

ANEXO # 5

- pasos para la elaboracion de el método de micoll-mypaque, para separacion celular.
- citometria de flujo

INMUNOFENOTIPIFICACION POR MEDIO DE CITOMETRIA DE FLUJO.

ESPECIMEN:

10-20 ml de sangre periférica con EDTA o heparina (normal).
03-05 ml de médula ósea con EDTA o heparina (problema).

REACTIVOS:

1. PBS
2. FICOLL-PAQUE
3. AZUL DE TRIPANO
4. EPITHELIAL MEMBRANE ANTIGEN (EMA) (anticuerpo monoclonal)

PREPARACION DE LA MUESTRA

- A) Obtención de células mononucleares utilizando gradiente de densidad con Ficoll- paque.
- B) Ajustar la concentración celular a 1×10^6 cel/ml
- C) Ajustar la viabilidad a > 85% de células viables utilizando azul de tripano.
- D) Colocar en un tubo de 12 X 75 de plástico desechable 50 micro.l de células mononucleares.
- E) Adicionar 20 micro.l de Ac monoclonal marcado con FITC
- F) Incubar 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad
- G) Lavar con PBS / azida de sodio.
- H) Adicionar 0.5 ml de paraformaldehído.

* Hacer el mismo procedimiento para una muestra normal.

FALLA DE ORIGEN

CITOMETRIA DE FLUJO :

- 3 ml de médula ósea con EDTA
- 10ml de sangre periférica normal con EDTA
- separación de células Mononucleares con Ficoll

100 ml de células Mononucleares
↓
50 ml de Anticuerpo primario
 marcado con FITC
↓
incubar 20 min. (obscuridad)
↓
Lavar con PBS (3ml)
↓
Fijar con paraformaldehido(1ml)
↓
Leer en el citometro de flujo
con el programa de Lysys II.

Realizar este procedimiento para mononucleares de la médula ósea y de Sangre periférica normal con el anticuerpo anticitoqueratina y con el --UD45 por separado.

INMUNOPEROXIDASA :

Impronta de tejido de Médula ósea
↓
fijar 60 segs.
↓
lavar 2 veces con PBS
↓
incubar 10 minutos con peróxido de hidrogeno + citrato de sodio.
↓
lavar 2 veces con PBS
↓
Incubar 10 minutos con suero AB al 5% y decantar.
↓
lavar 2 veces con PBS
↓
incubar 40 min con Acido primario
↓
lavar 2 veces con PBS
↓
incubar 40 min con Acido secundario
↓
lavar 2 veces con PBS
↓
Incubar 40 min con el complejo PAP
↓
lavar 2 veces con PBS
↓
Incubar 30 min con AEC
↓
lavar 2 veces con agua desionizada
↓
Incubar 10 min con verde de metilo
↓
lavar con agua desionizada
↓
fijar y leer

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

A N E X O # 6

- HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO LA RAZA:HOJA DE RECOLECCION DE DATOS:

FICHA:
FECHA:
NOMBRE:
GEDULA:
EDAD:
DATOS CLINICOS:
DX HISTOPATOLOGICO:
ESTADIO:
COMPLICACIONES:
LABORATORIO:
Hó:
Hto:
LEUC.TOT:
H.T:
L.T:
reticulocitos:
Normoblastos:
Desv. Izq:
Tp:
TTP:
rosf Alc:
DHL:
ac. urico:
Ca:
PC4:
Otros:

RESULTADOS DE ESTUDIOS:

ASPIRADO DE MEDULA OSEA:

BIOPSIA OSEA:

CONCENTRACION DE u-PA:

Serico y tisular

IMMUNOHISTOQUIMICA:

HEMATOLOGIA/ HECMR

FALLA DE ORIGEN

A N E X O # 7

-
- Técnica para la cuantificación de activador de plasminogeno tipo urocinasa u-PA a nivel plasmático.
 - técnica para la cuantificación de activador de plasminogeno tipo urocinasa.

DETERMINACION DE NIVELES DE uPA EN
TEJIDO MAMARIO MALIGNO :

Recolectar muestra de tumor de mama, y lo más rápido posible colocarla en hielo dentro de un recipiente, eliminar la grasa - y realizar corte para obtener muestra de 300mg.

Congelar a -80 C las muestras

Pulverizar el tejido en un mortero

Suspender en 1,8ml de TBS (buffer de salina fosfato).

Adicionar 0.2ml de tritón X-100 al 10% conservar a 4C durante 12 horas.

ultracentrifugar a 100,000 x g/60seg a 4 C para separar las células.

Descartar el sobrenadante y cuantificar - proteínas por ensayo de Bradford.

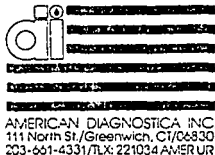
Ajustar el contenido de proteínas a 2-3 mg/ml con TBS.

Alicuotar en 100microlitros

congelar a -80 C hasta su uso

Determinar niveles de uPA por el método de ELISA.

** ELISA. técnica ya descrita utilizando equipo comercial.



MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR

Seven different Bioscot monoclonal antibodies against t-PA are available. product references ESP 1 to 7.

THE CELL LINES

The antibodies were derived by immunisation of mice with human melanoma t-PA. Hybridomas were obtained by fusion of immunised spleen cells with myeloma cell line NS. 1/1. Ag 4.1.

SUBCLASS AND AFFINITY OF THE ANTIBODIES

The affinity constants covered a range of 90 fold as assessed by Scatchard analysis of competitive binding curves.

Product Reference	Ig Subclass	Affinity Constant (l/mol)	Product Reference	Ig Subclass	Affinity Constant (l/mol)
ESP 1	IgG ₁	9.25×10^8	ESP 5	IgG ₁	5.21×10^9
ESP 2	IgG ₁	8.00×10^9	ESP 6	IgG ₁	1.94×10^7
ESP 3	IgG _{2b}	1.70×10^7	ESP 7	IgG ₁	1.69×10^9
ESP 4	IgG ₁	2.52×10^9			

The subclass of six of the antibodies was IgG₁, while a seventh (ESP 3) was IgG_{2b} as assessed by immunodiffusion and protein A chromatography. ESP 3 was also less stable under the low pH conditions required to elute it from protein A. This same antibody only partially retained its capacity to bind t-PA after solid phasing, while the other six retained their binding ability.

SPECIFICITY OF THE ANTIBODIES

All of the antibodies were specific in that they inhibited t-PA activity and bound t-PA tracer but did not interact with urokinase or plasmin.

Each antibody quenches the activity of t-PA in a concentration dependent manner.

No inhibition of urokinase plasminogen activator is observed at antibody concentrations far in excess of those causing 50 per cent inhibition of t-PA activity.

BINDING SITE RECOGNITION AND POTENTIAL USES FOR THE ANTIBODIES

Several of the antibodies recognise different binding sites on the t-PA molecule and these differences combined with the different affinities of each antibody suggest a series of uses for the antibody range. For instance:

Product Reference	Property	Potential Use
ESP 1 and 2 ESP 1 and 5 ESP 1 and 7	Recognise different epitopes on t-PA	Two-site immunoassay for t-PA
ESP 1 and 3	High affinity for t-PA	Immunodepletion of t-PA in biological fluids
ESP 2, 4, 5, 7	Medium affinity for t-PA	Immunoaffinity purification of t-PA from cell culture and recombinant DNA products
ESP 4, 5 and 6 ESP 2, 4 and 7	Recognise cell associated t-PA Recognise active site epitopes	Immunohistochemical localisation of t-PA Active site probes of t-PA

* Antibodies ESP 2, 4 and 7 recognised active site epitopes as determined by active site probes and interference with activity against chromogenic substrates. Interference with the interaction between t-PA and fibrin clots was also observed.

* Immobilised ESP 2, 4 and 5 combined high absorption capacity for t-PA with good recovery when eluted with 3M KSCN. t-PA adsorbed by ESP 1 could not be eluted under these conditions.

* Antibodies ESP 4, 5 and 6 were suitable for localisation of t-PA in fixed cell cultures by means of an indirect immunoperoxidase system.

* An immunometric assay in which one component is an antibody recognising an active site epitope may permit discrimination of active t-PA from inactive t-PA-inhibitor complexes.

* All of the antibodies appear suitable for indirect immunoperoxidase localisation of t-PA on nitrocellulose blots transferred from SDS PAGE gels.

LITERATURE REFERENCE

MacGregor I R et alia, THROMB HAEMOSTAS (Stuttgart) 53, 45 - 50 (1985).

PRODUCT PRESENTATION AND PRICING

Vials of 0.5 mg Protein A purified, lyophilized antibody. ~~\$12 per vial~~ ~~\$1000~~ ~~One each of the above seven ESPs~~
Sephacrose bound, \$300 per mg antibody. ~~(ADI 85-08-30)~~

FALLA DE ORIGEN

PRESENTACION DE AVANCES :

PRIMERA ETAPA DEL ESTUDIO:

Esta primera etapa consiste en la estandarización de las técnicas estableciendo rangos normales en la población mexicana.

Inicialmente se desea realizar la cuantificación de receptor para activador de plasminogeno tipo urokinasa, en mujer sana con tumoración benigna de mama.

A un grupo de 20 mujeres portadoras de tumoración benigna de mama se les sometió a cirugía para la obtención de muestra de tejido benigno de mama, procedente de mencionada tumoración, dividiendo en dos fragmentos la muestra, como sigue:

- a) 1 gramo de tejido para montar impronta y fijarla, para posterior detección de receptor para u-PA por método de citometría de flujo y Anticuerpo específico. (monoclonal).
- b) 3 gramos de la muestra se procesarán para obtener extracto tisular de acuerdo a técnica convenida en anexo #7.

Se procedió a realizar determinación del total de proteínas ajustándose en alícuotas de 100 microlitros con una concentración de 2-4 mcg/ml de proteínas para posteriormente determinar la presencia de u-PA por la técnica de ELISA, utilizando equipo American-Diagnostic, catalogo 121.

PRESENTACION DE AVANCES :

PRIMERA ETAPA DEL ESTUDIO:

Las muestras de sangre de las 20 pacientes, se centrifugaron a 3mil revoluciones por minuto durante 10 minutos obteniendose dos alicuotas que inmediatamente fueron congeladas a -80C para su posterior determinación de concentración de u-PA.

Hasta el momento se han procesado 15 muestras tanto de tejido benigno y a parte las respectivas muestras de sangre de las mismas pacientes, con esto se presentan en este avance las curvas de estandarización, pero nos esperaremos a completar 20 muestras para la determinación de u-PA y urAK con el objeto de optimizar recursos, ya que los reactivos que se emplean en estas determinaciones tienen una vigencia muy corta despues de reconstituirse y conviene meter las 20 muestras utilizando un mismo equipo.

-primera curva: es la correspondiente al equipo (American Diagnostic).

-Segunda curva: es la obtenida de las 15 muestras de tejido benigno de 3gr cada una para obtener : Curva de rango estandar de concentración.

. Vertical corresponde a dilucion de la muestra.

. Horizontal corresponde a concentración de proteínas.

-ya obtenida esta curva y completando las 20 muestras de tejido benigno, se procedera a cuantificar u-PA y u-PAR de las mismas. y continuar con el resto de objetivos de este protocolo.

BECKMAN DU-600

Date: 22/01/95
Time: 14:03

ed Wavelength
adSamples Method Parameters SaveClear Print Quit

Results file: A:\MCRK_REE Method name: A:\SRADFORD
Read average time: 0.50 Read mode: [Abs] Sampling device: None

Sample ID λ 575.0
 Factor 1.000

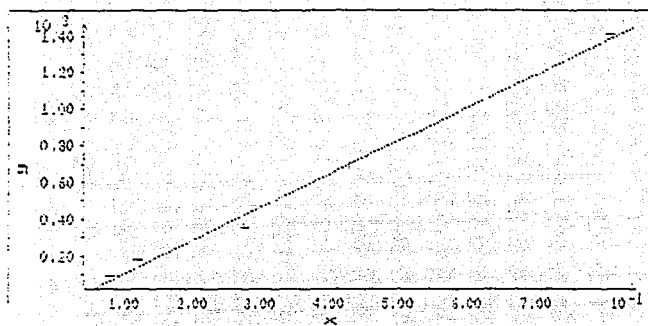
	Abs	Result
		ng/ml
1	0.0773	0.0773
2	0.1130	0.1130
330 UG/ML	0.3730	0.3730
700	0.4274	0.4274
1400	0.8039	0.8039

FALLA DE ORIGEN

Método de Bendford

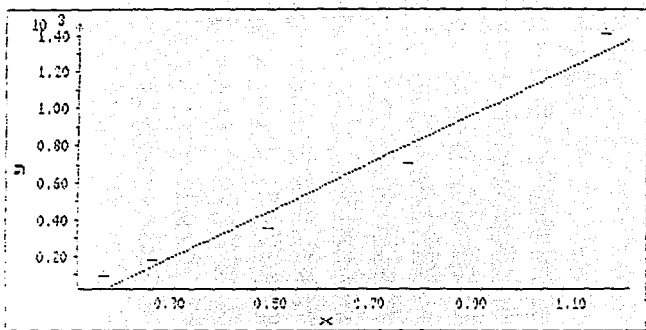
22-01-95

1



FALLA DE ORIGEN

#2



FALLA DE ORIGEN