

Nuevos conceptos en la biología de la leucemia mieloide aguda

Juan José Montesinos,* Héctor Mayani*

Recepción versión modificada 03 de agosto del 2001; aceptación 12 de octubre del 2001

Resumen

Durante los últimos 20 años, diversos conceptos acerca de la biología de la leucemia mieloide aguda (LMA) han cambiado en forma sustancial. Lo anterior se debe, en gran medida, a avances significativos en la identificación, purificación y caracterización de las células hematopoyéticas primitivas -incluyendo a las células seminales y progenitoras- en las que se origina esta enfermedad. En el presente artículo, presentamos un panorama actual acerca de estos nuevos conceptos y su relevancia en el tratamiento de la LMA.

Palabras clave: *Biología celular, células seminales, hematopoyesis, leucemia mieloide, progenitores.*

Summary

During the last 20 years, several concepts regarding the biology of acute myeloid leukemia (AML) have changed in a profound manner. This has been mainly due to significant advances in the identification, purification and characterization of the primitive hematopoietic cells -including stem and progenitor cells- in which this disorder originates. In the present review article, we discuss some of these new concepts and their relevance in the treatment of AML.

Key words: *Cell biology, stem cell, hematopoiesis, myeloid leukemia, progenitors.*

Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica que se caracteriza por un incremento en el número de células mieloides en la médula ósea, acompañado de un bloqueo en su maduración, lo que ocasiona la acumulación excesiva de blastos. De hecho, la presencia de >30% de blastos en médula ósea es un criterio necesario para el diagnóstico definitivo de esta enfermedad. Frecuentemente los pacientes con LMA presentan insuficiencia hematopoyética (granulocitopenia, trombocitopenia o anemia), con o sin leucocitosis.¹

Durante las últimas décadas, la incidencia de LMA se ha incrementado considerablemente en los países desarrollados y en algunos países en vías de desarrollo. En los Estados Unidos, por

ejemplo, la incidencia anual de esta patología es de 2.4 casos por 10⁵ habitantes y dicha incidencia se incrementa progresivamente con la edad, de tal suerte que en adultos mayores de 65 años es de 12.6 casos por 10⁵ habitantes.² En México los datos son escasos, sin embargo, existen evidencias de que el número de pacientes con esta enfermedad se ha incrementado en forma significativa. Tan sólo en 1998, se reportaron más de 600 casos nuevos.³

La LMA es una enfermedad fatal. En los años 70 la sobrevivida a 5 años en este tipo de pacientes era del 15%. Actualmente, y gracias a los avances en su diagnóstico y tratamiento, el periodo de sobrevivida a 5 años se ha incrementado significativamente, sin embargo continúa siendo bajo (apenas del 40%).

* Laboratorio de Hematopoyesis, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Héctor Mayani, Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores México, D.F. 06720 Tel. 5627 6959; Fax 5761 0952 e-mail.: hmayaniv@conacyt.mx

Clínicamente, la LMA es una enfermedad heterogénea que comprende una gran variedad de subtipos⁴ (Cuadro I). Lo anterior es, sin duda, resultado de la extraordinaria complejidad en su biología. Sabemos que se trata de un trastorno clonal, originado por la transformación de una célula hematopoyética inmadura. El inicio y la progresión de dicha transformación involucran una serie de cambios moleculares y celulares, que traen consigo alteraciones a distintos niveles del sistema hematopoyético, dando como resultado un cuadro patológico complejo y severo.

Durante los últimos años, y como resultado de estudios experimentales más completos, tanto a nivel celular como molecular, varios conceptos relacionados con la biología de la LMA han cambiado en forma significativa. De hecho, la visión global que actualmente se tiene sobre esta enfermedad es distinta a la que se tenía hace un par de décadas. En el presente artículo, pretendemos revisar y discutir algunos de esos conceptos, poniendo especial énfasis en aquellos enfocados a la biología de las células hematopoyéticas primitivas.

Principios básicos de la hematopoyesis

Todas las células presentes en la sangre se derivan de una pequeña población de células seminales hematopoyéticas, las cuales se localizan en la médula ósea (MO). Las células seminales originan células progenitoras que proliferan y maduran hacia los diferentes linajes sanguíneos, mediante un proceso denominado hematopoyesis. Debido a que las células maduras presentes en sangre periférica tienen una vida limitada, es necesaria su constante producción y para ello el sistema hematopoyético es capaz de regular, mediante mecanismos muy complejos, los procesos de expansión, comprometimiento, proliferación y sobrevivencia de las células Hematopoyéticas.⁵

La médula ósea es el órgano en el que tiene lugar la hematopoyesis.⁶ Para que se lleve a cabo la hematopoyesis, la médula ósea cuenta con una red de células estromales (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos) y células accesorias (monocitos y linfocitos), además de citocinas y proteínas de matriz extracelular produ-

cidas por dichos componentes celulares. En conjunto estos elementos conforman lo que se denomina como microambiente hematopoyético, en el cual las células hematopoyéticas son capaces de proliferar y diferenciarse hacia los distintos linajes sanguíneos, mediante el contacto directo con las células estromales o por influencia de las citocinas presentes en dicho microambiente.⁷ Dentro de las citocinas producidas por las células del microambiente, existen algunas que actúan predominantemente como estimuladoras de la hematopoyesis; otras, en cambio, actúan como inhibidores. En condiciones normales, existe un balance entre las citocinas estimuladoras e inhibidoras, lo que da como resultado la producción controlada de células sanguíneas.

Las células que forman el sistema hematopoyético se pueden agrupar en cuatro compartimientos: El primero de ellos corresponde a las células seminales (CSH), con capacidad de autorrenovación y de dar origen a todas las células de la sangre durante la vida del individuo;^{8,9} éstas constituyen el 0.005% del total de células en la médula ósea. El segundo compartimiento corresponde a las células progenitoras (CPH), incapaces de autorrenovarse y con características de pluripotencialidad, bipotencialidad y monopotencialidad;¹⁰ en conjunto, las CPH constituyen el 0.15% de las células de la médula ósea. El tercer compartimiento comprende a las células precursoras reconocibles por su morfología y que corresponden a >99.5% de las células presentes en la médula ósea. Finalmente, las células maduras circulantes (cuarto compartimiento), que representan el último estadio de diferenciación de los elementos hematopoyéticos. Este modelo de clasificación indica que existe una jerarquía hematopoyética, en donde las células seminales son los elementos más primitivos que dan lugar a la formación de todos los constituyentes del sistema hematopoyético.

Tanto las CSH como las CPH tienen una morfología linfoblastoide, por lo que no es posible distinguirlas a través de microscopía de luz. Sin embargo, su identificación, purificación y caracterización han sido posibles mediante estudios inmunofenotípicos y funcionales. Ambas poblaciones celulares expresan el antígeno CD34, una glicoproteína transmembranal que participa en los mecanismos de adhesión celular.¹¹ Las CSH, ade-

más, expresan el antígeno CD90 (Thy-1) y carecen de la expresión de otras moléculas, tales como CD38, CD45RA y CD71.¹² Conforme las CSH se diferencian y dan lugar a la formación de las CPH, adquieren la expresión de moléculas como CD38, CD45RA, CD71 y otras más, pertenecientes a linajes específicos (por ejemplo, CD4 y CD8, en linfocitos T; CD19 y CD20 en linfocitos B; CD15 y CD33 en células mieloides; CD41 y CD42 en megacariocitos).¹³

Existen, actualmente, diversos métodos funcionales para la identificación y cuantificación de las CSH. Entre éstos, destaca el sistema *in vivo* que identifica a las células con la capacidad de reconstituir, en su totalidad y a largo plazo, el sistema hematopoyético de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID, por sus siglas en inglés).¹⁴ Este modelo consiste en la radiación subletal de ratones SCID y la inyección intravenosa de las células hematopoyéticas humanas, dentro de las que se encuentran las células seminales y progenitoras. Generalmente se requiere de la administración de factores de crecimiento hematopoyéticos humanos, como el GM-CSF y la interleucina-3 (IL-3), entre otros, para el óptimo desarrollo de las células humanas en el microambiente medular del ratón.¹⁵ Las células con la capacidad de reconstituir la hematopoyesis reciben el nombre de células repobladoras de ratones SCID (SRC, por sus siglas en inglés) y representan, en la actualidad, la mayor aproximación a las CSH de entre los distintos tipos celulares hematopoyéticos caracterizados (Figura 1).

Por otra parte, se han identificado células que inician y mantienen la hematopoyesis *in vitro* a largo plazo, al ser cultivadas en presencia de capas adherentes de fibroblastos que funcionan como soporte de crecimiento. A estas células se les denomina células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC, por sus siglas en inglés), y se caracterizan por su capacidad para generar CPH por periodos superiores a las 5 semanas de cultivo.¹⁶ Estudios realizados en ratones SCID, han demostrado que después de 4 semanas de ser trasplantadas las SRC, se detecta la aparición de las LTC-IC, debido a ello se ha determinado que estas últimas son células menos primitivas que las SRC (Figura 1).^{15,17}

En cuanto a las CPH, su identificación y cuantificación son realizadas por medio de métodos más sencillos; básicamente, a través de su capacidad para formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos (metilcelulosa o agar), de ahí que sean conocidas como células formadoras de colonias (CFC).¹⁸

Origen clonal de la LMA

Es bien sabido que la LMA es una enfermedad que se origina como resultado de la expansión clonal de una sola célula hematopoyética inmadura,

Cuadro I. Clasificación de la LMA según el grupo FAB*

M0	Leucemia indiferenciada >90% de blastos Mieloperoxidasa citoplásmica positiva, CD13/33 positivo
M1	Mieloblástica sin maduración >90% de blastos >3% positivas para mieloperoxidasa o Sudan negro 10% de granulocitos o monocitos en proceso de maduración
M2	Mieloblástica con maduración 30-90% de blastos >10% de células granulocíticas <20% de células monocíticas
M3	Promielocítica Promielocitos anormales con granulación densa Presencia de bastones de Auer
M4	Mielomonocítica >30% de blastos >20% pero <80% de células monocíticas
M4eo	Mielomonocítica Eosinófilos anormales positivos para cloroacetato y PAS >5% de eosinófilos
M5a	Monoblástica >80% de monoblastos <20% de células granulocíticas
M5b	Monoblástica/ promonocítica <80% de monoblastos <20% de células granulocíticas
M6	Eritroleucemia >50% de células eritrocíticas 30% de blastos no eritroides granulares o agranulares
M7	Megacarioblástica >30% de megacarioblastos

* Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico⁴

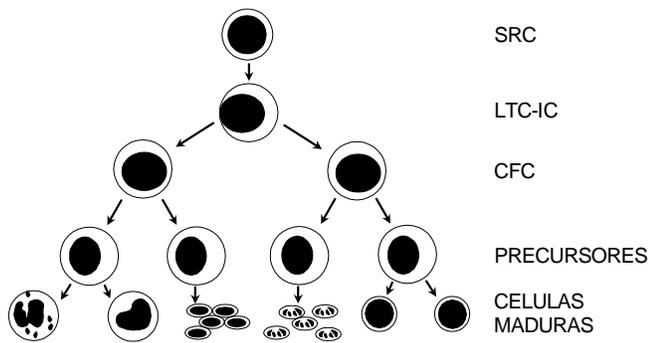


Figura 1. Esquema de los compartimentos en la hematopoyesis normal. El sistema hematopoyético está constituido por 4 compartimentos: (i) células seminales; (ii) células progenitoras; (iii) células precursoras y (iv) células maduras. Tanto las SRC (células repobladoras de ratones SCID), como las LTC-IC (células iniciadoras de cultivos a largo plazo) están comprendidas dentro del compartimiento de las células seminales hematopoyéticas. Las CFC (células formadoras de colonias en cultivo) corresponden al compartimiento de las células progenitoras.

la cual ha sufrido una transformación molecular (alteraciones en la expresión de ciertos genes). Sin embargo, existe controversia acerca de la identidad de la(s) célula(s) en la(s) que dicha transformación ocurre.

Un primer modelo propuesto a este respecto, y que por mucho tiempo fue considerado como la visión general sobre el origen de la LMA, es que ésta puede surgir en distintas poblaciones de células hematopoyéticas.^{19,20} El estadio de maduración y el grado de compromiso de dichas poblaciones hacia un linaje específico, es lo que determina que la patología tenga manifestaciones particulares y que clínicamente sea clasificada dentro de alguna de las 8 categorías descritas (M0 - M7). Por ejemplo, de acuerdo a este modelo, la LMA M1 se originaría en una población celular más primitiva que la LMA M3. Igualmente, siguiendo este modelo, la LMA M5 se originaría en un progenitor monocítico, mientras que la LMA M6 en un progenitor eritroide (Figura 2).

Un segundo modelo ha sido propuesto más recientemente, el cual plantea la posibilidad de que, en todos los casos (M0 - M7), la LMA se origina en una misma población de células hematopoyéticas primitivas, con el inmunofenotipo CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻;^{21,22} sin embargo, dependiendo de la naturaleza de las alteraciones genéticas que se presenten, la clona leucémica seguirá un cierto patrón de comportamiento biológico y éste, a su vez, determinará

sus características clínicas (Figura 3). La mayoría de los estudios reportados en los últimos 5 años, en los que se ha trabajado con subpoblaciones celulares enriquecidas, apoyan este segundo modelo, es decir, que en todos los casos de LMA, la enfermedad tiene su origen en la población de células CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻.²³

Es importante mencionar, sin embargo, que existe (al menos) una excepción a este último modelo: La LMA M3 (Leucemia Promielocítica; LPM). Este tipo de leucemia está caracterizada por la expresión del gene quimérico PML-RAR α , una proteína quimérica producto de la t,(15,17) que actúa como represor transcripcional. En un estudio realizado por Turhan y colaboradores,²⁴ se observó que las células CD34⁺ CD38⁻ (que incluyen a las células seminales y a los progenitores más inmaduros) de pacientes con LPM no expresaban el gene quimérico, mientras que la población de progenitores hematopoyéticos intermedios y maduros CD34⁺ CD38⁺ sí lo expresaba, lo que apoya la idea de que en este tipo particular de LMA, la leucemia se origina en una subpoblación de progenitores hematopoyéticos comprometidos a un linaje específico y con cierto grado de maduración.

Jerarquía hematopoyética en la LMA

Algunos estudios de proliferación celular basados en la incorporación de ³H-timidina, demostraron que, contrario a lo que se pensaba, en la población

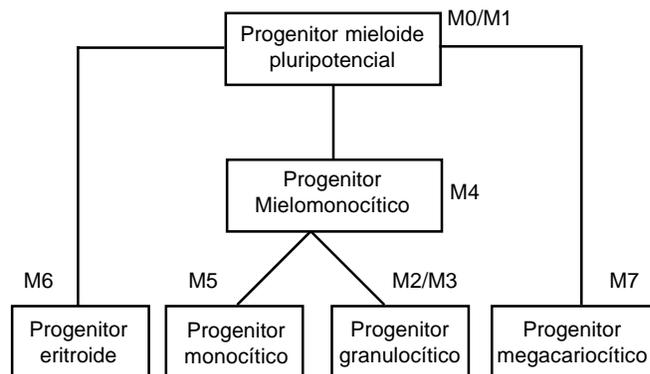


Figura 2. Modelo clásico del origen de la LMA. La célula en donde ocurre la transformación que origina la LMA puede localizarse dentro de diferentes poblaciones celulares (con distinto estado de diferenciación y perteneciente a distintos linajes). Dependiendo de dicha población, será el subtipo de LMA que se origine (M0-M7).

de células leucémicas solamente una pequeña fracción de ellas se encuentra sintetizando ADN de manera activa *in vivo*.²⁵ Estudios posteriores comprobaron que dicha fracción podía ser identificada mediante ensayo de colonias²⁶ y que la población de células leucémicas es biológicamente heterogénea a pesar de su homogeneidad morfológica.¹⁹

Los experimentos en cultivos semisólidos han establecido que 0.1 a 1 % de los blastos de LMA son capaces de formar colonias *in vitro* y por lo tanto se pueden considerar como células progenitoras dentro de la población de células transformadas.¹⁹ Es importante destacar que dichos progenitores leucémicos son incapaces de mantener niveles elevados en cultivos tipo Dexter (en presencia de estroma medular desarrollado *in vitro*).^{27,28} El análisis inmunofenotípico confirmó que los blastos incapaces de formar colonias presentan marcadores de mayor diferenciación que las células formadoras de colonias *in vitro*.²⁹ Con estos resultados se demostró que, al igual que en la hematopoyesis normal, la mayoría de las células leucémicas se originan de una pequeña población de progenitores (UFC-LMA) con una elevada actividad proliferativa (Figura 4).

Dado que para la detección de progenitores hematopoyéticos primitivos de médula ósea normal se utilizaron periodos prolongados de cultivo en presencia de una capa de estroma, este mismo sistema de cultivo se aplicó para identificar células capaces de mantener la leucemia *in vitro* a largo plazo. Sin embargo, como veremos más adelante, este sistema no favorece el crecimiento de las células leucémicas, por lo que se buscó el establecimiento de un sistema experimental que sí lo permitiera. El sistema en cuestión consistió en un cultivo líquido en presencia de una combinación de citocinas recombinantes. De esta manera, fue posible identificar una subpoblación de células progenitoras leucémicas, presentes en muy baja frecuencia y con un alto potencial proliferativo (células iniciadoras de cultivos en suspensión; SC-IC por sus siglas en inglés) que dan lugar a la formación de UFC-LMA.³⁰ Estas células expresan el antígeno CD34, pero no expresan los antígenos CD45RA, CD71 y CD90.³¹ Mediante análisis de dilución limitante se estableció que la frecuencia de estas células es de 10 a 300 veces más baja que las UFC-LMA.

Estudios *in vivo*, empleando ratones SCID, demostraron que el trasplante de la subpoblación de células CD34⁺ CD38⁻, obtenidas de la médula ósea de pacientes con LMA, fue suficiente para el desarrollo de la leucemia en dichos animales, dado que estas células son capaces de dirigirse a la médula ósea y proliferar en respuesta al tratamiento con citocinas, dando por resultado un patrón de diseminación y morfología celular leucémica, muy similar a la observada en los pacientes.³² Las células capaces de originar la hematopoyesis leucémica en este modelo han sido denominadas como células iniciadoras de la leucemia en ratones SCID (SL-IC, por sus siglas en inglés). El análisis de dilución limitante demostró que la frecuencia de estas células en la sangre periférica de los pacientes con LMA, es 1,000 veces menor que las UFC-LMA, detectándose una célula por cada 250,000 células de médula ósea. Es importante señalar que en este mismo estudio se encontró que el trasplante de una subpoblación más madura (CD34⁺ CD38⁺), la cual contenía la mayoría de las UFC-LMA, no desarrolló leucemia.

Tomando en consideración todas las evidencias anteriores, se ha propuesto que, al igual que en la hematopoyesis normal, el sistema hematopoyético de pacientes con LMA está organizado en forma jerárquica. Es decir, las células leucémicas terminales (blastos) provienen de una subpoblación de células progenitoras (UFC-LMA), cuyo inmunofenotipo es CD34⁺ CD38⁺. Éstas, a su vez, provienen de una subpoblación todavía más pequeña, constituida por células CD34⁺ CD38⁻, las cuales incluyen células capaces de iniciar la hematopoyesis leucémica tanto *in vitro* (SC-IC) como *in vivo* (SL-IC).

Es importante destacar que el estudio de la subpoblación de células CD34⁺ CD38⁻ de pacientes con LMA ha permitido entender aspectos fundamentales acerca de la biología de esta enfermedad. Por ejemplo, un reporte reciente de Costello y colaboradores³³ ha demostrado que estas células poseen una sensibilidad reducida a los efectos de la daunorubicina, uno de los compuestos quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de la LMA. Además, expresan niveles elevados de los genes *mrp* y *lrp*, involucrados en la resistencia a diversos fármacos. Por otra parte, dicha subpoblación celular expresa bajos niveles

del receptor Fas, por lo que es poco propensa a la apoptosis inducida por el ligando de Fas. Estos autores también observaron que estas células tienen una inmunogenicidad reducida, lo que podría explicar que el sistema inmune no sea capaz de reconocerlas y eliminarlas en forma eficiente.

Una proporción significativa de estas células se encuentra generalmente en la fase G₀ del ciclo celular.²³ Esto también explicaría el que sea altamente resistente a drogas antineoplásicas, cuyo mecanismo de acción se centra en la inhibición de la división celular.

Finalmente, es interesante señalar que, al menos al nivel de las UFC-LMA, no se ha logrado demostrar que éstas posean una tasa de proliferación superior a la observada en células hematopoyéticas normales.¹⁹ Lo anterior parece indicar que la acumulación de blastos en la médula ósea de estos pacientes se debe, principalmente, a un bloqueo en los mecanismos de apoptosis, lo que concuerda con el estudio de Costello.³³

Diferencias inmunofenotípicas entre progenitores normales y leucémicos

Como se describió anteriormente, tanto en la hematopoyesis normal como en la leucémica (LMA), las células más primitivas expresan el antígeno CD34 y carecen de la expresión del antígeno CD38, así como de antígenos específicos de linaje. Existen, sin embargo, diferencias muy claras en cuanto a la expresión de ciertas moléculas, las cuales podrían servir para identificar y distinguir entre las células seminales y progenitoras normales y su contraparte leucémica.

El antígeno CD90 (Thy-1) es una proteína expresada en ciertas poblaciones de linfocitos, así como en una subpoblación de células CD34⁺, la cual incluye a las células hematopoyéticas más primitivas (SRC y LTC-IC).³⁴ Por otra parte, el antígeno CD117 (c-kit), es un receptor expresado en diversos tejidos, incluyendo el hematopoyético. Dentro de éste, es expresado principalmente por células seminales y progenitoras primitivas. Su ligando es el Factor de Células Seminales, o Factor Steel, el cual promueve la viabilidad celular (inhibiendo la apoptosis) y contribuye a la estimulación de la proliferación de progenitores hematopoyéticos.³⁵

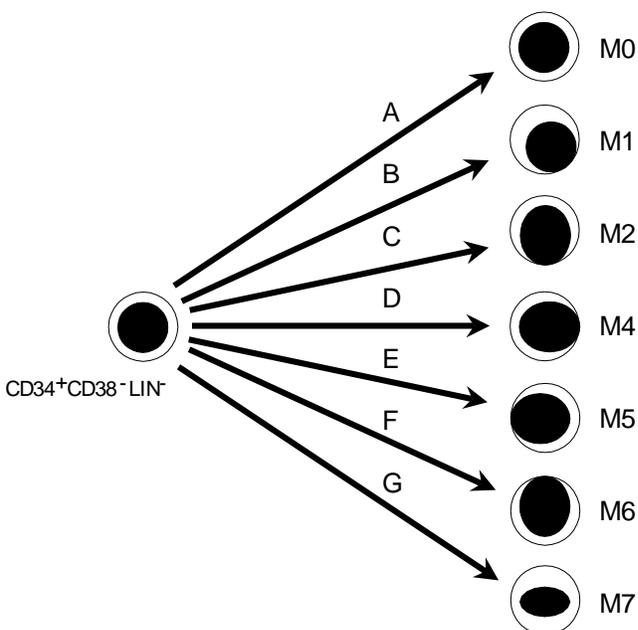


Figura 3. Modelo actual del origen de la LMA. En todos los casos de LMA, la transformación neoplásica ocurre en la población de células seminales (CD34+ CD38- LIN-); sin embargo, dependiendo del tipo de alteraciones moleculares que se presenten (A - G), será el subtipo de LMA que se desarrolle. La única excepción que parece existir es la leucemia promielocítica (LMA-M3), en la que la transformación parece ocurrir en células progenitoras granulocíticas y no en células seminales.

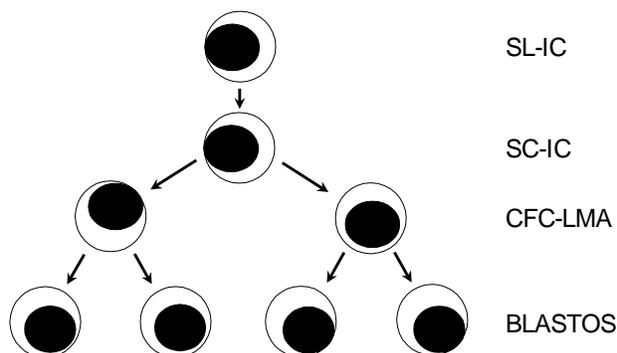


Figura 4. Esquema de los compartimentos en la hematopoyesis leucémica. Al igual que en la hematopoyesis normal, el sistema hematopoyético de pacientes con LMA está constituido por diferentes compartimentos. SL-IC, células iniciadoras de la leucemia en ratones SCID; SC-IC, células iniciadoras de la leucemia en cultivos en suspensión; CFC-LMA, células formadoras de colonias en cultivo de LMA. En esta patología, las células terminales corresponden a blastos y no a células maduras.

Estudios recientes han demostrado que, a diferencia de las CSH y CPH de sujetos sanos, ambos antígenos están ausentes en las CSH y CPH de pacientes con LMA.^{31,36} La posible relevancia clínica de estos hallazgos es evidente, pues se ha demostrado claramente que en pacientes con LMA permanece una subpoblación de CSH normales.

Estudios encaminados a la detección de estas proteínas en muestras de médula ósea o sangre periférica de pacientes con LMA, permitirían la identificación y separación (¿purga?) de ambas poblaciones celulares.

Patrones de crecimiento en cultivos tipo Dexter

De los diferentes sistemas experimentales *in vitro* que se han establecido para el cultivo de células hematopoyéticas, el sistema tipo Dexter es el que más similitudes presenta con respecto a las condiciones *in vivo*. Este sistema se basa en el desarrollo de una capa de células adherentes, constituida por diferentes poblaciones de células estromales (fibroblastos, macrófagos, adipocitos y células endoteliales), las cuales proporcionan las condiciones necesarias para la proliferación y diferenciación a largo plazo (>12 semanas) de las células hematopoyéticas primitivas.³⁷ Las células estromales producen una gran variedad de citocinas, tanto estimuladoras como inhibitoras de la hematopoyesis, así como moléculas de la matriz extracelular, de tal suerte que el microambiente hematopoyético creado *in vitro* semeja en gran medida al existente *in vivo*.³⁸

Cuando células de médula ósea de pacientes con LMA son cultivadas en este sistema, ocurre un hecho muy interesante. Los progenitores leucémicos -identificados por la morfología de las colonias desarrolladas en cultivos semisólidos y por marcadores moleculares- son eliminados en forma espontánea, mientras que los progenitores normales -identificados de acuerdo a los criterios mencionados- permanecen en cultivo por periodos más largos.^{27,28} Estas observaciones evidentemente indican que el comportamiento de las células leucémicas *in vitro* es totalmente distinto al observado *in vivo*, en donde existe un amplio predominio de la clona neoplásica. Hasta el momento, no está claro a qué se debe la "desaparición" de las células leucémicas en cultivo. Por un lado, es posible que el sistema tipo Dexter carezca de algún factor o factores, que sea(n) necesarios para el desarrollo de las células neoplásicas; por otro lado, pudiera ser que en este sistema se esté produciendo alguna molécula que inhiba en forma selectiva a dichas células.

Aun cuando no se conoce con exactitud la razón de dicho comportamiento, el hecho de que en este sistema de cultivo se logre la eliminación selectiva de células leucémicas, sin alterar -al menos en forma aparente- a las células normales, ha llevado a diferentes grupos de investigación a aplicar este sistema en la clínica. En efecto, el propio grupo de Michael Dexter, en Manchester, Inglaterra, ha llevado a cabo más de 30 trasplantes autólogos de médula ósea, en pacientes con LMA, empleando este sistema de cultivo como método de purga de células leucémicas.³⁹ Los resultados reportados han sido bastante favorables, aun cuando la metodología inherente al sistema lo hace poco práctico para su aplicación en forma más amplia y rutinaria.

Expresión del antígeno CD34 en la LMA

Si bien es cierto que, en condiciones normales, todas las células hematopoyéticas progenitoras y seminales expresan el antígeno CD34, no todas las células CD34⁺ son progenitoras o seminales. En médula ósea, las células CD34⁺ corresponden al 1-3% del total. De ellas, sólo un 10 - 15% es capaz de formar colonias *in vitro* y menos del 1% corresponde a SRC. En la LMA, esta relación es muy heterogénea y bastante confusa. Por un lado, hay pacientes en los que no es posible detectar células CD34⁺, mientras que en otros, la proporción de estas células sobrepasa el 50%.⁴⁰ En ninguno de estos casos, sin embargo, existe una correlación con la presencia de UFC-LMA, SC-IC o SL-IC.

Es interesante que algunos estudios llevados a cabo en los últimos 5 años han demostrado, que a diferencia del inmunofenotipo descrito para las células iniciadoras de leucemia (CD34⁺ CD38⁻), una pequeña proporción de células incluida en la subpoblación CD34⁻ linaje-negativa (lin⁻) es capaz de reconstituir la hematopoyesis leucémica en ratones SCID.⁴¹ Con ello se identificó a una subpoblación de características muy primitivas en LMA, que confirma el concepto de jerarquía hematopoyética y que hace aún más compleja la descripción inmunofenotípica de las células seminales en esta enfermedad.

A este respecto, es importante hacer notar que el grupo de Dick en Toronto, reportó que en médula ósea de sujetos sanos también existe una pobla-

ción de células CD34⁻ lin⁻ capaz de reconstituir el sistema hematopoyético en ratones SCID y que esta población (CD34-SRC) es incluso más inmadura que las células CD34⁺, encontrando así una nueva clase de células hematopoyéticas.⁴² La detección de esta subpoblación permite suponer que la célula con este inmunofenotipo presenta la transformación que origina la LMA, lo cual apoya el trabajo que reporta la identificación de células capaces de repoblar ratones SCID y que no expresan el antígeno CD34.

Conclusiones y perspectivas

Si bien es cierto que la biología de la LMA es extremadamente compleja, los avances logrados en los últimos años en cuanto a la identificación y purificación de las CSH y CPH, así como el desarrollo de métodos experimentales para el estudio de éstas, nos han permitido ampliar y profundizar nuestro conocimiento en este campo. Contrario a lo que se pensó por mucho tiempo, parece ser que en la gran mayoría de los casos, la LMA se origina en una misma población celular, caracterizada por la expresión del antígeno CD34 y la falta de expresión del antígeno CD38 (células CD34⁺ CD38⁻). Esta población, altamente resistente a la acción de fármacos antineoplásicos, parece ser la responsable de mantener la hematopoyesis leucémica en forma continua (hasta la curación o la muerte del individuo) y de desarrollar la enfermedad mínima residual en aquellos pacientes que presentan recaída después de tratamiento. Una excepción a este modelo es la LPM (LMA M3), en la que la transformación neoplásica parece ocurrir al nivel de progenitores hematopoyéticos con mayor grado de maduración y comprometidos a un linaje particular.

Hay que señalar, sin embargo, que la población de células CD34⁺ CD38⁻ es heterogénea, comprendiendo varias subpoblaciones que pueden ser distinguidas por su inmunofenotipo y algunas propiedades funcionales. La identificación precisa de la subpoblación celular en la que se inicia la leucemia permitirá descifrar los detalles moleculares que llevan a una CSH normal a convertirse en una célula maligna. Esto, eviden-

temente, ayudará al desarrollo de estrategias terapéuticas más eficientes (por ejemplo, el diseño de fármacos y anticuerpos monoclonales dirigidos en forma específica para inhibir la expansión clonal de dichas células).

Es interesante el que dentro de la población celular CD34⁺ CD38⁻ se encuentren células normales residuales, las cuales son capaces de restaurar la hematopoyesis normal en cultivos tipo Dexter. Este hecho ha sido ya aplicado para diseñar estrategias terapéuticas (basadas en diferencias inmunofenotípicas -expresión de CD90 y CD117- y funcionales -crecimiento en cultivos *in vitro*) que permitan distinguir y separar ambos tipos celulares. El reto actual radica en hacer más eficiente y práctico este sistema, para que su aplicación sea más amplia.

Al igual que en la hematopoyesis normal, se ha demostrado que en LMA existe también una jerarquía de células hematopoyéticas. Dichas células definen subpoblaciones con características fenotípicas particulares, que se pueden detectar y cuantificar tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque se han identificado estas subpoblaciones de células leucémicas, aún se desconocen muchas de sus características biológicas, lo cual es de suma importancia no sólo a nivel básico sino también clínico.

Finalmente, es importante señalar que para poder entender -en una forma integral- la biología de la LMA, es necesario el estudio de las alteraciones moleculares que ocurren en las CSH. Trabajos recientes indican que las alteraciones más comunes son las translocaciones cromosómicas balanceadas, que resultan en la producción de proteínas quiméricas.⁴³⁻⁴⁵ Estas proteínas constituyen, generalmente, factores reguladores de la transcripción de genes específicos, fundamentales en la regulación de la proliferación, diferenciación y muerte celular.⁴⁶

No menos importante es el estudio de la composición y la integridad funcional del microambiente hematopoyético en LMA. Existen fuertes evidencias de alteraciones cualitativas y cuantitativas en dicho microambiente, las cuales, si bien no son la causa de la enfermedad, sí parecen estar involucradas en el desarrollo de la clona maligna y en la inhibición de la hematopoyesis normal.⁴⁷

Agradecimientos

La investigación que se realiza en el laboratorio del Dr. Mayani acerca de la LMA es apoyada por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), a través del Fondo para el Fomento de la Investigación, y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Referencias

- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A.** Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:1051-1062.
- Kosary CL, Ries LAG, Miller BA, Hankey BF, Edwards BK, eds.** SEER cancer statistics review, 1973-1992: tables and graphs. Bethesda, Md.: National Cancer Institute, 1995. (NIH publication no. 96-2789).
- Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. 1998.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C.** Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620-625.
- Till JE, McCulloch EA.** Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochem Biophys Acta* 1980;605:431-459.
- Trentin J.** Hemopoietic microenvironments. In: Tavassoli M (ed). *Handbook of the Hemopoietic Microenvironment*. Humana press: Clifone, PP 1-86, 1989.
- Nicola NA.** Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem* 1989;58:45-77.
- McCulloch EA.** Stem cell renewal and determination during clonal expansion in normal and leukemic hemopoiesis. *Cell Prolif* 1993;26:399-425.
- Berardi A, Wang A, Levine J, Lopez P, Scadden D.** Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 1995;267:104-108.
- Ogawa M, Porter P, Nakahata T.** Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells: an interpretative review. *Blood* 1983;61:823-829.
- Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T.** The stem cell antigen CD34 functions as regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12240-12244.
- Mayani H, Lansdorp P.** Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994;83:2410-2417.
- Terstappen LWMM, Huang S, Safford M, Lansdorp P, Loken MR.** Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 1991;77:1218-1227.
- Kamel-Reid S, Dick JE.** Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 1988;242:1706-1709.
- Dick JE.** Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Semin Immunol* 1996;8:197-206.
- Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ.** Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3584-3588.
- Cashman JD, Lapidot T, Wang JC, Doedens M, Shultz LD, Lansdorp P, Dick JE, Eaves CJ.** Kinetics evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice. *Blood* 1997;89:4307-4316.
- Metcalfe D.** Hemopoietic colonies. *In vitro* cloning of normal and leukemic cells. Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag, 227, 1977.
- Griffin JD, Lowenberg B.** Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1986;68:1185-1195.
- Fialkow PJ, Singer JW, Adamson JW, Vaidya K, Dow LW, Ochs J, Moohr JW.** Acute nonlymphocytic leukemia: Heterogeneity of stem cell origin. *Blood* 1981;57:1068-1073.
- Haase D, Feuring-Buske M, Konemann S.** Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. *Blood* 1995;86:2906-2911.
- Mehrotra B, George TI, Kavanau K.** Cytogenetically aberrant cells in the stem cell compartment (CD34+ Lin-) in acute myeloid leukemia. *Blood* 1995;86:1139-1145.
- Dick JE.** Assays for human leukemic stem cells. *American Society of Hematology Education Program Book* 1999:112-119.
- Turhan AG, Lemoine FM, Debert C.** Highly purified primitive hematopoietic stem cells are PML-RARA negative and generate monoclonal progenitors in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995;85:2154-2161.
- Clarkson B, Fried J, Strife A, Sakai Y, Ota K, Ohkita T.** Studies of cellular proliferation in human leukemia. III. Behavior of leukemic cells in three adults with acute leukemia given continuous infusions of ³H-thymidine for 8 or 10 days. *Cancer* 1970;25:1237-1260.
- Minden MD, Till JE, McCulloch EA.** Proliferative state of blast cell progenitors in acute myeloblastic leukemia (AM L). *Blood* 1978;52:592-600.
- Coulombel L, Eaves C, Kalousek D, Gupta C, Eaves AC.** Long-term marrow culture of cells from patients with acute myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 1985;75:961-969.
- Mayani H, Shen S, Guilbert U, Clark SC, Sych I, Janowska-Wieczorek A.** Effect of rhCSF-1 on human hemopoiesis in long-term cultures from patients with acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 1991;5:8-13.
- Löwenberg B, Bauman JGJ.** Further results in understanding the subpopulation structure in AML: Clonogenic cells and their progeny identified by differentiation markers. *Blood* 1985;66:1225-1232.
- Sutherland HJ, Blair A, Zapf RW.** Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood* 1996;87:4754-4761.
- Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ.** Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid

- leukaemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 1997;89:3104-3112.
32. **Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Cáceres-Cortés J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE.** A cell initiating LMA after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645-648.
 33. **Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainy D, Arnoulet C, Gastaut J-A, Olive D.** Human acute myeloid leukemia CD34+CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res* 2000;60:4403-4411.
 34. **Craig W, Kay R, Cutler RB, Lansdorp PM.** Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993;177:1331-1338.
 35. **Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC, Zsebo KM.** Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood* 1991;78:1403-1412.
 36. **Blair A, Sutherland HJ.** Primitive acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* lack surface expression of c-kit (CD117). *Exp Hematol* 2000;28:660-671.
 37. **Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG.** Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 1977;91:335-344.
 38. **Mayani H, Guilbert U, Clark SC, Belch AR, Janowska-Wieczorek A.** Composition and functional integrity of the *in vitro* hemopoietic microenvironment in acute myelogenous leukemia: effect of macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 1992;20:1077-1084.
 39. **Chang J, Morgenstern G, Deakin D, Testa NG, Dexter TM.** The use of bone marrow cells grown in LTC for autologous BMT in acute myeloid leukemia: an up date. *Bone Marrow Transplant* 1989;4:2-11.
 40. **Montesinos JJ, Flores P, Flores E, Martinez G, Mayani H.** *In vitro* proliferation and expansion of human hematopoietic progenitor cells from normal subjects and patients with hematologic neoplasias. *Exp Hematol* 2000;28:95a.
 41. **Terpstra W, Prins A, Ploemacher RE, Wognum BW, Wagemater G, Löwenberg B, Wielenga JJ.** Long-term leukemia-initiating capacity of a CD34- subpopulation of acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;87:2187-2194.
 42. **Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE.** A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Med* 1998; 4:1038-1045.
 43. **Grignani F, Valtien M, Gabbianelli M, Gelmetti V, Botta R, Luchefi L, Masella B, Morsilli O, Pelosi E, Samoggia P, Pelicci PG, Peschle C.** PML/RAR alpha fusion protein expression in normal human hematopoietic progenitors dictates myeloid commitment and the promyelocytic phenotype. *Blood* 2000;96:1531-1537.
 44. **Hromas R, Shopnick R, Jumean HG, Bowers C, Varella-Garcia M, Richkind K.** A novel syndrome of radiation-associated acute myeloid leukemia involving AML1 gene translocations. *Blood* 2000;95:4011-4013.
 45. **Schmetzer HM, Braun S, Wiesner D, Duell T, Gerhartz HH, Mittermueller J.** Gene rearrangements in bone marrow cells of patients with acute myelogenous leukemia. *Acta Haematol* 2000;103:125-134.
 46. **Cline MJ.** The molecular basis of leukemia. *N Engl J Med* 1994;330:328-336.
 47. **Mayani H.** Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1041-1047.