

# Impacto de las ciencias básicas en la hematología actual

Héctor Mayani,\* Julio Cáceres-Cortés,\* Enrique Miranda\*

## Introducción

Los avances logrados durante las últimas tres décadas en áreas como la biología celular, la bioquímica, la genética, la inmunología y la biología molecular, han ayudado a entender, en forma más precisa y completa, los mecanismos que regulan la producción de las células sanguíneas (hematopoyesis) y su funcionamiento. Esto, a su vez, ha tenido un gran impacto en el desarrollo de la hematología clínica, pues ha permitido la creación de nuevos y mejores métodos para el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades hematológicas. Como ejemplo de lo anterior, a continuación presentaremos algunos de los últimos avances en tres áreas de gran relevancia en la hematología actual.

## Mecanismos de Resistencia a Drogas en Neoplasias Hematológicas

Uno de los principales problemas en el tratamiento de las enfermedades malignas, es la capacidad que presentan algunas células neoplásicas para ser insensibles al efecto de varios agentes quimioterapéuticos. Esto, evidentemente, hace que en muchos casos, los esquemas de tratamiento fracasen. Múltiples mecanismos contribuyen al fenotipo de resistencia a drogas en células malignas. El principal mecanismo documentado en neoplasias hematológicas es la sobreexpresión del producto del gen *mdr-1*, la glicoproteína P (gpP). Esta es una proteína de membrana con actividad ATPasa, que previene la acumulación intracelular de drogas lipofílicas al bombearlas hacia fuera de la célula. En un principio, se creyó que la resistencia a drogas en neoplasias hematológicas se debía, exclusivamente, a la sobreexpresión de la

gpP; sin embargo, diversas evidencias han demostrado que esto no es así. Por un lado, estudios clínicos reportaron la presencia de resistencia a drogas en pacientes que no presentaban sobreexpresión de gpP. Por otra parte, una serie de estudios en pacientes que presentaban células gpP+ en circulación, las cuales fueron eliminadas experimentalmente, demostraron que al desaparecer éstas, surgían otras con la misma insensibilidad a varios fármacos, pero que empleaban mecanismos distintos. Recientemente han sido diseñados varios agentes llamados “quimiosensibilizadores”, con el objeto de vencer la resistencia a drogas mediada por la gpP. Dichos agentes están siendo actualmente probados en la clínica. Aun cuando las expectativas al respecto son altas, varios investigadores se mantienen escépticos, porque, como ellos manifiestan, es muy grande la posibilidad de que este tipo de tratamiento, aunque sea capaz de eliminar a las células que utilizan a la gpP, provoque el surgimiento selectivo de células neoplásicas que posean otros mecanismos de resistencia a drogas y, por lo tanto, sean refractarias a dicha terapia.

En relación con otros mecanismos involucrados en la resistencia celular a múltiples drogas, es importante mencionar que se han identificado varias proteínas transportadoras que usan principios moleculares semejantes a los de la gpP. Estas incluyen a la proteína relacionada con MDR (MRP), la proteína resistente de pulmón (LRP) y el transportador de péptidos antigénicos (TAP). Existen, por otra parte, mecanismos alternos de resistencia a drogas, los cuales consisten en: (i) brindar protección a las moléculas intracelulares que son blanco de diversas drogas, (ii) alteraciones moleculares que hacen más eficientes los mecanismos de reparación del ADN y (iii) alteraciones moleculares que inhiben la apoptosis (muerte celular programada).

\* Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, A.C. San Francisco No. 1626-406 Col. Del Valle C.P. 03100 México, D.F. Tel. 55341856 Te/Fax: 55241112.

Es, pues, evidente que los mecanismos de resistencia a drogas son muchos y muy complejos, pudiendo presentarse más de uno de ellos en la misma población celular, en forma simultánea o secuencial. Por esto, la solución a este problema clínico tan serio dependerá, fundamentalmente, de los avances que se logren en cuanto a la caracterización de dichos mecanismos y del desarrollo de nuevos agentes farmacológicos.

### Enfermedad Mínima Residual en Leucemia

Muchos de los pacientes con leucemia que logran la remisión completa, eventualmente recaen debido a la persistencia de un bajo número de células malignas (enfermedad mínima residual; EMR). La EMR se refiere también a las células leucémicas residuales presentes entre las células hematopoyéticas de sangre periférica (SP) o médula ósea (MO), obtenidas antes de la terapia mieloablativa para el trasplante autólogo. Así pues, se ha hecho evidente la necesidad de detectar la posible presencia de células malignas en pacientes que se encuentren en alguna de estas situaciones. Existen diferentes métodos para evaluar la EMR: Citología, citogenética, FISH, Southern blot cuantitativo, Western blot cuantitativo (todos ellos con 1% de sensibilidad); inmunofluorescencia (IF) en combinación con citometría de flujo (FC; 0.01% de sensibilidad); hibridación *in situ* fluorescente en combinación con un separador de células (FACS) y marcaje con bromodeoxiuridina (0.003% de sensibilidad) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; 0.0001% de sensibilidad). Por su alta sensibilidad, los tres últimos métodos son los más utilizados en la actualidad. Mediante FC multiparamétrica, es posible predecir la evolución de la enfermedad en pacientes con leucemia. Entre los principales marcadores utilizados se encuentran: CD10 y CD19 para LLA; CD11b, CD14, CD15, CD33, CD34 y CD117 para LMA; CD11C, CD25, y CD103 para leucemia de células peludas; CD5 y CD19 para LLC. La tecnología de FISH para el análisis de metafases ha demostrado ser más eficiente que para el análisis de interfases. Algunos de los marcadores empleados para esta metodología son: monosomía 7, trisomía 8, translocación t(8; 21) para LMA; *pml-rar* para LMA-M3 y *bcr-abl* para LMC.

La PCR es el método más sensible para la detección de EMR. La prueba se puede realizar en muestras de sangre periférica (SP) o de médula ósea (MO). Aunque los niveles de detección en SP son, en promedio, 11.7 veces más bajos que en MO, se encuentran, aún, en un margen bastante confiable. Entre las variantes de la PCR se encuentran la PCR múltiple (que permite bajar el costo del procedimiento), la PCR nidada (que aumenta la confiabilidad de la prueba) y la RT-PCR cuantitativa (que permite conocer la cuenta tumoral en el paciente). Entre los genes más utilizados para la detección de EMR mediante PCR se encuentran: *TCR*, *IgH*, *bcr-abl*, *tel-aml1*, *wt1*, *e2a-pbx1* y *all1-af4* para LLA; *mll*, *aml1-eto* y *wt1* para LMA; *pml-rar* para LMA-M3; *IgH* para LLC y *bcr-abl* para LMC.

El uso de estas tecnologías permitirá dar un mejor seguimiento a los pacientes, evitándose el riesgo de tratamientos deficientes o exagerados. Adicionalmente, la búsqueda de células leucémicas residuales en algunos tejidos, por ejemplo en biopsias de testículo o en líquido cefalorraquídeo, se puede llevar a cabo, aunque su utilidad está todavía por definirse.

### Células Seminales Hematopoyéticas: Nuevas Perspectivas

La identificación, purificación, cultivo *in vitro* y manipulación genética de las células seminales del sistema hematopoyético (CSH), han permitido el desarrollo de nuevas estrategias en el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas. En particular, el trasplante de células hematopoyéticas - ya sea de médula ósea (MO), sangre periférica movilizada (SPm) o sangre de cordón umbilical (SCU)- se ha visto directamente beneficiado con los avances en esta área. Durante los últimos cinco años, tres líneas particulares de investigación han alcanzado resultados sorprendentes. Por un lado, la expansión *in vitro* de CSH; por otra parte, la manipulación genética de dichas células y, finalmente, el estudio del potencial "real" de diferenciación celular de las CSH de adultos.

La proliferación y expansión de CSH son procesos totalmente dependientes de un grupo variado de citocinas estimuladoras de la hematopoyesis. Por varios años, lograr la "verdadera" expansión de

estas células in vitro fue prácticamente imposible, debido a que las combinaciones de citocinas empleadas, si bien favorecían la proliferación de CSH, inducían al mismo tiempo su diferenciación. En años recientes, el uso de citocinas como el ligando de FLK-2/FLT-3, el factor *steely* y la trombopoyetina, han permitido la expansión de CSH en cultivos líquidos a largo plazo. Estas observaciones son de gran relevancia, pues plantean la posibilidad de incrementar, en forma absoluta, los números de CSH en el laboratorio. Lo anterior, evidentemente, tendrá una repercusión directa en el establecimiento de bancos de células hematopoyéticas con fines terapéuticos. Estudios reportados durante el último año, han demostrado que dichas CSH expandidas en el laboratorio pueden ser empleadas en protocolos de trasplante de células hematopoyéticas y que son capaces de contribuir a la reconstitución del sistema hematopoyético de los sujetos trasplantados.

La manipulación genética de CSH se ha venido desarrollando a nivel experimental desde hace varios años. Sin embargo, solo recientemente se ha incorporado este procedimiento en protocolos clínicos. Dos grupos de investigación, uno en Los Angeles, California, E.U.A. y el otro en París, Francia, han reportado el uso de CSH, manipuladas genéticamente, en el tratamiento de pacientes pediátricos con inmunodeficiencia grave combinada (SCID) y su variante SCID-X1. Estas patologías son debidas a la presencia de genes defectuosos, que codifican para las proteínas ADA y c, respectivamente. Los autores de estos estudios, purificaron células CD34+ de dichos pacientes (a partir de MO o SCU) y les incorporaron copias normales de los genes mencionados. Posteriormente, las células modificadas fueron reintroducidas en los pacientes por vía intravenosa. Ambos estudios mostraron resultados muy alentadores, observándose una franca recuperación hematológica en todos los sujetos tratados. Así pues, estos estudios claramente demuestran la factibilidad de emplear CSH, modificadas genéticamente, en protocolos clínicos.

Desde el punto de vista tradicional, cuando se habla de las CSH se piensa en aquellas que, además de poder autorrenovarse, son pluripotenciales, aunque dicha pluripotencialidad está restringida al sistema hematopoyético. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que esto último no es totalmente cierto. Durante el último año, distintos grupos de investigación han reportado que CSH purificadas a

partir de MO de ratón pueden dar origen a células del sistema nervioso central (SNC) y viceversa, células seminales del SNC pueden producir células hematopoyéticas. Algo semejante ha sido observado en estudios con una población celular de músculo de ratón. Lo anterior indica que la plasticidad de las CSH de sujetos adultos es mucho mayor de lo que previamente se tenía contemplado. Queda todavía por definirse si dichas propiedades de las CSH de ratón están presentes en su contraparte humana. De ser así, la repercusión clínica de estos hallazgos podrá ser, a largo plazo, de gran relevancia.

## Referencias

1. **Beck W, Dalton W.** Mechanisms of drug resistance. En: De Vita VJ, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5ª ed. p. 498-512. Lippincott-Raven, Filadelfia, EUA.
2. **Beck W.** The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem Pharmacol* 36: 2879-2887, 1987.
3. **Shustik C, Dalton W, Gros P.** P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells: Biochemistry, clinical relevance and modulation. *Mol Aspects Med* 16: 1-78, 1995.
4. **Dalton W.** Mechanisms of drug resistance in hematologic malignancies. *Seminars in Hematology*. 34 (suppl 5): 3-8, 1997.
5. **Brisco M, Sykes PJ, Hughes E, et al.** Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 99: 314-319, 1997.
6. **Drobysky WR, Eidean DJ, Klein JP, et al.** Detection of bcr-abl RNA transcripts using the polymerase chain reaction in highly predictive for relapse in patients transplanted with unrelated marrow grafts for chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 98: 458-466, 1997.
7. **Gallo JH, Robson LG, Watson NW, et al.** Comparison of metaphase and interphase FISH monitoring of minimal residual disease with MLL gene probe: A case study of AML with t(9; 11). *Ann Genet* 42: 109-112, 1999.
8. **Lamb LS, Robbins NF, Abhyankar S, et al.** Flow cytometric cell sorting combined with molecular chimerism analysis to detect minimal recurrent leukemia: good news and bad news. *Bone Marrow Transplant* 19: 1157-1161, 1997.
9. **Kohn D, Weinberg KI, Nolte J, et al.** Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1: 1017-1023, 1995.
10. **Eglitis MA, Mezey E.** Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci, USA* 94: 4080-4085, 1997.
11. **Mayani H, Lansdorp PM.** Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 16: 153-165, 1998.
12. **Moore MAS.** Clinical applications of stem cell research in neurobiology and hematology. *New Engl J Med* 341: 605-607, 1999.