

Progenitors megacariocitaris en l'animal d'experimentació : models de proliferació i diferenciació.

R. Moreno., Ll. Alfonso., F.J. Casals.

Laboratori de Cinètica Cel.lular. Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia.
Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Villarroel , 170. 08036
Barcelona.

Abstract

Megakaryocytic progenitors in experimental animals : Models of proliferation and differentiation.

The rise of megakaryocytes colonies from in vitro bone marrow culture, allows to quantify the number of megakaryocyte progenitors, but not their degree de maturity . We have compared the growth pattern observed when the same bone marrow was indistinctly stimulated by erithropoietin (Epo), WEHI-3 or pokewed-mitogen transformed splenic lymphocytes (PM-CM) finding a great number of big colonies when this last stimulant was employed in opposition to the cultures stimulated with Epo, where the half number of colonies had only one or two megakaryocytes. This finding can be explained by a selective stimulation with Epo of more mature progenitors, in opposition to the more ancestral progenitors stimulated by PM-CM.

Introducció

Els megacariòcits presenten un patró de proliferació i maduració únic en els mamífers.

La megacariocitopoesi consta de dos compartiments; un el proliferatiu, format per cèl.lules progenitores irreconeixibles amb un índex mitòtic elevat que segons el grau del seu desenrotllament dona l'existència de colònies "in vitro" compostes de megacariòcits (A. Nakeff, 1977; S.A. Burstein et al, 1979); megacariòcits més eritroblasts (D.L. McLeod et al, 1976); megacariòcits més eritroblasts més granulocits - macròfacs (R.K. Humphries et al; 1979).

El segon compartiment o de diferenciació es caracteritza per la presència d'endomitosis (divisió del nucli però no del citoplas-

ma) donant en conseqüència, megacariòcits de diferent ploidia des de 4N a 64N trobant-se valors de 128N i 256N en diverses patologies i un augment progressiu del citoplasma en ordre a l'índex endomitòsic.

Aquests dos canvis morfològics, l'increment del citoplasma i la ploidia nuclear, han estat utilitzats com índexs qualitius de diferenciació megacariocitària.

Aquest procés es troba influenciat per factors de creixement, alguns d'ells actuant localment a través d'interaccions cel·lulars i altres operant humoralment, tipus hormones (R.K. Humphries, N. Young, 1984).

Material i mètodes.

- a) Animals: Ratolins mascles de les soques C57/B1 i CBA/Ca d'una edat compresa entre les 6 i 15 setmanes (IFFA - Credo Lyon, France).
- b) Estimulants:
 - b.1) Sobrenadant de limfocits esplènics de ratolí estimulat amb PWM. S'obté incubant $4 - 20 \times 10^6$ cèl·lules viables/ml de melsa en alpha - MEM suplementat amb FCS (10%) i PWM (1%) durant 7 dies a 37°C.
 - b.2) Eritropoietina. S'obté a partir de sèrum de moltó anèmic després d'una purificació parcial STEP III (Connaught, Londres).
 - b.3) WEHI-3. Sobrenadant d'una línia cel·lular leucèmica mielomonocitària de ratolí.
- c) Quantificació de CFU - m: Es cultiva la suspensió cel·lular de medulla òssia en alpha - MEM suplementat amb sèrum de cavall (20%), mercaptoetanol 10^{-2} M (1%), BSA desionitzada (10%), bicarbonat sòdic al 7% (1.5%), plasma boví citratat (10%) i clorur càlcic al 0.25% (10%). S'incuben a 37°C i amb CO₂ al 5%. Després de 6 dies els cultius son doblement tenyits per l'acetilcolinesterasa (marcador específic del megacariòcit de ratolí) i per el DNA (Feulgen).

d) Caracterització de CFU - m: Mitjançant microscopi es troben el número total de cèl.lules acetilcolinesterasa positives distingint-se dos tipus de colònies segons el número mínim de megacariòcits; unes amb 1 o 2 megacariòcits, i altres amb 3 o més megacariòcits. S'ha evaluat l'àrea nuclear i els nivells de ploïdia d'aquestes cèl.lules mitjançant càlculs esteriomètrics i de densitat òptica integrada del nucli tenyit amb Feulgen amb fotomicroscòpi ZEISS connectat a un analitzador d'imatges IBAS 2 KONTRON.

Resultats.

Nosaltres hem observat que el número i grau de diferenciació dels precursors megacariocitaris (CFU-m) en la medul.la òssia del ratolí difereix segons el medi de cultiu, el tipus d'estimulant i la soca de ratolí utilitzada. Així, existeixen diferències significatives en el comportament de les CFU-m entre les soques de ratolí C57/B1 i CBA/Ca. Quan la soca C57/B1 és estimulada amb Epo es produeix un increment del número de colònies integrades per ≥ 3 Mk; 42.7 colònies/ 10^5 cèl.lules implantades; quan s'utilitza mig condicionat amb el sobrenadant d'una línia cel.lular leucèmica de ratolí (WEHI-3) com estimulant, el número de colònies reflexe del nombre de progenitors, descendeix a 32.7 colònies/ 10^5 cèl.lules implantades. Empleant el mateix tipus d'estímul sota condicions similars hem trobat resultats diferents en la soca CBA/Ca amb 21.7 colònies/ 10^5 cèl.lules implantades amb Epo; 59.3 colònies/ 10^5 cèl.lules implantades amb WEHI-3 i 93 colònies/ 10^5 cèl.lules implantades quan s'estimula amb sobrenadant de limfocits estimulats amb PWM, productors d'interleukines.

En aquesta última soca els Mk que integren les colònies són petits, posseeixen una escassa àrea citoplasmàtica acetilcolinesterasa positiva al voltant d'un nucli rodó o oval, a diferència de l'aspecte que posseeixen els Mk que s'obtenen en les colònies produïdes a l'estimular els progenitors amb Epo els quals s'assemblen als trobats en la medul.la òssia en condicions normals.

El nivell de ploïdia mitjà en la soca CBA/Ca va ser 3.02N, sent superior en colònies mixtes, integrades per dues estirps cel.lulars

(3.32N) que en colònies pures formades sols per Mk (2.53N) amb una àrea nucleal mitjana de 66.5 u^2 . Aquests resultats van ser obtinguts implantant 30.000 cèl.lules/placa. Si aquesta concentració s'incrementa fins a 100.000 cèl.lules/placa amb la precaució que les colònies no estiguin en contacte entre elles (sent possible aleshores realitzar un mapa de colònies megacariocitàries per placa) els nivells de ploïdia mitjà són de 3.51N amb una àrea nucleal de 96 u^2 . Però quan s'incrementa la densitat cel.lular i les colònies megacariocitàries i granulocitàries - macrofàgiques estan en contacte unes amb les altres, el nivell de ploïdia mitjà augmenta fins a 5.18N, amb una àrea nucleal mitjà de 127.9 u^2 , semblant a la trobada en colònies megacariocitàries pures de la soca C57/B1 estimulades amb Epo (5.14N), però menor que els resultats de CFU - m mixtes aïllades d'aquestes plaques (7.7N i 8.88N respectivament).

Conclusions.

S'han proposat diferents models de proliferació i diferenciació megacariocitària, basats fonamentalment en els resultats obtinguts dels cultius "in vitro" dels seus progenitors (J.M. Paulus et al, 1982).

Aquestes dades demostren que en cultius cel.lulars es produeix un microambient on creixen cèl.lules que al morir o durant el seu cicle vital aboquen al medi substàncies reguladores de la diferenciació així com la producció d'interaccions cel.lulars (N. Williams et al, 1981).

Dels resultats obtinguts per altres autors i dels nostres deduem que els progenitors megacariocitaris es troben en forma d'un gradient de maduresa i diferenciació responnent els més immaturs a molècules (interleukines) diferents dels inductors (Epo) que actuen en progenitors més madurs, produint-se aleshores diferents graus de diferenciació depenent de l'estadi de maduresa sobre el qual incideixen els inductors.

EVIDENCIA DE L'EXISTENCIA DE CEL·LULES BIPOTENTS A L'HEMATOPOIESI

Bibliografia.

- NAKEFF, A.: "Colony-Forming Unit - Megakaryocyte (CFU-m): its use in elucidating the kinetics and humoral control of the megakaryocytic committed progenitor for cell compartment. Experimental Hematology Today. Baum S.J. (ed) New York: Springer Verlag, 1977, pag 111-123.
- BURSTEIN, S.A., ADAMSON, J.W., THORNING, D., HARKER, L.A.: "Characteristics of murine megakaryocytic colonies in vitro". Blood 54, 169-179, 1979.
- MCLEOD, D.L., SHREEVE, M.M., AXELRAD, A.A.: "Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro" Nature 261, 492-494, 1976.
- HUMPHRIES, R.K., EAVES, A.C., EAVES, C.J.: "Characterization of a primitive erythropoietic progenitor found in mouse marrow before and after several weeks in culture". Blood 53, 746 - 763, 1979.
- HUMPHRIES, R.K., YOUNG, N.: "Aplastic anemia and stem cell Biology". In Aplastic anemia: stem cell biology and advances in treatment. N. Young, A.S. Levine, R.K. Humphries (eds). Alan R. Liss, New York 1984, pag 3 - 12.
- PAULUS, J.M., PRENANT, M., MAIGNE, J., HENRY-AMAR, M., DESCHAMPS, J.F.: "Ploidization of megakaryocyte progenitors in vitro". In Megakaryocyte biology and precursors: in vitro cloning and cellular properties. Evatt, Levine, Williams (eds). Elsevier North Holland, New York, 1981, pag 171 - 177.
- WILLIAMS, N., JACKSON, H., RALP, P., NAHOING, I.: "Cell interactions influencing murine marrow megakaryocytes: Nature of the potentiator cell in bone marrow". Blood 57, 157 - 163, 1981.
- doncs, hem pogut observar, que quan es produïa una forta disminució de plaquetes sanguines, provocada per la seva destrucció immunològica a la perifèria, a més d'un augment dels seus precursors medul·lars: els megacariòcits, detectem, en 52 % dels casos estudiats un significatiu augment dels progenitors més endocrals de la línia eritroblàstica: els BFC-3 (14 dies), quan es determinen mitjançant el cultiu en plasma coagulat de 100.000 cel·lules mononucleades de medul·la i estimulants mitjançant dues unitats de Eritropoietina, mentre que en un 15% de malalts hem trobat una inhibició del seu creixement. En cap cas hi havia una demanda perifèrica de glòbuls vermells.
- El fet de trobar un augment dels BFC-3 (14 dies), sense que existeixi una demanda perifèrica de eritròcits ni un procés tumoral sols es explica per la existència d'una cel·lula progenitora que tindria un caràcter unipotent per les sèries eritroblàstica i megacariocítica, la qual sols es podria posar de manifest per l'acció reveladora de la Eritropoietina, i on el seu nombre es veuria augmentat per mecanismes de retroalimentació entre compartiments, al buidar-se els compartiments més madurs dels seus elements

