

# Original

## Enfermedad Mínima Residual

J. Besalduch (\*), J. Bargay (\*), Antonia Durán(\*), Natalia Martínez Pomar(\*\*), M. Morey (\*), Joana Mulet(\*\*), Josefina Mulet(\*\*), Josefina Soler(\*\*), C. Viader(\*\*)

De los conocimientos actuales sobre el cáncer y su tratamiento podemos afirmar que, por el momento y en el futuro inmediato, el éxito de las distintas terapias depende en gran medida de un diagnóstico lo más temprano posible. Ello nos lleva a insistir en la necesidad de poner en marcha tests de despistaje de la enfermedad cada vez más sensibles y específicos.

La investigación básica que en estos momentos se realiza en este campo de la Medicina está principalmente dirigida al estudio de los mecanismos genéticos involucrados en el proceso de malignización celular y de los productos que dictan dichos genes modificados.

El presente trabajo pretende proporcionar una visión actualizada de este tipo de investigación, a la vez que mostrar las aplicaciones prácticas en el terreno clínico.

Al iniciar una revisión de este tipo surgen siempre las mismas preguntas:

-¿Cómo podemos conseguir diagnosticar el cáncer en fases iniciales de su desarrollo en orden a favorecer al máximo las posibilidades de supervivencia del enfermo?

-¿Cómo podemos determinar si el enfermo está respondiendo de manera efectiva al tratamiento?

-¿Por cuanto tiempo aquel enfermo en aparente estado de remisión clínica debe seguir siendo tratado, y de qué manera?

En la actualidad contamos con una serie de métodos que nos permiten detectar cánceres de masa celular de entre  $10^8$ - $10^9$  células. Con estos tests se pretende, entre otros, conseguir los siguientes objetivos:

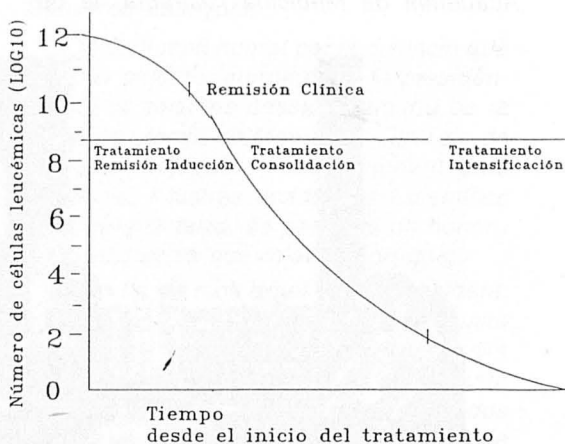
- Chequear la población en general y/o población de alto riesgo de sufrir determinado tipo de cáncer para diagnosticar la presencia o ausencia del mismo.

- Contribuir al diagnóstico diferencial y más exacto

- Realizar el seguimiento de la evolución clínica del enfermo.

- Evaluar la respuesta a la terapia establecida

En el siguiente gráfico (gráfica 1) se representa el número de células cancerosas versus el tiempo de inicio del tratamiento, y se observa que un enfermo está en remisión clínica cuando el tamaño aparente del tumor de  $10^{12}$  células es reducido con tratamiento del orden de dos logaritmos. Cuando el tumor es de menos de  $10^9$  células, lo que equivale a 1 cm de masa tumoral, éste se torna clínicamente indetectable.



Gráfica 1

(\*) Servicio de Hematología, Hemoterapia Hospital Son Dureta

(\*\*) Fundación Balear Transplant.

Es fácil por tanto deducir, que a un enfermo que tras el tratamiento se mantiene con  $10^9$  células tumorales se le aplicará la misma terapia que a aquellos enfermos que habiendo respondido mucho mejor tengan del orden de  $0-10^8$  células tumorales. De ello se deduce la importancia de conocer lo más exactamente posible el número de estas células tumorales residuales o lo que conocemos como Enfermedad Mínima Residual (EMR).

Para realizar dicho estudio nos centraremos en el análisis de discrasias hematológicas linfó y mielo proliferativas.

En el caso de las leucemias, el término de EMR se emplea para designar a la población de células malignas persistentes en aquellas leucemias que han entrado en remisión completa tras la instauración de la terapia. Los criterios que definen la EMR son morfológicos: masa tumoral igual o menor de 2 cm y una infiltración en médula ósea inferior al 20% del espacio intertrabecular (1).

Las células leucémicas pueden distinguirse de los progenitores hematopoyéticos en base a propiedades morfológicas y citoquímicas, cariotipo, requerimiento de factores de crecimiento *in vitro* e inmunofenotipo. Puesto que la recaída del paciente se origina a partir de células leucémicas que escapan al tratamiento, es un objetivo prioritario conocer la cantidad de células leucémicas que persisten, ya que

en teoría, la intensificación de la terapia cuando el tumor es de tamaño reducido incrementa la probabilidad de curación.

La aplicación de técnicas de biología molecular al estudio de procesos leucémicos ha modificado considerablemente las posibilidades de abordaje de la EMR. En la actualidad existen diferentes métodos que han incrementado extraordinariamente la sensibilidad de los primeros métodos de estudio morfológicos (1 célula leucémica de cada 100 normales) hasta alcanzar dinteles de 1 célula leucémica por millón de células normales. (Tabla 1).

En los procesos de cancerización las células adquieren anomalías genéticas, numéricas y estructurales, de diversa índole, lo cual permite su distinción del resto de la población celular normal. En las anomalías numéricas o aneuploidías se produce un exceso o defecto (hiperploidías o aneuploidías respectivamente) en el número de cromosomas de un determinado par. Las anomalías estructurales implican deleciones o translocaciones de un gen o fragmento de cromosoma. La diferencia de magnitud entre las aberraciones genéticas numéricas y estructurales explica que sean necesarios distintos métodos en función del poder de resolución de estos.

El cariotipo es el estudio del número y estructura de los cromosomas. Las técnicas convencionales permiten la tinción en

TABLA 1

Método	Marcador	Sensibilidad
Exámen microscópico	Morfología celular	$10^{-1} - 10^{-2}$
Cariotipo	Morfología cromosómica	$10^{-1} - 10^{-2}$
FISH	Estructura cromosómica	$10^{-2}$
Reordenamientos genéticos	Configuración del DNA	$10^{-2} - 10^{-3}$
Citometría	Perfil antigénico	$10^{-3} - 10^{-4}$
Cultivo clonogénico	Crecimiento <i>in vitro</i>	$10^{-5}$
PCR	Estructura DNA/RNA	$10^{-5} - 10^{-6}$

FISH: Hibridación in situ con fluorescencia. PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

bandas de los cromosomas. Dicha tinción se lleva a cabo cuando la célula entra en división y los cromosomas se separan.

En diversos estudios de enfermos de leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA) se observa que la desaparición del cariotipo anormal coincide con la inducción de la remisión clínica (morfológica). Más aún, Hart et al (2) observan que aquellos pacientes que recidivan después de la remisión, presentan de nuevo la anomalía cromosómica detectada al inicio. Sin embargo, en un número considerable de pacientes con cariotipos normales también aparece la recidiva, lo que indica que la no detección de cariotipo anómalo no garantiza la remisión.

Estos análisis de bandeado convencional resultan muy laboriosos y con gran inconveniente de ser imprescindible la obtención de células en división, lo cual en general obliga a realizar cultivos celulares. La sensibilidad de la técnica depende del número de metafases obtenidas para proceder a su estudio, y hay que tener en cuenta que la tasa de proliferación de células leucémicas es muy variable.

Esta situación propicia que se desarrollen técnicas que permitan el estudio de las anomalías cromosómicas prescindiendo del cultivo celular. La hibridación por fluorescencia in situ (FISH) aborda el estudio celular con herramientas moleculares. Posibilita la identificación de un gen o una zona cromosómica con la utilización de sondas específicas, que pueden ser aplicadas tanto a la célula en división como a aquellas que se hallan en interfase. El uso de sondas permite además un estudio más específico, a la vez que aumenta la sensibilidad ya que un mayor número de células podrán ser objeto de estudio.

Anastasi et al(3) detectan trisomía del cromosoma X en un 1,6% de las células interfásicas de médula ósea en un paciente con LLA que presentaba dicha trisomía en el momento del diagnóstico, y que

en este momento se hallaba en remisión morfológica. Heerema et al (4) establecen la sensibilidad del FISH en estudios de pacientes en remisión que presentan trisomías de cromosomas X, 10, 17, 18. La sensibilidad del FISH sólo alcanza el 1% debido a que está limitado por la presencia de células aneuploides (pero no leucémicas) y por ciertos artefactos inherentes a la propia técnica.

El FISH no sólo es de aplicación en el estudio de anomalías numéricas sino también en el de las estructurales. Se ha analizado la presencia del cromosoma Filadelfia asociado principalmente a la LMC. Dicho cromosoma resulta de la unión del gen BCL con el gen ABL, normalmente localizados en cromosomas diferentes.

La citometría de flujo con doble y triple marcaje y la posibilidad añadida de selección positiva de clones celulares con ayuda del FACS (fluorescent activated cell sorter) ha significado un importante avance en este campo. La citometría de flujo constituye una técnica mediante la cual cada célula o partícula se hace pasar individualmente en una corriente de fluido de una sola fila, entre un haz de luz y uno o más sensores que miden determinadas características físicas o químicas. El estudio individual de un gran número de células permite que las poblaciones y/o subpoblaciones celulares puedan diferenciarse por características físicas como tamaño y estructura interna, y/o por el número y tipo de antígenos de superficie.

Los estudios de EMR con citofluorimetría de flujo se basan en que uno o más antígenos celulares se expresan simultáneamente de forma anómala. Hay evidencias que indican la existencia de fenotipos leucémicos que son distintos de la progenia celular sana.

El inmunofenotipo correspondiente a la diferenciación linfocítica B sana sigue un ordenado esquema madurativo en el que los marcadores de estadios más maduros no se expresan hasta que desaparecen los marcadores más inmaduros.

Se ha observado que en algunas LLA de línea B se expresan simultáneamente antígenos y de estadios maduros. Dicho asincronismo antigénico se traduce en la expresión de antígenos característicos de estadios inmaduros como TdT, CD10 o CD43, junto a antígenos que en condiciones normales se expresan en células maduras como CD22 y/o Cd20. Se ha demostrado la existencia de porcentajes muy bajos de células sanas que coexpresaran CD34/CD22, CD34/CD20 y CD10/CD22.

Se ha descrito, aunque con menor frecuencia que en los asincronismos antigénicos, la expresión inadecuada de antígenos característicos de otras líneas celulares como son los marcadores de la línea mieloide CD13, CD33 y CD11b, o de línea T CD2 y CD7 en casos, que por otras características, se han considerado leucemias linfoblásticas de línea B.

La citometría de flujo que utiliza marcadores inmunofenotípicos de diferenciación celular consigue resultados relativamente mejores en cuanto a la sensibilidad, llegando a un dintel de  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$ . Esta sensibilidad puede mejorarse alcanzando niveles  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$ , en caso de poder contar con un marcador tumoral característico.

Otra posible aplicación de la citometría de flujo permite la identificación de las aneuploidías basándose en citometría láser de células marcadas con fluorocromos dirigidos contra el DNA. Esta técnica permite monitorizar la EMR en la mayoría de aneuploidías.

La combinación del estudio de las aneuploidías del DNA y marcadores permite un examen más selectivo de células progenitoras.

### **Biología molecular**

El primer abordaje del estudio de EMR por tecnología molecular se realizó mediante la técnica Southern Blot: electroforesis de fragmentos de DNA obtenidos por digestión con restrictasas y posterior iden-

tificación usando sondas específicas con las que se identifica el tipo de línea celular tumoral. La técnica es medianamente sensible, con un nivel de detección de 5-10% (5).

## **Aplicación de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) al Estudio de la Enfermedad Mínima Residual**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) constituye la tecnología más avanzada de la que se dispone actualmente en el laboratorio. Dicha técnica se basa en la síntesis en cadena y permite obtener millones de copias de fragmentos de DNA característicos de la célula tumoral, constituyéndose éste en el marcador molecular de aquella. Las principales características de la PCR: elevada sensibilidad (detección de una célula leucémica entre un millón), elevada especificidad y un poder de resolución sustancialmente alto, la convierten en una herramienta clave en el estudio y seguimiento de los enfermos que han entrado en remisión completa.

Se han estudiado numerosos marcadores moleculares relacionados con enfermedades malignas hematológicas que se exponen en la tabla 2.

A continuación pasamos a desarrollar algunos de los marcadores que aparecen más frecuentemente relacionados con algún proceso proliferativo determinado.

### **Marcador molecular ABL-BCR**

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una proliferación clonal de una célula madre pluripotencial que puede diferenciarse en las series granulocíticas, megacariocítica, linfocitos B y posiblemente linfocitos T. Un 90-95% de los pacientes con leucemia mieloide crónica presentan en las preparaciones directas de médula

TABLA 2

Enfermedad	Alteración	Marcador molecular
LLA		
Linaje-B	t(9;22) (q34;q11) t(1;19) (q23;p13.3) t(17;19) (q22;p13) t(4;11) (q21;q23) t(15;14) (Q31:Q32) t(11;19) (q23;p13) t(9;11) (p21-22;q23) t(8;14) (p24;q32.3)	BCR-ABL (RNA) E2A-PBX (RNA) E2A-HLF (RNA) MLL-AF4 (RNA) IL3-IgH (DNA) MLL-ENL (RNA) MLL-AF9 (RNA) MIC-IgH (DNA)
Linaje-T	t(11;14) (p13;q11) Delección t(1;14) (p34;q11) t(10;14) (q24;q11)	RHOM2-TCR $\delta$ (DNA) TAL1 (DNA) Tal1-TCR $\alpha$ (DNA) HOX11-TCR $\alpha$ (DNA)
LMA	t(8;21) (q22;q22) t(15;17) (q22;q11-22) inv(16) (p13q22)/t(16;16) t(9;11) (p21-22;q23) t(9;22) (q34;q11) t(6;9) (p23;q34)	AML1-ETO (RNA) PML-RARA (RNA) CBF $\beta$ -MYH1 (RNA) MLL-AF9 (RNA) BCR-ABL (RNA) DEK-CAN (RNA)
Ciertos linfomas	t(14;18)	BCL2-IGH (DNA)
Marcador clonal	ninguna ninguna	CDRIII TCR

**Tabla 2:** Se exponen distintos tipos de alteraciones cromosómicas y material genético que pueden ser amplificados por PCR.

La traslocación t(9;22) que da origen al llamado cromosoma Philadelphia se encuentra en el 3-5% de LLA infantil y en mayor proporción (50%) en adultos. También se halla, aunque en menor proporción, en los pacientes con LMA. En ambos casos se puede amplificar in vitro el marcador molecular *abl-bcr*. Actualmente se han realizado estudios de enfermedad mínima residual por PCR en los casos cuya causa es la translocación t(17;19)(q22;p13). En LLA de linaje B, los resultados obtenidos tras la amplificación in vitro de las mutaciones t(11;14) y t(1;14), que representan aproximadamente un 5-10% de los casos, son aceptables. El 10-30% de los casos de LLA de linaje T son causados por la delección de un fragmento de 90 kb en el cromosoma 1p32, que afecta al gen *TAL*. Dicha anomalía es detectable por PCR y se empieza a utilizar como marcador en estudios de EMR.

La translocación recíproca de los cromosomas 15 y 17 se encuentra en muchos de los casos de leucemia promielocítica aguda (LPA: M3 LMA). Dicha translocación afecta al gen del receptor-a de ácido retinoico (*RARA*) del cromosoma 17 y al factor de transcripción del cromosoma 15 *PML*. Los marcadores moleculares *AML1-ETO*, *DEK-CAN* y *MLL-AF9* se han utilizado en estudios recientes(6).



ósea y en las metafases de sangre periférica cultivada, un cromosoma acrocéntrico anormalmente pequeño; el llamado cromosoma Philadelphia. Se trata de un cromosoma 22 de menor tamaño que se produce como resultado de la translocación  $t(9;22)(q34;q11)$ . El cromosoma 9 transfiere al cromosoma 22 un pequeño fragmento de sus brazos largos, en el cual se transporta el denominado protooncogen *abl*, que parece ser el factor clave de la aparición de la LMC. La translocación a la región *M-bcr* da lugar a la formación del oncogen *bcr-abl* que transcribe en un mRNA quimérico *bcr-abl*, que codifica una proteína con actividad tirosinquinasa aumentada (p210,210kda)(7). El mecanismo exacto por el cual este nuevo factor de crecimiento estimula la proliferación mielóide se desconoce, pero si sabemos que la fosforilación de tirosinas es de importancia capital en la regulación de distintos procesos celulares básicos. Como se observa esquemáticamente en la figura 1, la translocación que origina dicha enfermedad posee los puntos de ruptura (break-

points) separados por un segmento de DNA excesivamente largo para ser amplificado enzimáticamente in vitro. Sin embargo, gracias a que los puntos de ruptura se encuentran a menudo en las mismas unidades de transcripción, se puede analizar el RNA mensajero tras el procesamiento del transcrito primario.

Citogenéticamente, el cromosoma Ph hallado en LLA y en LMC no son distinguibles, sin embargo, se diferencian a nivel molecular pues todos los pacientes que cursan con LMC Ph (+) poseen el punto de ruptura en la región mayor breakpoint cluster (*M-bcr*) del gen BCR, mientras que los enfermos con LLa Ph (+) mantienen el punto de ruptura en la región menor breakpoint cluster del mismo gen(8). No obstante, ambos proporcionan un transcrito *bcr-abl* RNA mensajero, adecuado para que la transcriptasa inversa sintetice el DNA complementario necesario para su posterior la amplificación in vitro.

Cabe añadir, que trabajar con RNA mensajero en lugar de DNA conlleva a un problema de cuantificación de la ampliación, por cuanto los RNA mensajeros se expresan en distintas cantidades en diferentes leucemias.

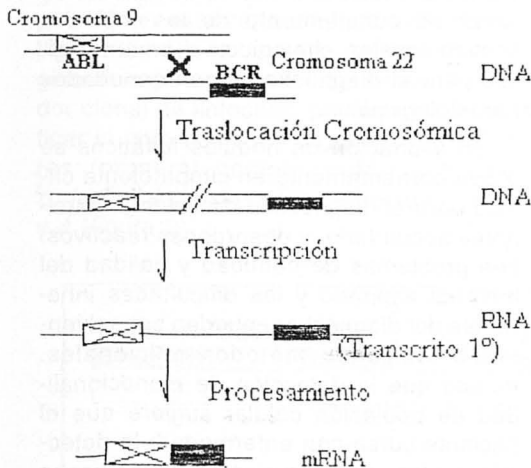


Figura 1: La translocación cromosómica  $t(9;22)(q34;q11)$  proporciona un transcrito primario que tras su procesamiento facilita un material adecuado para ser amplificado enzimáticamente in vitro por PCR

### Marcador molecular BCL-2

El marcador molecular *bcl-2* /JH se ha encontrado en las muestras analizadas de un 85% de pacientes con linfoma folicular no Hodgkin y en un 40% de pacientes con linfoma no Hodgkin (NHL) de células grandes. Los linfomas no Hodgkin representan un grupo de linfomas heterogéneo según el curso clínico de la enfermedad, la respuesta a la terapia aplicada y el tiempo de vida del paciente. Aproximadamente el 40% de los enfermos tratados no entrarán en remisión completa tras la inducción con quimioterapia, a lo cual se suma que un 25-30% de los pacientes recaerán tras la remisión completa inicial(9).

Recientemente se ha utilizado con éxito, en el tratamiento de diversas pato-

logías, incluyendo NHL, el aumento de la dosis de quimioterapia con y sin irradiación del cuerpo entero, seguido de trasplante autólogo de stem-cells de sangre periférica. Diversos estudios han intentado identificar factores de pronóstico para ayudar a la selección de pacientes que se tratarán con dicho procedimiento. La mayoría de los casos de NHL de células B, presentan como marcadores moleculares el bcl-2 o los reordenamientos del gen de las inmunoglobulinas, mientras que el marcador molecular más frecuente en los linfomas de células T lo constituyen los reordenamientos a nivel de los genes que dictan el receptor celular (TCR).

El marcador molecular bcl-2 es el producto de la translocación recíproca t(14:18)(q32; q21).

En tal translocación, el protooncogen bcl-2 del cromosoma 18 se sitúa en la región de transcripción activa de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14. Puesto que los genes que codifican la producción de anticuerpos deben expresarse en un alto nivel, hay una secuencias genéticas que aumentan la actividad de dichos genes. Al producirse la translocación, el protooncogen se sitúa en una posición próxima a una de las secuencias que exaltan la variabilidad de producción de anticuerpos, con lo que la transformación maligna pasa a constituir una parte fundamental de la función de la célula. Existen dos puntos de ruptura en el extremo 3 de la región que codifica bcl-2: la región de punto de ruptura mayor o mayor breakpoint región (MBR) se localiza en la región no codificada 3 y la región menor o minor cluster región (mcr) se localiza a 20 Kb de la primera. Utilizando oligonucleótidos complementarios a las regiones MBR o mcr y a la región J conservada de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, se puede detectar el reordenamiento mediante PCR.

Se han realizado estudios en animales transgénicos que sugieren que la translocación que incluye al oncogen bcl-2 es

necesaria pero no suficiente para desarrollar la enfermedad (10). Por tanto, se realizan investigaciones para averiguar qué número de células son potencialmente suficientes para inducir la recidiva y estudiar los pacientes con alto riesgo de recaída. Estudios recientes demuestran la importante relevancia clínica de los análisis moleculares en neoplasias de células B.

#### **Marcador molecular: reordenamientos**

Diversos estudios se han basado en la ampliación por PCR de los reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y receptores de las células T (TCR) que resultan durante la diferenciación normal de las células linfoides. La detección de altos niveles de monoclonalidad en una población celular es un indicador muy sugerente de enfermedad maligna. Dichos marcadores no están asociados directamente con un proceso neoplásico como los marcadores expuestos anteriormente, sino que sirven como marcadores de linfocitos individuales y de su progenie clonal. El método de PCR puede también servir de complemento de los métodos convencionales citológicos e inmunológicos para el diagnóstico de enfermedades hematológicas.

La aspiración de nódulos linfáticos se utiliza corrientemente en citopatología clínica para el diagnóstico de linfoma, carcinoma secundario, y desordenes reactivos. Los problemas de cantidad y calidad del material aspirado y las dificultades inherentes del diagnóstico, pueden ser solventados utilizando métodos adicionales. Puesto que la detección de monoclonalidad de población celular sugiere que el paciente cursa con enfermedad, la detección de los reordenamientos de los genes de las Ig o del TCR constituyen un marcador valioso en desordenes hematológicos neoplásicos.

La técnica convencional de Southern Blotting, utilizada en la detección de reor-

denamientos de los genes, requiere una determinada cantidad de DNA que no obtiene normalmente en los aspirados de nódulos linfáticos. Es por ello que la PCR, desarrollada para detectar la monoclonalidad en desordenes linfoproliferativos, es de gran utilidad en el estudio de la enfermedad partiendo de un pequeño número de células.

### Reordenamientos del gen de las inmunoglobulinas

Durante la ontogenia de las células B, la diversidad de las pesadas de las inmunoglobulinas (IgH) se genera por recombinación de los segmentos VH (variabilidad), JH (unión) y DH (diversidad), este último proporciona una diversidad adicional. Tal reordenamiento origina la tercera región determinante de complementariedad, que forma parte esencial del sitio de unión al antígeno. el enzima transferasa terminal incrementa la variabilidad, incorporando nucleótidos en la secuencia de DNA en los puntos de unión entre estos segmentos, produciendo DNA de distinta longitud que se traducirá en diferentes anticuerpos. Al ser esta zona un punto hipervariable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, se puede utilizar como marcador clonal de linfocitos, pudiéndose amplificar in vitro haciendo uso de los cebadores (primers) complementarios a las zonas más conservadas de las regiones V y J (figura 2)

Usando primers complementarios a las regiones más conservadas de los segmentos VH y JH se amplifica el fragmento donde reside la hipervariabilidad en la longitud del DNA (11). Cuando se aplica al estudio de un población de linfocitos B policlonal aparecerá una multitud de fragmentos de DNA de distinto tamaño, mientras que si existe una población monoclonal se revela un fragmento mucho más destacado que el resto.

Debido a la gran variabilidad de los segmentos VH y JH, ha sido necesario el diseño de un grupo de primers dirigidos contra las cuatro regiones más conservadas, los llamados framework regions. Combinado algunos de estos primers en cada estudio es posible obtener una tasa de detección del 90% de las proliferaciones linfoides de linaje B.

### Marcador molecular: reordenamientos del receptor de células T (TCR)

Los genes del TCR tan solo se expresan en las células T y al igual que los genes de las inmunoglobulinas, los genes funcionales TCR sufren reordenamientos durante el desarrollo de las células T. Los genes de TCR comprenden también diversos segmentos de variabilidad (V), diversidad (D) y unión (J), que junto con la transcriptasa terminal, y por un mecanismo idéntico al utilizado en los genes de las IgH, son los causantes de la gran diversidad de dicho receptor. Los genes

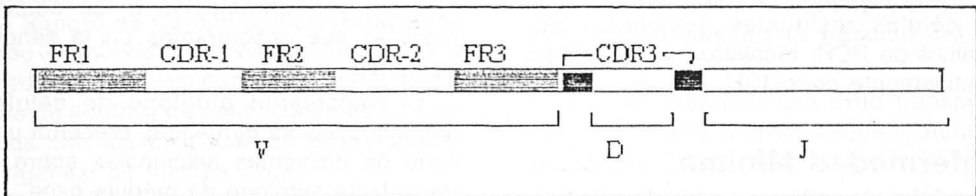


Figura 2: Representación esquemática de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. FR: Framework, zonas más conservadas; CDR: Región determinante de complementariedad, zonas hipervariables. Las regiones CDR2 y CDR1 están codificadas por la región del gen V. La región CDR3 está formada por el extremo 3' del segmento V, todo el fragmento D y el extremo 5' de la región del gen J.



TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  poseen un potencial de diversidad mayor que los genes TCR $\gamma$  y TCR $\delta$  ya que los primeros poseen un mayor repertorio de segmentos V y J. Los reordenamientos de los genes TCR $\gamma$  TCR $\delta$  y TCR $\beta$  se encuentran en un 91%, 68% y 89% de los casos de T-LLA. También se han encontrado en leucemias de linaje B en menor proporción : 55%, 54% y 33% respectivamente, sin embargo, estos últimos son reordenamientos incompletos que abarcan solo los segmentos V y D.

Diferentes estudios de enfermedad mínima residual por PCR, se basan en la utilización de marcadores de neoplasias junto con marcadores de progenie clonal como los reordenamientos de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y del receptor de células T. Tal es el caso de la ampliación del gen N-RAS junto con los reordenamientos de las IgH(12).

El campo de detección de células residuales por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa es un amplio camino, pues son muchos los estudios que se realizan para mejorar las técnicas así como ampliar sus aplicaciones. En un futuro no muy lejano, las anomalías moleculares de las enfermedades hematológicas serán utilizadas de forma rutinaria como marcadores para el estudio de la EMR utilizando PCR o técnicas similares. Los análisis de EMR tienen una aplicación importante en el campo de trasplante de médula ósea que incluyen la selección del candidato para el trasplante, el estudio del purgado, y el estudio de los pacientes con alto riesgo de recidiva. Recientes estudios muestran que pacientes con un elevado nivel de células residuales detectadas por análisis de PCR, recayeron en un tiempo relativamente corto(13).

## **Enfermedad Mínima Residual y Trasplante de Médula Ósea**

El trasplante de médula ósea se clasifica en dos modalidades fundamentales según la procedencia de la médula inocu-

lada: autólogo (TAMO) si proviene del propio paciente, y alogénico (TMO) si procede de un donante humano HLA compatible.

En el TAMO la potencia erradicativa radica exclusivamente en la quimioterapia mieloablativa. En el TMO se añade además un efecto inmuno-alogénico del injerto medular contra la leucemia, que mejora considerablemente la capacidad curativa de esta modalidad.

En el TMO, el problema básico es la enfermedad injerto contra huésped (EICH), responsable de un importante número de mortalidad. La infusión de médulas deplecionadas de linfocitos T, en un intento de disminuir la EICH ha conllevado un aumento paralelo del número de recaídas.

Por otro lado, las recaídas en el TAMO pueden estar en relación con la reinfusión de células tumorales, por lo que se han utilizado métodos de purgado ex-vivo (Mafofamida y 4 OH-Ciclofosfamida). Si bien, parece ser que el motivo fundamental para las recaídas en TAMO es debido a la ausencia de efecto injerto contra leucemia (EICL).

El trasplante de células pluripotenciales (stem cells) de médula ósea alogénica o autóloga, o bien de las obtenidas a partir de sangre periférica, es cada vez más utilizado en el tratamiento de tumores sólidos.

Es difícil definir el concepto de stem cells humanas. Se las considera células con capacidad de autorrenovación, proliferación y diferenciación a las células maduras que encontramos en la sangre periférica.

El trasplante autólogo de células hematopoyéticas periféricas presenta una serie de desventajas adicionales sobre el trasplante autólogo de médula ósea.

Los métodos actuales de separación y purificación de células han permitido la obtención de buenos rendimientos en la separación de stem cells a partir de sangre periférica mediante leucoféresis, lo que

además de hacer innecesaria la anestesia del paciente permite la obtención de estas células pluripotenciales, incluso en enfermos cuyas pelvis han sido anteriormente irradiadas o en aquellos en los que la médula ósea está invadida por el tumor. No obstante, la principal ventaja radica en el menor tiempo necesario para que prenda e material transplantado, lo que se traduce en aplasias significativas más cortas.

La constatación de que la concentración de precursores hematopoyéticos en sangre de cordón es muy elevada, casi comparada a la médula ósea del adulto, ha hecho que muchos grupos se plantearan su utilización en trasplante alogénico.

Desde hace tiempo es conocido que la sangre de cordón es rica en precursores hematopoyéticos, probablemente resultado de las diferentes migraciones entre los órganos hematopoyéticos, probablemente resultado de las diferentes migraciones entre los órganos hematopoyéticos fetales con intención colonizadora.

En 1985 se sugirió por vez primera la posibilidad de utilizar sangre de cordón como material hematopoyético para trasplante. Sin embargo no fue hasta 1988, en que gracias al trasplante de sangre de cordón HLA idéntica procedente de un hermano, pudo demostrarse su utilidad en un niño afectado de anemia de Falconi(14). Existen experiencias posteriores que confirman la viabilidad de este tipo de trasplantes. Así, en el Registro Internacional de Sangre de Cordón se han recogido en todo el mundo 35 trasplantes siendo la media de células nucleadas transplantadas de 40M/Kg de peso, cifra baja comparada con las utilizadas en el trasplante alogénico de médula ósea.

Tanto la médula ósea del adulto como la sangre de cordón, poseen un número significativamente mayor de precursores que la sangre periférica del adulto. Además, a pesar de que la sangre de cordón contenga sólo alrededor del 70% de los

precursores que contiene la médula ósea, la sangre de cordón es más rica en precursores más primitivos, lo que le confiere un interés adicional. Si se estimula a donantes sanos voluntarios con factores de crecimiento hematopoyéticos, se incrementa el número de precursores en unas 40 veces las cifras basales, con lo que se llegan a superar las de médula ósea.

Esto último puede tener en un próximo futuro implicaciones clínicas importantes de cara a la utilización de sangre periférica de adulto en trasplantes alogénicos. Ello haría la utilización de sangre de cordón innecesaria si no fuera porque ésta presenta una ventaja adicional. En efecto, parece ser que los linfocitos T de sangre de cordón son fenotípicamente naives y funcionalmente inmaduros y por tanto, menos alorreactivos, lo que se traduciría en una menor incidencia de reacciones de injerto contra huésped.

Existen estudios experimentales que indican que la mayoría de stem cells se hallan en fase Go y una minoría en ciclo celular. Estas células son de tamaño irregular, heterogéneas en densidad, antígenos de membrana y propiedades tincionales. Sin embargo, se han identificado una serie de características que pueden definir las: son CD43+, CD33-, HLA DR-, resistentes a la 4HC y sin marcadores mieloides ni linfoides (linaje negativo= lin-).

Una pequeña proporción de stem cells son capaces de iniciar cultivos a largo término y se han denominado LTC-IC (Long Term Culture Initiating Cells), estando presentes en la fracción celular CD34+, lin-.

Se han realizado con éxito trasplantes en primates con un pequeño número de células CD34+ purificadas.

Por todo lo expuesto, en la actualidad se piensa que a partir de un solo espécimen la sangre de cordón, existe un número suficiente de células hematopoyéticas capaces de reconstituir la hematopoyesis de un adulto.

Sin embargo, debido a la variabilidad existente entre distintas sangres de cordón, el concepto de expansión del material hematopoyético, es un tema de actualidad permanente. En este sentido presen-

tamos a continuación el resumen del trabajo de Carosella, Gluckman et al. que fue objeto del Premio Europeo 1994 de la Fundación Balear Transplant.

## **Premio 1994 Fundación "Balear Transplant"**

**FUNCTIONAL ROLE PECAM-1/CD31 MOLECULE EXPRESSED ON HUMAN CORD PROGENITORS**

**Edgardo Carosella\*, Armand Bensussan\*\* and Eliane Gluckman\***

Inserm U93 Hôpital Saint-Louis and \* Unité de Recherches sur la Biologie des Cellules Souches-L.I.R.B. -C.E.A, 75475 Paris Cedex 10, France

\*\* Institut d'Hematologie, Centre Hayem, Hôpital St Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux 75475 Paris Cedex 10, France.

### **Resumen**

La molécula CD31/PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) es una proteína de membrana de 130Kd de peso molecular, perteneciente a la superfamilia que dictan los genes de las inmunoglobulinas, con la particularidad de que se expresa en distintos tipos de células asociados con el compartimiento vascular.

En el presente estudio presentamos el anticuerpo monoclonal (mAb) anti CD31 denominado IP28A que reacciona con células que expresan la molécula CD34, progenitores hematopoyéticos y subclases de linfocitos T, B y NK de sangre humana de cordón.

Son de reseñar los datos que presentamos en el sentido de que el número de CFU-GM y BFU-E en el cultivo de células progenitoras, se ha visto sensiblemente aumentado al añadir el mAb IP28A purificado a rhSCF más rhGM-CSF y rhEPO respectivamente. Estos resultados son por tanto de gran interés en lo que atañe al trasplante de células de sangre de cordón, ya que demuestran que in vitro puede conseguirse con ayuda del mAb CD31 un cierto grado de expansión de células progenitoras de sangre de cordón.