



## Acta la Sesión de la ANMM del 30 de marzo del 2016

### Presentación del trabajo de ingreso

**68Ga-DOTA-E [c (RGDfK)]<sub>2</sub>: Un radiofármaco potencial para el diagnóstico temprano de neoplasias mediante la detección in vivo de angiogénesis.** Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez

El Dr. Ávila dio una breve introducción general sobre los radiofármacos y la medicina nuclear; comentó que por su forma farmacéutica y la radiación que emiten, se pueden usar en humanos, ya sea con fines de diagnóstico por imagen o como tratamiento, principalmente en oncología. Así pues, según la penetración de la radiación que producen, si permanece en una zona muy confinada se puede usar su radiación para terapia, y si la radiación sale del paciente se puede hacer diagnóstico por imágenes.

Comentó sobre la tecnología que detecta a los positrones (PET), que son partículas subatómicas que al conjugarse con los electrones, se aniquilan y emiten energía que es detectada. En esta tecnología se usan fármacos emisores de positrones, que se detectan en equipos que conjugan al PET y a un tomógrafo computarizado.

Esta metodología ha permitido aplicar in vivo estrategias basadas en la biología molecular usando moléculas conjugadas con isótopos que emiten positrones. La Facultad de Medicina de la UNAM es una institución pionera en México al desarrollar este tipo de estrategias.

El trabajo de ingreso se basó en el estudio molecular de la angiogénesis en etapas tempranas de la formación de neoplasias, cuando el tumor llega a un tamaño de 1 a 2 centímetros, se empieza la vascularización. Uno de los primeros eventos en la angiogénesis asociada al crecimiento neoplásico es la producción del factor angiogénico. Otro evento temprano es la expresión de algunas integrinas, como la alfa 5 beta 3, que se usa en este trabajo como blanco molecular. La sobre expresión de la integrina se ha propuesto como un factor pronóstico de formación de metástasis.

El Dr. Ávila explicó que las integrinas son proteínas formadas por una cadena alfa y una beta que intervienen en la unión célula-célula o célula-matriz extracelular. Estas proteínas juegan papel importante en la angiogénesis y en particular la integrina alfa 5 beta 3 se sobre expresa en las células tumorales y en las células endoteliales en división, de modo que si se detecta su sobre-expresión puede detectarse tumores de hasta de un cm. de tamaño.

Se sabe que la integrina alfa 5 beta 3, se une de manera específico a un péptido con la secuencia arg-gly-asp (RGD), de modo que se diseñó un radiofármaco que es un dímero RGDfK para tener una mayor afinidad, y que presenta mejor farmacocinética. Para



marcar el (RGDfK) se usó Galio 68 que es muy estable y que puede ser marcado muy eficientemente sin que se requiera un ciclotrón

Los estudios preclínicos se llevaron a cabo en el modelo animal de ratón detectando la sobre expresión de la integrina alfa 5 beta 3 mediante el dímero RGDfK marcado con Galio 68 [68Ga-DOTA-E [c (RGDfK)]<sub>2</sub> usando un micro PET, con el que se cuenta en la Facultad de Medicina.

El Dr. Ávila presentó el estudio de biodistribución en voluntarios sanos, que se hizo en 3 hombres y 2 mujeres, mostrando que en 2.5 horas el radiofármaco se elimina por la orina. Se encontró que el Galio 68 [68Ga-DOTA-E [c (RGDfK)]<sub>2</sub> se encuentra en plexos coroides, y no cruza la barrera hematoencefálica. Se llevó a cabo una dosimetría de diferentes órganos.

Como conclusión el Dr. Ávila dijo que el radiofármaco desarrollado tiene una menor dosis efectiva que otros péptidos del tipo RGD, que han sido evaluados. También resaltó las ventajas de usar compuestos marcados con Galio 68.

Comentó además, que el Galio 68 [68Ga-DOTA-E [c (RGDfK)]<sub>2</sub> ya se está utilizando en fase 2 en el INCan, y ha tenido bastante éxito para detectar tumores o metástasis cuando son muy pequeños. Dijo que los resultados parecen indicar que la intensidad de unión del radiofármaco es un factor pronóstico en cáncer de pulmón.

**Comentarista:** Dra. Alicia Graef Sánchez

La Dra. Graef dijo que las aplicaciones de la medicina nuclear han permitido avanzar en el diagnóstico y tratamiento de diferentes padecimientos, principalmente en el área oncológica y que el más reciente avance es la incorporación de las técnicas moleculares, como el caso del trabajo de ingreso del Dr. Ávila.

Este trabajo tiene como objetivo realizar la fase clínica 1 del uso del Galio 68 [68Ga-DOTA-E [c (RGDfK)]<sub>2</sub> para el diagnóstico temprano de la angiogénesis ligada a las neoplasias.

Describió que se ha demostrado que la angiogénesis está limitada por la concentración de la integrina, y que el papel de esta proteína es el de reclutar los componentes que degradan la membrana basal, de modo que sea factible la angiogénesis. La integrina no es fácilmente detectable en los vasos normales, pero aparece en la angiogénesis.

La Dra. Graef, comentó además, la importancia para la síntesis del radiofármaco utilizado del uso del generador de Germanio 68, que permite sintetizar el radiofármaco, que es muy estable, y se puede utilizar en humanos. Además la síntesis es más sencilla y rápida y no requiere ciclotrón.

Resaltó que por primera vez en un estudio en humanos se midió la dosimetría en varios órganos, y destacó el hallazgo de que el radiofármaco se acumuló en la vejiga en



hombres. Dijo que a partir de los resultados de este estudio, se ha usado el radiofármaco para uso clínico en el INCan y parecen tener muy buenos resultados.

Para terminar la Dra. Dra. Graef felicitó al Dr. Ávila por su trabajo que permite detectar la angiogénesis en etapas muy tempranas de la formación de tumores.

## **Simposio**

### **Trasplantes de células hematopoyéticas en enfermedades no hematológicas**

**Coordinador:** Dr. Guillermo José Ruiz Argüelles

**¿De dónde se obtienen las células hematopoyéticas?** Dr. Guillermo José Ruiz Delgado

Al iniciar su participación, el Dr. Ruiz Delgado agradeció la oportunidad de participar al Dr. Enrique Graue, Presidente de la ANMM, y al Dr. Guillermo Ruiz Argüelles, su padre y coordinador del simposio.

Posteriormente presentó la concentración de células totipotenciales en distintos tejidos que se usan para purificarlas. Las células totipotenciales se distinguen porque tienen en la superficie el antígeno CD34.

En la médula ósea están en una concentración de  $3 \times 10^6$ , mientras que en la sangre periférica (después de la estimulación con filgrastim para aumentar la concentración de células totipotenciales circulantes) su concentración es de  $6 \times 10^6$ /kilo; también están presentes en sangre de cordón umbilical y en menor concentración en el hígado fetal. Dijo que durante la gestación estas células totipotenciales circulan entre el feto y la placenta.

Por otra parte, comentó algunos hitos en la historia del trasplante, como por ejemplo que los primeros estudios fueron en los 50s. Y que a partir de los 80s se comenzó los trasplantes autólogos y se continuó realizando los alogénicos. A partir del año 2000 se empezó a hacer trasplante con células provenientes de sangre periférica, previa estimulación y también de sangre de cordón umbilical. Presentó datos del año 2014 que muestran que los trasplantes de donador no relacionado se han incrementado recientemente, y consideró que este tipo de intervención es el futuro en el área de los trasplantes. Concomitantemente ha disminuido los trasplantes de células provenientes de cordón umbilical.

También señaló algunas diferencias en las células madre que se sacan de cada tejido, siendo las obtenidas de la médula ósea las que generan una menor incidencia de la reacción de injerto contra huésped, que puede ser mortal, pero tienen la desventaja de



que se tiene que hacer un procedimiento que es dolorosas y realizar varias punciones. Por otra parte el procedimiento más sencillo es tomarlas de sangre periférica después del tratamiento con filgrastim, que puede causar dolor óseo con fiebre. El filgrastim es un análogo del factor producido de manera natural en el cuerpo humano, estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF); el filgrastim se produce por medio de la tecnología de ADN recombinante.

El Dr. Ruiz Delgado relató que, si bien actualmente se realizan diferentes tipo de trasplantes el tipo más frecuente es el de donador no relacionado, con un antígeno leucocitario humano (HLA) idéntico, dijo también que el 30% de los hermanos son compatibles para ser donadores de trasplante. La respuesta de injerto contra tumor es mayor si el donante es no relacionado, pero la respuesta tarda en darse. Se ha incrementado el número de los trasplantes autólogos y también de los alogénicos.

En cuanto a las enfermedades que más se benefician con el uso de trasplantes, mencionó en primer lugar al mieloma múltiple, en segundo lugar el linfoma de Hodgkin, y en tercer lugar el linfoma no Hodgkin. También se aplica en enfermedades de origen autoinmune, como ser verá en algunas presentaciones del simposio, incluyendo la cirrosis derivada de una hepatitis autoinmune.

### **¿Cómo se evalúan las células hematopoyéticas?** Dr. Alejandro Ruiz Argüelles.

El Dr. Alejandro Ruiz Argüelles agradeció la invitación y empezó la presentación de su tema diciendo que las células hematopoyéticas son las más tempranas en el desarrollo, y que su caracterización fenotípica es reciente; son células que expresan el antígeno CD34.

Sin embargo estas células no representan una población homogénea y se pueden distinguir cuatro tipos: las células que están en reposo (y que son las más indiferenciadas); y las células que están ciclando que son precursores y se pueden empezar a diferenciar, distinguiéndose tres tipos, los precursores de células linfoides B, de linfoides T y de células mieloides. Juntos estos cuatro tipos son entre el 0.01 al 1% de las células de la médula ósea. Debido a la baja concentración en las que se encuentran, contarlas bien es muy difícil, ya que cuando se cuantifican eventos raros el error es mucho mayor y si un evento tiene una frecuencia menor al 1% hay una alta% la probabilidad de que haya gran error. Como ejemplo habló de la cuantificación de neutrófilos y de eosinófilos.

Para disminuir el error hay que contar un gran número de células y para ello se usa la citometría de flujo con células marcadas con fluorocromos conjugados a anticuerpos contra algunas moléculas de superficie. Sin embargo este procedimiento tiene otras



fuentes de variación, como el tipo de anticuerpo que se usa para detectar cada tipo celular.

En el caso del antígeno CD34, el Dr. Ruiz Argüelles comentó que hay muchos tipos de anticuerpos contra CD34 en el mercado, que él evaluó a los de Clase I, Clase II, Clase III, y encontró que este último tipo son los que hay que usar, pero que se venden todos, y que algunos grupos usan unos y otros, otros, o incluso hacen mezclas.

Otras causas de variabilidad en los resultados, se encuentran los diversos protocolos de tinción, así como el uso de distintos protocolos de adquisición y análisis de datos, y variaciones de los instrumentos y del software empleado.

Casi todos los protocolos, coinciden en usar un cromóforo que identifica a las células muertas, para trabajar sólo con las células viables, también se usa el anticuerpo contra CD45 que tiñe a todos los linfocitos, así pues más del 95% de las células con CD45+, mientras que las positivas a CD34, son el 0.55%.

El Dr. Ruiz Argüelles presentó un estudio para evaluar la variabilidad de las mediciones de células CD34+, en el que se tomaron muestras de 50 sujetos, y las células se tiñeron con dos protocolos y se usaron dos instrumentos distintos que tienen el mismo hardware y software, y que fueron manejados por el mismo usuario.

Adicionalmente se empleó una plataforma única y la plataforma doble. Dentro de los resultados de los distintos procedimientos se encontró que los valores de correlación son aceptables, sin embargo al ver el análisis fino se ve que la pendiente detectada, dista mucho de la regresión ideal. Resaltó de estos resultados que si se usa uno u otro instrumento se puede concluir que sí hay suficientes células para llevar a cabo un trasplante, o que no la hay.

El Dr. Ruiz Argüelles recalcó que la variabilidad de los resultados es inaceptable y que se encontró esta gran variación en un protocolo en el que se excluyen varios factores que fueron iguales.

Para terminar dijo que hay mucha controversia sobre el número de células que se requiere usar en el trasplante para que sean efectivos, y que esta controversia puede deberse al método de detección empleado, que se requiere usar marcadores internos. Sin embargo, la estrategia de “bautizar” las muestras con células CD34+ como un marcador interno, no es una buena estrategia, ya que al aumentar la concentración se elimina el error comentado anteriormente.

### **Trasplante de células hematopoyéticas en diabetes mellitus tipo 1.** Dr. David Gómez Almaguer

El Dr. Gómez Almaguer comentó que la idea de usar el trasplante de células hematopoyéticas es porque la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es de origen autoinmune,



de modo que se buscó hacer una reprogramación del sistema inmune, eliminando las clonas que atacan al páncreas.

Adicionalmente se buscó si se podían usar métodos diferentes a los que se usan en otros países y que resultan muy caros, realizando trasplantes autólogos, de bajo costo y mediante un procedimiento ambulatorio.

La DM1 es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por un ataque de anticuerpos sobre las células beta pancreáticas. Así pues, se ha intentado controlar la autoinmunidad para evitar la pérdida de producción de insulina.

Con este propósito se llevó a cabo un estudio en el que se inició por obtener las células hematopoyéticas de un paciente, para después dar quimioterapia para eliminar los linfocitos que atacan el páncreas, y posteriormente regresar las células hematopoyéticas (trasplante autólogo). El costo aproximado del tratamiento es de 3,000 dólares.

Se incluyeron pacientes de 8 a 25 años de edad que tuvieran una función pancreática considerable. El grupo de pacientes estuvo constituido por 7 mujeres y 9 hombres. Hubo algunos episodios de fiebre en algunos pacientes, pero ninguno requirió ser hospitalizado.

En cuanto a los resultados encontrados, el Dr. Gómez Almaguer dijo que 7 pacientes no requieren ya insulina, y que ya llevan varios años desde el trasplante (el que más tiempo tiene es de 5 años); otros 6 pacientes tuvieron una mejoría parcial, mientras que 3 requirieron cada vez más insulina, como si no hubieran sido trasplantados. En general se puede concluir que a menor funcionamiento del páncreas en el momento del trasplante, menor será el éxito.

Como conclusión señaló que se estableció un procedimiento para trasplante extra hospitalario, con un bajo costo de medicamentos para hacer la quimioterapia, y una disminución del riesgo de infecciones nosocomiales, todo lo que al final reduce costos. Este estudio fue financiado por la Universidad Autónoma de Nuevo León. Comentó además que se piensa ir a una segunda etapa, con un grupo de pacientes trasplantados más amplio, y con un grupo control.

**Trasplante de células hematopoyéticas en esclerosis múltiple.** Dr. Guillermo José Ruiz Argüelles Discusión y conclusiones.

El Dr. Guillermo Ruiz Argüelles comenzó describiendo a la esclerosis múltiple (EM), que es una enfermedad autoinmune con muchas complicaciones, que se caracteriza por una desmielinización y daño a los axones y que responde a inmunosupresores.

Comentó de algunos fármacos que se usan para su tratamiento, como el interferón beta, pero no se tienen resultados muy satisfactorios.



Presentó que la EM no tiene una distribución geográfica homogénea, siendo menos frecuente en países tropicales.

La EM se clasifica de acuerdo al grado de discapacidad del paciente en una escala del 0 al 9.

Comentó que el uso de los trasplantes para algunas personas y países, como EUA, se considera que es un procedimiento experimental, pero se ha encontrado que produce efectos positivos importantes, por lo que para otras personas dejar de ofrecer esta opción, constituye una falta de ética.

Comentó que, como en otras enfermedades autoinmunes, la inmunosupresión y el trasplante permiten que se resetee el sistema inmune, y en muchos casos se cure o aminore la enfermedad. En este sentido señaló que se han trasplantado más de 700 pacientes, con este tipo de procedimientos que se empezaron a usar desde hace 2 años y que se ha visto que el 50% de los pacientes se recuperan.

Resaltó que uno de los mayores obstáculos para la aplicación de los trasplantes para el tratamiento de la EM, es quién lo debe hacer. Este procedimiento está en tierra de nadie, si se considera a los neurólogos, o hematólogos

Por otra parte, el Dr. Guillermo Ruiz Argüelles dijo que en muy pocos países se trasplanta a los pacientes con EM, y que en México, este tipo de trasplantes son muy recientes.

Relató la realización de 206 trasplantes de médula ósea (TMO) autólogos que se llevaron a cabo mediante una colaboración trabajando de manera coordinada, del grupo de la clínica Ruiz en Puebla, y el Dr. Gómez Almaguer en Monterrey, que fue desarrollado íntegramente por estos grupos, sin copiar lo que otros hacen, y que es un procedimiento de bajo costo.

Son elegibles para el trasplante, pacientes con todo tipo de EM, que haya tenido 3 meses sin inmunosupresores, y que no tenga un nivel menor a 7, es decir que puedan caminar. El Dr. Ruiz Argüelles presentó un grupo de estudio que estuvo constituido por 57 pacientes, 33 de ellos eran mujeres y 24 hombres, y tenían una media de 47 años. Sólo una pequeña proporción de los pacientes era de México, y había una diversidad de países de origen, siendo el más frecuente Brasil.

Se aplicaron 2 ciclos de ciclofosfamida, y se les dio filgrastim, realizándose de 1 a 4 aféresis, con  $2.4 \times 10^6$  células por kg de peso. Durante el estudio se tuvieron 2 admisiones al hospital de los 57 pacientes tratados. Todos los pacientes están vivos después de 34 meses. Al analizar los scores de discapacidad de los pacientes trasplantados, se puede constatar que ha habido un descenso significativo en la discapacidad de los pacientes.

Otra conclusión del estudio es que el filgrastrim producido en México funciona tan bien como el importado y el costo es significativamente menor. Sin embargo hay que tener



en cuenta que el filgrastim puede empeorar la EM, si no se dan esteroides de manera concomitante.

Otro elemento a considerar es que los inmunosupresores como el rituximab, siguen funcionando después de los trasplantes, por lo que no se pierde esta opción terapéutica. El Dr. Ruiz Argüelles comentó que a la fecha, ya se han trasplantado 84 pacientes con EM usando este procedimiento extra-hospitalario, de bajo costo, en el que no se congelan las células. En términos generales se puede afirmar que en el 50% de los casos, el paciente ya no se pone peor, y el 25% de los pacientes trasplantados se mejoran. Así pues, no se ve una mejoría en el 25% de los pacientes trasplantados.

Como conclusión el Dr. Ruiz Argüelles dijo que en la controversia presentada al inicio de su intervención, hay que tomar una decisión, y que los oyentes pueden tomarla en función de los datos que escucharon ¿es un procedimiento experimental? ¿Es ético no aplicar los trasplantes en pacientes con EM?

### **Discusión y conclusiones.**

El Dr. Enrique Graue felicitó y dio la bienvenida al Dr. Miguel Ángel Ávila por su trabajo de ingreso a la ANMM y agradeció a la Dra. Graef por sus comentarios. Asimismo, felicitó a la familia Ruiz, resaltando que la Clínica Ruiz en Puebla, ha tenido gran éxito en el tratamiento de la leucemia, y hoy presentan la aplicación de los trasplantes para enfermedades no hematológicas.

Entre los comentarios y preguntas que se realizaron destacan las siguientes:

- La regulación sanitaria en EUA considera experimental el uso de trasplantes para tratar la EM. Aunque ya se realiza en otros países, como Panamá.
- Preocupa que el estudio presentado por el Dr. Gómez Almaguer para tratar la DM1, haya sido realizado con niños.

El Dr. Gómez Almaguer, comentó que el protocolo del estudio referido había sido aprobado por el comité de ética del hospital, por la COFEPRIS, y que los padres de los niños que participaron en el estudio, firmaron el consentimiento informado.

- ¿Cuál es el criterio de aplicar rituximab con intervalo de 2 meses?  
El criterio para elegir las dosis de rituximab empleadas es que funcione como un inmunosupresor y no como un tumoricidas. El protocolo implica la combinación del uso de la ciclofosfamida tiene un efecto sobre las linfocitos T y el rituximab actúa sobre linfocitos B.
- ¿Por qué no aplicar células mesenquimales y progenitores neurales en el caso de la EM?





Es una estrategia muy sólida desde el punto de vista teórico, dijo el Dr. Ruiz Argüelles, pero difícil de implementar, porque es muy difícil contar con los precursores neurales, en las condiciones necesarias. Sin embargo, en México hay un investigador que propaga los precursores neurales.

- En los pacientes con mejoría después de un trasplante, en contraste con los que no la tienen ¿cuál puede ser la causa de la diferencia de la respuesta en el caso de la EM?
- La idea es reprogramar el sistema inmune, y así el sistema inmune deja de atacar a los tejidos. Los trasplantes también se están aplicando en lupus eritematoso grave. El objetivo es que se detenga el deterioro a largo plazo. Hay algunos pacientes que se mejoran durante el trasplante, pero no a largo plazo, y estos no se consideran como casos positivos.
- ¿Sabemos cuántos centros hacen estos procedimientos y cómo se puede homologar los procedimientos para evitar los problemas señalados por el Dr. Alejandro Ruiz Argüelles?

En México hay varios lugares que hacen trasplantes, pero no se ha hecho ningún esfuerzo para homologar los procedimientos.

En otros, los laboratorios que hacen trasplantes “bautizan” las muestras con células leucémicas para validar sus procedimientos, y en esas condiciones las cuentas salen muy bien porque es muy fácil (dada la abundancia de las células que se van a contar), pero cuando se usan muestras reales los resultados son desastrosos.

- Hay niños con mala respuesta al trasplante, ¿cuáles son los factores pronósticos? El grupo estudiado, es un grupo muy pequeño, y no se puede llegar a conclusiones claras. Si fue aparente que los 3 niños que no respondieron al trasplante, tenían más altos anticuerpos, por lo que pudieran tener más daño en el páncreas.

Hay que considerar que algunos enfermos pueden tener una respuesta autoinmune más grande de lo que se puede tratar. Es un terreno espinoso y se comentó el caso de China y de Brasil. Este último país puede tener una de las mayores experiencias, ya que Brasil los primeros al apoyar a un investigador norteamericano.

- En cuanto el seguimiento a largo plazo de los pacientes con EM que fueron trasplantados, usando las técnicas de imagen, se comentó que el 25% de los pacientes que mejoraron en cuanto a los síntomas, también se reflejó en los estudios de imagen, pero no se sabe a largo plazo ya que se valúan usando la



escala de discapacidad, cada 3 y 6 meses, pero no se hacen los análisis mediante imágenes.

- Si el objetivo es remodelar el sistema inmunológico, ¿no sería adecuado hacer un trasplante de otro paciente?

El trasplante autólogo tiene menos mortalidad y por eso se usa, pero pudiera ser más lógico usar las células de otro individuo para evitar las recaídas.

Las células que producen daño a la mielina, tienen mutación somática, si se reconstituye se excluyen las mutaciones somáticas.

- Si tienen la dificultad de que los pacientes una vez trasplantados, se van y no es fácil hacer un seguimiento ¿se hacen biobancos con las muestras que se les toma durante el procedimiento del trasplante?

No existen biobancos como tal, pero los productos de aféresis se guardan.

**\*El texto de esta ponencia se encuentra disponible en la página de la ANM**