



85  
29

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

FACULTAD DE QUIMICA

CINETICA PLAQUETARIA

TRABAJO ESCRITO  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :  
MA. GUADALUPE MARTINEZ SANCHEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA IE CR-GEN

1991.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Contenido

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCION .....   | 5  |
| CELULAS PROGENITORAS DE MEGACARIOCITOS .....                           | 5  |
| EL MEGACARIOCITO .....   | 7  |
| POLIPLOIDIA .....  | 7  |
| REGULACION HUMORAL DE LA MEGACARIOCITOPOYESIS .....                    | 8  |
| LA INTERACCION DE MONOCITOS Y CELULAS T EN LA REGULACION .....         | 10 |
| EFFECTO DE ALTAS DOSIS DE ERITROPOYETINA HUMANA EN LA MK-POYESIS ..... | 11 |
| MEGACARIOCITOPOYESIS EXTRAMEDULAR .....                                | 12 |
| ANALISIS MULTIVECTORIAL EN LA DIFERENCIACION DEL MEGACARIOCITO .....   | 13 |
| CINETICA PLAQUETARIA .....   | 13 |
| CONCLUSION .....   | 17 |
| BIBLIOGRAFIA .....   | 17 |

## **INTRODUCCION**

El entendimiento del proceso de maduración y cinética plaquetaria se ha ido dilucidando paulatinamente lo cual ha permitido aplicar tanto en el área de investigación básica como clínica los conocimientos obtenidos, sobre todo en lo relacionado a trastornos que afectan la megacariocitopoyesis como son: leucemia mielocítica crónica, policitemia vera, trombocitemia esencial maligna, mielofibrosis con metaplasia mielóide agnógena, síndrome mieloproliferativo, síndrome mielodisplásico, anemia refractaria con exceso de blastos-variantes y mieloaplasi.

Los mecanismos de producción de plaquetas incluyen a una célula pluripotencial denominada célula madre mielóide (CMM) presente en la médula ósea que posee capacidad de autopertuación y diferenciación polidireccional. Este último aspecto está condicionado por la presencia de agentes estimulantes de diferenciación, para los cuales la CMM tiene receptores a nivel de membrana. Una vez que ocurre la interacción entre el agente y el receptor, la célula pluripotencial se compromete a una línea celular específica, que concluirá con la producción de elementos formes maduros (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas). Con respecto a los factores estimulantes de diferenciación hacia la línea megacariocítica se demostró inicialmente que el suero de ratón trombocitopénico tenía actividad trombopoyética, más adelante se encuentra que la fracción beta de las globulinas es en donde se conserva el potencial de estimulación.

La presente recopilación pretende revisar los avances en el área de la regulación megacariocitopoyética cuya identificación a corto o mediano plazo proporcionará las bases de entendimiento acerca de la fisiopatología de los trastornos que afectan la producción de plaquetas y la eventual aplicación como recurso terapéutico de los factores estimulantes de diferenciación y crecimiento celular.

## **CELULAS PROGENITORAS DE MEGACARIOCITOS**

La abundante información existente sugiere que las plaquetas provienen de una estirpe de células pluripotenciales hematopoyéticas, denominadas células madres mieloides. Las cuales presentan las características fundamentales: diferenciación en una variedad de linajes hematopoyéticos y la capacidad de experimentar ella misma su autopertuación. Recientemente dos grupos multicéntricos cuentan con ensayos "in vitro" para observar y desarrollar células progenitoras hematopoyéticas, conocidas como unidades formadoras de colonias de células tronco (CFU-BI), que tienen la capacidad de renovarse a sí mismas y la habilidad de diferenciarse en tipos de células hematopoyéticas diferentes.

Estas células tienen la capacidad de diferenciarse tanto en células progenitoras de megacariocitos como a células progenitoras de otras estirpes hematopoyéticas, diversas evidencias indican que los megacariocitos se originan de una célula común a otros elementos hematopoyéticos. Esto ha sido demostrado cuando células provenientes de médula ósea forman colonias en cultivo las cuales están

en una variedad de elementos celulares entre los que se incluyen: eritrocitos, granulocitos, macrófagos y desde luego megacariocitos.

Estas colonias mixtas derivadas de células progenitoras multipotenciales presentan porcentajes considerablemente menores de componentes con capacidad de autopropagación, ya que la mayoría se encuentran diferenciados a lo largo de la línea de maduración de megacariocitos. Recientemente se emplean sistemas de matriz semisólida adicionados de suero o plasma así como de otros factores que permiten la diferenciación celular para detectar células progenitoras de megacariocitos que tienen la habilidad de formar colonias compuestas exclusivamente de elementos megacariocíticos (26,30).

Existen variaciones importantes en la metodología, pero lo fundamental es el criterio fisiológico y las condiciones o factores que se requieren para el cultivo de células madres mieloides, en las que es posible obtener diferenciación de células progenitoras de megacariocitos, Paulus y col. identificaron tres clases de estos precursores, cuya observación se basa en un análisis de distribución acumulativa del número de núcleos presentes por células progenitoras, los cuales paulatinamente se incrementan a medida que la maduración continúa, aumentando con ello el contenido de DNA celular. Levin así como Long y col. también han observado la existencia de poblaciones de células progenitoras de megacariocitos con diferentes grados de diferenciación, los hallazgos estuvieron basados en la observación de dos tipos de colonias de megacariocitos las cuales presentan francas diferencias en el contenido de DNA. Estos estudios han indicado que no existen clases definidas de células progenitoras, sino que puede pensarse como un proceso de maduración de manera semejante al de otras estirpes hematopoyéticas (13,14,22).

La mayoría de los investigadores que han trabajado en esta área convinieron que la jerarquía de las células progenitoras de megacariocitos existe, pero que una rígida clasificación de tales células presenta una gran dificultad en la identificación de estados a lo largo del esquema de diferenciación. El valor práctico de la identificación resulta de utilidad en la clasificación morfológica de entidades malignas como: la leucemia megacarioblastica o la trombocitemia esencial maligna, patologías en las que el desarrollo del megacariocito está retenido o alterado.

Actualmente se han descrito tres clases de células progenitoras bien identificadas, que al evolucionar producen unidades formadoras de megacariocitos como son: la unidad formadora de brotes (BFU-MK), la unidad formadora de colonias de megacariocitos (CFU-MK) y una tercera que ha sido identificada por el análisis con citómetros de flujo la que presenta diferente densidad al cruzar por un haz de luz y que se le ha denominado unidad formadora de colonias de megacariocitos densas (LD-CFU-MK) (20).

Las primeras han sido detectadas tanto en humanos como en roedores, mientras que la última ha sido recientemente descrita en el ratón. Dentro de estas tres clases de células tronco, la célula progenitora más primitiva del linaje de los megacariocitos es la unidad formadora de brotes (1,4).

Los estudios en medios semisólidos han logrado establecer las bases tempranas de diferenciación, sin embargo la identificación morfológica de estos estados no ha sido posible, a este respecto Gregory fue el primero en describir una línea celular megacariocítica obtenida de médula ósea de ratas, estas células exhibieron un bajo grado de poliploidia por lo que fue necesario el empleo de marcadores plaquetarios tales como receptores para el factor Von Willebrand, fibrinógeno, o la

presencia del factor plaquetario 4, todos estos marcadores resultaron negativos, pero una determinación de acetilcolinesterasa permitió diferenciar estados previos tales como unidades formadoras de colonias de megacariocitos o unidades formadoras de brotes de megacariocitos. Posteriormente se han usado otras pruebas inmunológicas (suero antiplaqueta) o enzimáticos (reacción de peroxidasa) (9,17).

Al continuar la línea de maduración el promegacarioblasto produce el megacarioblasto que ya es reconocido morfológicamente por su gran tamaño, basofilia citoplasmática y núcleo no lobulado. A medida que evoluciona esta célula sintetiza constituyentes citoplasmáticos por lo que es posible observar el aparato de Golgi, paulatinamente la basofilia citoplasmática va siendo sustituida por la síntesis proteica que se caracteriza por la variación tintorial del citoplasma ante colorantes policromatófilos, el núcleo también denota una gran actividad denominada poliploidia.

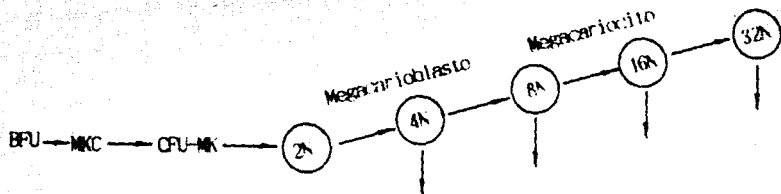
## *EL MEGACARIOCITO*

El proceso de maduración desemboca en el megacariocito el cual debido a su gran tamaño y a su núcleo lobulado son morfológicamente identificados con relativa facilidad a nivel de médula ósea. La maduración del megacariocito es un proceso de desarrollo continuo separado por etapas reconocidas por un criterio meramente morfológico en el que las características nucleares y sobre todo las citoplasmáticas tales como (la basofilia y la policromatofilia) permiten valorar el grado de maduración.

La primera línea celular megacariocítica descrita fue aislada de rata siendo una línea celular de elementos denominados promegacarioblastos provenientes de médula ósea. Esta línea celular fue demostrada y se encontró que estos elementos exhibieron un bajo grado de poliploidia a la vez que se emplearon marcadores específicos de plaquetas como los ya mencionados (35).

## *POLIPLOIDIA*

El inicio de la megacariocitopoyesis esta caracterizada por una serie de divisiones mitóticas de las células progenitoras, las cuales son seguidas por una fase de duplicación de DNA pero sin división citoplasmática, de esta manera los megacariocitos tienen valores poliploides de 4N, 8N, 16N, 32N, etc. (21).



La cantidad del material nuclear del megacarioblasto y del megacariocito están en relación directa con la cantidad de plaquetas producidas. Este hecho ha sido apoyado por Queisser quien observó en pacientes trombocitopénicos que el grado de ploidía era bajo en los megacariocitos traduciendo esto con una baja cantidad de plaquetas producidas, sin embargo estas eran gigantes dado que el tiempo de maduración estaba acortado (24).

Mazur y col. demostraron que cultivos semisólidos adicionados de bajas concentraciones, de proteínas séricas proveniente de perros aplásicos produce un incremento tanto en el número de colonias como de los valores poliploides de los megacariocitos obtenidos en dichas colonias. Concentraciones más elevadas del suero estimularon la aparición de un número mayor de colonias, pero con una disminución inesperada en la ploidía del megacariocito. Debido probablemente a la presencia de inhibidores de la poliploidización. Estos datos sugieren que la relación entre la proliferación y la poliploidización es inducida por factores humorales que pueden dependiendo de su concentración promover o disminuir estos procesos "in vitro" (18).

## REGULACION HUMORAL DE LA MEGACARIOCITOPOYESIS

Los estudios de una variedad de modelos animales sugieren que la producción de plaquetas está condicionada por factores humorales. La inducción de trombocitopenia en el roedor ya sea por el uso de un suero antiplaquetario o por técnicas de exsanguíneo transfusión con sangre pobre en plaquetas está acompañada por un incremento en la cantidad, tamaño y en el contenido de DNA de los megacariocitos de la médula ósea, así que al poco tiempo del exsanguíneo transfusión los ratones cursaron con trombocitopenia y paulatinamente los valores de plaquetas se van incrementando, pioneros en este campo de la regulación hormonal de la megacariocitopoyesis se encuentran incluidos investigadores como Ebbe, Levin entre otros. También es importante mencionar que los citados autores han proporcionado el impulso para caracterizar y purificar a este factor que estimula la producción de plaquetas "in vivo" (5,13,18).

Muchos laboratorios se han esforzado por caracterizar al llamado factor de estimulación de la trombopoyesis (TSF o trombopoyetina), el cual puede ser una molécula candidata para regular la producción de plaquetas. Los investigadores se han referido a este compuesto como una molécula con actividad potenciadora de los megacariocitos y factor estimulante de la trombocitopoyesis (27,34).

Aunque todavía es incierto si tal molécula existe, la información obtenida de los estudios con otros linajes hematopoyéticos hace probable la existencia de la trombopoyetina. Es conveniente señalar que estudios realizados con plasma proveniente de animales a quienes se les ha inducido trombocitopenia por la administración de suero antiplaquetas, irradiación o trombocitoferesis inducen una acelerada producción de plaquetas cuando son infundidos en animales normales (15).

En los estudios iniciales, el efecto de la trombopoyetina fue monitorizado por cuentas plaquetarias efectuadas en los animales de prueba pero los resultados fueron poco consistentes por lo que fue necesario el desarrollo de métodos más adecuados para cuantificar el efecto de la trombopoyetina tales como el índice mitótico (2N, 4N, etc) del megacariocito o la incorporación de sulfato ( $^{35}\text{S}$ ) o seleniometionina ( $^{75}\text{Se}$ ) a los megacariocitos o a las plaquetas circulantes. También han sido empleados inmunoensayos para cuantificar la trombopoyetina (16).

A pesar de las evidencias encontradas en estos estudios, el sitio de producción y conformación molecular de esta sustancia de naturaleza hormonal permanece desconocido. Sin embargo se sabe que en el estudio electroforético migra como una  $\alpha_2$  globulina, contiene carbohidratos y es termoestable (31).

Intuitivamente uno espera que un proceso vital para la sobrevivencia como es la producción de plaquetas no sea regulado exclusivamente por un solo mecanismo, sino que existan otras situaciones promotoras entre las que se mencionan a las citosinas. La hipótesis que persiste desde hace 25 años menciona que para la producción de plaquetas es indispensable la interacción del megacariocito con factores de crecimiento altamente específicos, aunque es probable que esta hipótesis sea correcta, no se ha aclarado totalmente de que manera y que tipo de citosinas modifica los cultivos celulares, existen algunos como la eritropoyetina que influye predominantemente en linajes hematopoyéticos particulares, como la eritropoyesis. Sin embargo la confirmación de la existencia de factores de crecimiento específicos del megacariocito sigue siendo una búsqueda constante. La respuesta a esta interrogante podrá ser adecuada cuando la citosina responsable sea purificada y se determine su secuencia de aminoácidos establecidos, peso molecular, sitios de producción, etc.

Varios grupos de investigadores han presentado un número importante de datos que sugieren que el proceso de producción de plaquetas esta regulado por uno o más factores de distinta influencia a lo largo del esquema de desarrollo de los megacariocitos. Levin demostró que no hubo cambio en el estudio de unidades formadoras de colonias de megacariocitos de médula ósea luego de los 14 días después de la inducción de la trombocitopenia en roedores, sin embargo se presentaron cambios en cuanto a tamaño, número y segmentación de los megacariocitos (13).

El grupo determina que el factor estimulante de megacariocitos selectivamente favorece la formación de colonias de estos elementos y que un factor adicional, al que se le denomina factor potenciador del megacariocito, influencia la maduración de esta estirpe. La hipótesis de que la



megacariocitopoyesis esta regulada por factores distintos actuando a niveles diferentes de desarrollo celular ha proporcionado realmente una serie de argumentos para la investigación de la regulación humoral de la megacariocitopoyesis.

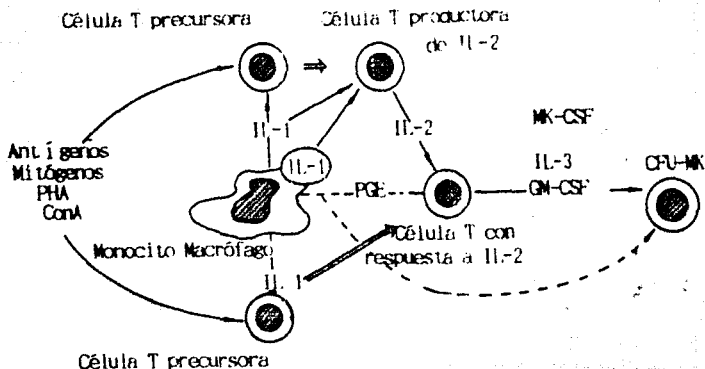
En la regulación de las tres líneas celulares hemáticas se ha demostrado que no sólo participan activadores en la proliferación celular sino también inhibidores. La posibilidad de que tales reguladores negativos de la megacariocitopoyesis puedan estar actuando durante la megacariocitopoyesis, fue inicialmente señalada por los estudios de Vainchenker y Solberg. Estos investigadores independientemente observaron que la formación de colonias del megacariocito, fueron más eficaces cuando se empleó plasma humano, en lugar de suero, como un componente de cultivo en unidades formadoras de colonias de megacariocitos en los ensayos clonales. Estos autores sugirieron que las plaquetas pueden ser una fuente productora de inhibidores en la regulación de las citadas colonias. Estos estudios han proporcionado las bases para intentar identificar tales moléculas inhibitorias. También es bien sabido que la hipertransfusión de plaquetas produce disminuciones en cuanto a tamaño, ploidía y en cantidad de megacariocitos; un fenómeno que anteriormente se pensó que estuviera relacionado con la supresión en la producción de la trombopoyetina. En resumen se ha establecido que la megacariocitopoyesis se ve abatida debido a derivados de plaquetas inhibidores del desarrollo del megacariocito (25,28).

## ***LA INTERACCION DE MONOCITOS Y CELULAS T EN LA REGULACION***

Se sabe hace algún tiempo que los linfocitos T, presentes en la sangre periférica pueden estimular a la célula progenitora del megacariocito humano cuya formación de colonias es dependiente de la activación de estos componentes. Así mismo bajas cantidades de monocitos y células T pueden colaborar en la estimulación de las unidades formadoras de colonias de megacariocitos o en la producción del factor estimulante de los mismos (CSF-MK), las células T en presencia de mitógenos como la fitohemaglutinina son activadas y liberan la interleucina 2 (IL-2) que actúa como un activador para la síntesis del factor estimulante de la megacariocitopoyesis, también es importante señalar el hecho de que los monocitos producen en condiciones fisiológicas pequeñas cantidades de interleucina 1 y como se aprecia en el esquema de interacción de monocitos y células T, esta es otra vía para que los linfocitos T elaboren el citado factor estimulante. Lo anterior ha sido observado en crecimiento de colonias de megacariocitos que demuestran un aumento comparado con el estímulo dado sólo por células T. Además algunos datos sugieren que existe una interacción sinérgica entre células T y monocitos, durante la producción del factor estimulante de megacariocitos por las células T pueden ser indirectamente medidas por las concentraciones de IL-1 e IL-2, las cuales se elevan en ausencia de mitógenos. Aunque también se menciona que altas concentraciones de monocitos y prostaglandina E (PGE1) inhibieron la formación de colonias de megacariocitos. Estos resultados sugieren que IL-1 e IL-2 pueden jugar un papel muy importante durante la regulación de la megacariocitopoyesis normal en el humano (1,8,12,29).

Se ha mencionado que el monocito produce muy poca interleucina 1, pero durante enfermedades infecciosas y sobre todo en procesos inflamatorios son capaces de elaborar concentraciones

importantes de la citosina, esta juega un papel importante en la gestación de fenómeno trombótico en varias enfermedades inflamatorias. Sin embargo la presencia de monocitos a altas concentraciones inhibieron el crecimiento de las unidades formadoras de colonias de megacariocitos probablemente a través de la producción de PGE<sub>1</sub>. Un mecanismo regulador similar por monocitos y PGE<sub>1</sub> ha sido observado en la formación de colonias eritroides (6,7).



## EFECTO DE ALTAS DOSIS DE ERITROPOYETINA HUMANA EN LA MK-POYESIS

En ciertas condiciones clínicas como en la anemia hemolítica esta se encuentra asociada con trombocitosis, el mecanismo natural no ha sido del todo aclarado se sabe que la eritropoyetina (EPO) es el regulador humoral más importante de la eritropoyesis, también se ha demostrado que en algunos estudios "in vivo" e "in vitro", la estimulación de la megacariocitopoyesis y la producción de plaquetas esta condicionada por esta hormona. Estos estudios sugieren que el efecto trombopoyético durante la anemia esta mediado por la eritropoyetina, sin embargo los resultados de estas observaciones han sido controversiales ya que otros ensayos no han señalado ningún efecto de eritropoyetina sobre las unidades formadoras de colonias de megacariocitos y plaquetas (11).

El empleo de radioisótopos tales como el <sup>75</sup>Se, y el <sup>35</sup>S, han demostrado su incorporación en forma de seleniometonina o en forma de sulfatos. Esto ha ocurrido a nivel plaquetario en animales de experimentación lo cual ha sido usado como una medida de actividad trombopoyética. Dado que los radioisótopos no estan incorporados exclusivamente dentro de los organelos citoplasmáticos de la plaqueta sino más bien marcando a todas las proteínas sintetizadas "de novo" varias investigaciones indicaron que los ensayos de los sistemas con radioisótopos también pueden ser usados como una medición indirecta de la actividad trombopoyética.

Es conocido que la esplenectomía es seguida por una trombocitosis, Williams señaló que la extirpación del bazo permite el incremento de la trombopoyesis al ser expresada por una elevación en la cuenta de plaquetas en un estudio realizado (32,33).

Además, con el objeto de esclarecer la función de la eritropoyetina en la megacariocitopoyesis así como en la producción de plaquetas, se han investigado los efectos "in vivo" de la eritropoyetina humana en ratones esplenectomizados, que además presentaban órganos esplénicos accesorios así como en ratones normales. Cuando los ratones esplenectomizados fueron inyectados con 50 U de la EPO durante 4 días la cuenta de plaquetas periférica, el tamaño de los megacariocitos y el porcentaje de los mismos pero en (fase IV'), denotaron un incremento desde el primer día después de la inyección inicial de la EPO.

El número total en médula ósea de unidades formadoras de colonias de megacariocitos aumentaron del segundo al cuarto día posteriores a la inyección inicial, por otra parte del día sexto al octavo el número total de los megacariocitos en médula ósea también aumentó.

En resumen cuando la dosis de la EPO fue aumentada de 20 a 200 U por ratón, la respuesta a la dosis fue detectada como un incremento de las plaquetas y en el número de megacariocitos. Cuando los ratones con órganos esplénicos accesorios y ratones normales fueron inyectados con la EPO, no se detectó ningún cambio significativo en el número de plaquetas. El número de megacariocitos, el tamaño de los mismos y el número de unidades formadoras de colonias aumentaron únicamente en el bazo, no en la médula ósea. Estos datos indican que la EPO tiene efectos estimulantes en la producción "in vivo" de plaquetas. Actualmente existen patologías hematológicas en cuyo tratamiento se incluye la EPO y se valora su efecto tanto sobre hemáties como en la estimulación de producción de plaquetas (6).

## ***MEGACARIOCITOPOYESIS EXTRAMEDULAR***

La médula ósea es a menudo considerada como el sitio más adecuado para la producción de plaquetas. Como se ha mencionado los megacariocitos son productores de plaquetas a lo largo de los diferentes estados de maduración. Durante este proceso el citoplasma se ve paulatinamente disminuido. El megacariocito en estas condiciones puede dejar la médula y viajar por sangre venosa a la circulación pulmonar, donde culminara su madurez. Generalmente sólo el núcleo de los megacariocitos desprovistos de citoplasma deja la red capilar de los pulmones. La pérdida del citoplasma de los megacariocitos en este órgano sugiere un sitio de alternativa para la formación de plaquetas.

Aunque en el período fetal, el pulmón de los productos no es funcional se ha sugerido que la producción de plaquetas ocurra en esta edad a nivel placentario. Para el estudio de la morfología de los megacariocitos se han usado membranas semipermeables de policarbonato con diámetros de 50 milimicras, de esta manera se ha aislado de la circulación sanguínea a los megacariocitos. En estos estudios la sangre fue filtrada por sedimentación después de incubación a 37°C. La morfología de la célula fue examinada por microscopía de luz después de una tinción policromatofila. También algunas membranas fueron procesadas para estudios por microscopía electrónica, después de su fijación inicial de células en glutaraldehído al 3%. Durante el proceso

de separación de los megacariocitos del resto de los elementos sanguíneos no requirió de agentes líticos, la mayoría de las células pasan a través de las membranas, pero los megacariocitos si fueron retenidos. En el exámen de varios filtrados no se encontraron estos precursores aunque si fue posible obtener núcleos de megacariocitos que fueron recuperados en sangre venosa de individuos normales. Megacariocitos con abundante citoplasma fueron encontrados en sangres tomadas de arterias umbilicales en recién nacidos. Las observaciones preliminares sugieren que la filtración de sangre a través de las membranas semipermeables resultan un eficiente método de obtención de megacariocitos circulantes. Además se ha demostrado que estas células presentan una importante capacidad productora de plaquetas y que los pulmones son un sitio importante de maduración de las mismas (38).

## ***ANALISIS MULTIVECTORIAL EN LA DIFERENCIACION DEL MEGACARIOCITO***

El término cinética plaquetaria se refiere al ritmo de producción, distribución y vida media de las plaquetas; su conocimiento es importante por la aplicación en el entendimiento de trastornos tanto cualitativos como cuantitativos de dichos elementos. Los intentos iniciales para referirse a la citocinética de la diferenciación del megacariocito fueron dominadas por esquemas de la clasificación morfológica, las limitaciones severas impuestas por una carencia de datos básicamente cuantitativos, más que en mecanismos celulares y regulatorios son reconocidos universalmente. Durante los últimos 10 años se ha trabajado para superar este dilema central por una nueva combinación metodológica que consiste en la separación cuantitativa de megacariocitos y técnicas de análisis de células únicas (cariotipo, contenido de DNA, etc). Dentro de los estudios también se han incluido modificaciones de centrifugación diferencial y separación por gradientes de densidad, que permite la rápida colección de una cantidad importante y bastante homogénea de megacariocitos provenientes de la médula ósea, posterior a la separación las células son marcadas con isótopos múltiples de DNA cuya actividad se refleja en el contenido de proteínas tanto citoplasmáticas como estructurales o bien por la valoración de actividades metabólicas de dichas proteínas. El conjunto de exámenes han sido analizados multivectorialmente. Este acercamiento tiene un apoyo substancial en la nueva información que soporta ambos conceptos derivados del papel de la poliploidización en la formación de plaquetas (19).

## ***CINETICA PLAQUETARIA***

Al igual que los demás elementos mieloides, las plaquetas son producidas a partir de una célula madre mielóide y cuyas características son la pluripotencialidad y la capacidad de autopropagación, se localizan en la médula ósea y en presencia de un factor específico inician su diferenciación hacia una línea celular determinada. El estímulo necesario para la producción de eritrocitos es ampliamente conocido, se trata de una sustancia de naturaleza hormonal a la que se le denomina eritropoyetina, de igual manera el organismo cuenta con otros factores necesarios para la leucopoyesis, pero la naturaleza de estas sustancias aún es controvertida. Con respecto a la

diferenciación de la célula madre mielóide hacia la línea de las plaquetas, se requieren también factores reguladores de la trombopoyesis.

Varios autores han observado que el crecimiento de colonias megacariocíticas (CFU-MK) en medio semisólido, requieren eritropoyetina o condiciones mediadas con suspensiones de células del bazo tratadas con lectina o con extractos de células leucémicas mielomonocíticas WEHI-3 (línea celular obtenida en ratones) aunque estos últimos actúan sólo como un potenciador ya que por sí mismo no presentan actividad (33).

El papel de la eritropoyetina en la producción de plaquetas, se sugiere por la actividad que muestran algunas preparaciones purificadas de esta hormona en la formación de colonias megacariocíticas y por la demostración de la actividad trombopoyética presente en el plasma de animales anémicos. Por otra parte, la trombopoyetina es una sustancia capaz de estimular específicamente la producción de plaquetas, esta hormona ha sido demostrada en el plasma de animales trombocitopénicos, en ratones tratados con vincristina y de ratones S1.S1<sup>d</sup>. La administración de trombopoyetina "in vivo" activa la diferenciación de megacarioblasto a megacariocito en presencia de trombocitopenia, mientras que "in vitro" son requeridos algunos de los agentes potenciadores mencionados anteriormente (6).

En base a los ensayos de trombopoyetina realizados en el sobrenadante de células de riñón humano, se ha considerado a este órgano como el sitio de síntesis, sin embargo en pacientes nefrectomizados o anéuricos se ha encontrado un factor fisiológicamente idéntico al del riñón pero inmunológicamente diferente, lo cual sugiere otros sitios de producción de la trombopoyetina. Además de los factores mencionados se pueden citar otros como los esplénicos, que también son denominados específicos y que actúan como inhibidores o reguladores de la producción, ya que en pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) la esplenectomía es la solución. Otros factores no específicos, como las hormonas estrogénicas ocasionan una marcada disminución en el número de plaquetas durante el ciclo menstrual, en tanto que la albúmina de huevo inyectada en ratas, así como en algunos procesos inflamatorios aumentan el nivel de plaquetas (3).

Una vez que la célula madre mielóide entra en contacto con los factores necesarios, se inicia la producción de plaquetas. En esta línea de maduración el primer elemento reconocible es el promegacarioblasto cuyo marcador es la llamada poliploidia (división nuclear sin división citoplasmática) o más recientemente se ha empleado de la tinción para acetilcolinesterasa, el cual ha revelado un excelente método de identificación. El aspecto morfológico de este elemento, es muy parecido al resto de los elementos que conforman la serie mielóide, esta célula después de una breve serie de divisiones mitóticas da lugar al megacarioblasto el cual es reconocido por su gran tamaño, citoplasma basófilo, muestra también poliploidia y comúnmente contiene 16 veces el DNA haploide. Estas células son capaces de incorporar timidina tritiada lo cual es indicativo de una actividad nuclear, en este estado se producen muy pocas membranas de demarcación y escasos gránulos específicos. Hay también incorporación de sulfatos en los mucopolisacáridos siendo concentrados en el aparato de Golgi, lo que serán los gránulos alfa. Al igual que en los megacariocitos se realiza síntesis de proteínas de transporte y un incremento en la concentración de acetilcolinesterasa para la posterior secreción extracelular, estos componentes al igual que otros, son producidos y ensamblados en el complejo de Golgi, el cual está unido a un sistema retículoendoplásmico y a este nivel ocurre la aparición de lisosomas primarios. Continuando en la

línea de maduración megacariocítica están el promegacariocito y megacariocito a los que también se les conoce como estado II o megacariocito basófilo y el estado III o megacariocito acidófilo respectivamente. Los cambios morfológicos que se presentan a nivel nuclear y en la actividad citoplasmática son debidos a un aumento inicial de RNA (megacariocito basófilo) y a los gránulos azurófilos; paulatinamente, el RNA es traducido al lenguaje diferente de aminoácidos con pérdida de la afinidad tiorial por los colorantes básicos así como eosinofilia debido a la síntesis de gránulos densos ricos en actina y miosina, fibrinógeno, factor VIII R: Ag, factores 3 y 4 plaquetarios, serotonina, beta tromboglobulina y glicoproteínas entre las más importantes. Morfológicamente se producen cambios como son en la zona de demarcación de la membrana de la futura plaqueta a través de un sistema canalicular que determina el tamaño de la plaqueta, el cual al parecer esta condicionado por el grado de poliploidía del megacariocito así mismo se ha observado una relación inversa entre el tamaño y el número de sus constituyentes (31).

El proceso de maduración de la serie megacariocítica es aproximadamente de 3 días en ratas y conejos, pero a juzgar por el tiempo requerido para recuperarse de una depresión aguda de plaquetas en el humano, esta puede ser de 4 a 5 días. Mediante el método de dilución de sideroblastos se ha encontrado que la médula ósea contiene cerca de  $6 \times 10^6$  megacariocitos por kilogramo de peso corporal; este número puede también ser calculado por la incorporación de hierro en una porción de médula ósea. El rango de producción de plaquetas sólo puede ser estimada indirectamente por la determinación del recambio de plaquetas en sangre periférica en la que varios autores obtuvieron datos que fluctúan entre 35,000 y 66,000 plaquetas producidas por microlitro de sangre por día. Se debe señalar que la producción de estos elementos puede ser también extramedular sobre todo en el pulmón, pero esta fracción no es mayor del 12%.

La liberación de las plaquetas esta también condicionada por estímulos específicos e inespecíficos. En este proceso, el citoplasma del megacariocito se invagina entre los espacios de las células endoteliales, el citoplasma fluye hacia los sinusoides y eventualmente se separa el cuerpo del megacariocito y se dirige a la microcirculación de la médula ósea, el resto del megacariocito fundamentalmente el núcleo es degradado por fagocitosis. En sangre periférica la vida media de las plaquetas ha sido medida por seguimiento de cuentas plaquetarias después de la transfusión en pacientes trombocitopénicos o por la medición de la desaparición de plaquetas marcadas con isótopos radiactivos. Durante las primeras observaciones, en las que se emplearon jeringas de vidrio siliconizadas sin anticoagulante, la vida media fue de 2 a 6 días en pacientes con defectos en la producción sin previa transfusión o embarazo. Estudios más recientes en los que se emplearon plasma rico en plaquetas o concentrados plaquetarios, adecuadamente anticoagulados y provenientes de donadores normales, el promedio fue de 8 días. La mayor recuperación de las plaquetas transfundidas se expresa como el cociente del total de plaquetas circulantes entre el número de plaquetas transfundidas, en donde el número de plaquetas circulantes se calcula en base al volumen sanguíneo, el cual se considera como el 7% de peso corporal. Sin embargo la sobrevida puede no ser representativa pues el comportamiento es diferente en sujetos trombocitopénicos y en individuos normales, ya que en los primeros su patología cursa con incremento en su consumo. Con respecto a la sobrevida de plaquetas marcadas con isótopos radiactivos, se han encontrado variaciones entre 8 y 12 días, en condiciones normales existe un adecuado balance entre el número producido y el destruido, en individuos sanos la producción de plaquetas por día esta entre 30,000 y 40,000/mm<sup>3</sup> (36).

Los estudios iniciales de sobrevida plaquetaria sobre todo con  $^{51}\text{Cr}$  en pacientes con trombocitopenia debida a un aumento en la destrucción la vida media se encontró acortada en proporción al grado de trombocitopenia (10).

Con creciente interés se ha tendido a descartar diferencias por mínimas que estas sean en los estudios de sobrevida, por ejemplo es necesario evaluar efectos debidos a enfermedad vascular, dieta o drogas, por esto se han aplicado métodos de evaluación como son los análisis matemáticos usando tanto curvas lineales de sobrevida como logarítmicas (vida media dividida entre el log natural de 2), los datos son analizados por computadora con lo cual se elimina considerablemente variaciones debidas a secuestro, utilización, manipulación, heterogeneidad en la edad de las plaquetas (10).

En cuanto al consumo de las plaquetas, también ha sido estudiada con el empleo de isótopos radiactivos (Diisopropilfluorurofosfato,  $^{32}\text{P}$ -DFP) detectando actividad en las paredes del endotelio a los 30 minutos (métodos de histiorradiografía combinada con microscopia electrónica), en otros sitios como el bazo e hígado se detectan porcentajes entre el 15 al 40% y una mínima cantidad perecen por desvitalización (senectud). Cuando las plaquetas son marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  y transfundidas en personas normales, sólo cerca de 2/3 partes permanecen en circulación, en tanto que casi el 100% pueden ser recobradas en sujetos esplenectomizados, lo que sugiere que la distribución de plaquetas es afectada por el bazo, este órgano mantiene un "pool" que representa 1/3 parte de la masa plaquetaria en la circulación general. Sin embargo los mecanismos de formación de este "pool" son inciertos, las partículas menores a 2 ó 3 micras de diámetro tienden a pasar la pulpa roja y de ahí a los cordones esplénicos, este es un camino más tortuoso que los sinusoides esplénicos generalmente utilizado por los eritrocitos, esto da como resultado un tránsito mas lento de las plaquetas que el resto de los elementos formes de la sangre, se ha calculado que el tiempo promedio en este órgano es de 8 a 10 minutos (2).

En estudios de microscopia electrónica, se ha demostrado un número considerable de plaquetas adheridas a la superficie de células reticulares en los cordones esplénicos, así como en las células endoteliales de los sinusoides, al parecer la adhesividad es un factor que condiciona su paso a través del citado órgano. El compartimiento esplénico aparentemente no tiene significancia pero en trastornos caracterizados por esplenomegalia el 80 ó 90% de la masa plaquetaria puede estar retenida en el bazo ocasionando trombocitopenia en la circulación periférica. Las plaquetas recientemente formadas son más efectivas durante la hemostasia, que las plaquetas cuyo promedio de edad es mayor. Esto se ha fundamentado por las observaciones clínicas y por estudios "in vivo" en los que las plaquetas jóvenes se obtuvieron por inducción de trombocitopenia inmunológica y suprimida posteriormente, las plaquetas seniles se colectaron de ratones irradiados en médula ósea, cada uno de estos "pooles" fue transfundido en ratones trombocitopénicos y se encontró que las plaquetas jóvenes circulaban por más tiempo que las más viejas, de esto se puede deducir que la senectud es un factor determinante en la eliminación de las plaquetas por el sistema reticuloendotelial (31).

Existe suficiente información de las diferencias funcionales, físicas y bioquímicas entre las poblaciones normales de plaquetas jóvenes y viejas. En base a estudios de centrifugación diferencial, recuento electrónico y tamaño de las células, se ha visto que las plaquetas más jóvenes son más grandes y progresivamente disminuyen de volumen con la edad. Las diferencias bioquímicas entre

las plaquetas grandes-pesadas y pequeñas-ligeras son significativas en cuanto a concentraciones de glucógeno, proteínas, fosfolípidos y colesterol encontrándose siempre en mayor cantidad en las células más jóvenes. Estructuralmente, las jóvenes presentan mas gránulos densos, mitocondrias y sistema canalicular. Las diferencias en la obtención de energía son muy notorias, ya que en las ligeras la actividad funcional como es la capacidad de respuesta a estímulos agregantes, liberación de los factores 3 y 4 y a la capacidad de adhesividad a colágena esta disminuida, en tanto que las plaquetas jóvenes hemostáticamente son más activas.

Finalmente es importante recordar que es posible encontrar variaciones fisiológicas en la formación de plaquetas. Se sabe que los valores de plaquetas en un hombre adulto oscilan entre 150,000 y 400,000 mm<sup>3</sup> ligeros incrementos fisiológicos han sido reportados en sangre arterial durante la ovulación se observan moderados aumentos seguidos de una caída progresiva durante los 14 días previos a la menstruación. Otras situaciones como el ejercicio vigoroso o variaciones en la altitud producen aumento en el número de plaquetas.

La evaluación clínica de la cinética plaquetaria posterior a la transfusión terapéutica de estas células de ordinario no son necesarias para establecer un adecuado seguimiento del tratamiento con dichos elementos, sin embargo el conocimiento obtenido acerca de la dinámica plaquetaria proporciona excelentes fundamentos en las decisiones clínicas.

## **CONCLUSION**

Este trabajo intenta resumir las investigaciones recientemente realizadas en una gran cantidad de laboratorios. La mayoría de los estudios estan orientados para obtener información sobretodo dirigida a la regulación de la megacariocitopoyesis. Esta proliferación de información es facilitada por la aplicación de muchas metodologías novedosas en este campo. Todo este esfuerzo ha conducido a la producción y purificación de factores estimulantes además del dominio del área cognoscitiva de la cinética plaquetaria. Si se continua con este esfuerzo durante la presente década con seguridad se daran resultados que conduzcan a la identificación de factores o moduladores estimulantes del crecimiento, relevante en la fisiología de las poblaciones celulares.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Bagby, G. C., Rigas, V. D., Bennett, R. M., Vandebark, A. A. and Garewal, H. S.: Interaction of lactoferrin, monocytes and T lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis in vitro. *J. of Clin. Invest.* 68: 56-63. (1981)
- 2.- Bithel, T. C. and Athens, J. W.: Radioactive diisopropylfluorophosphate as a platelet label. *Blood.* 29: 354-359. (1977)
- 3.- Branchög, I. and Kutti, J.: The relation of thrombokinetics to bone marrow megacaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Blood.* 45: 551-555. (1975)



- 4.- Chatelain, C., De Bast, M. and Symann, M.: Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M). *Blood*. 72: 1187-1191. (1988)
- 5.- Ebbe, S., Stohlman, F. Jr., Donovan, J. and Overcash, J.: Megakaryocytic maturation rate in thrombocytopenic rats. *Blood*. 32: 787-790. (1968)
- 6.- Ebbe, S., Phalen, E. and Howard, D.: Parabiotic demonstration of a humoral factor affecting megakaryocytes size in S1/S1 mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 158: 637-641. (1978)
- 7.- Enokikara, I. L., Furusawa, S., Kajitani, H., Saito, K., Fukuda, T. and Shishido, I. L.: Interleukin 2 stimulates the T cells from patients with eosinophilia to produce CFU-Eo growth stimulating factor. *Br. J. Haematol.* 69: 431-433. (1988)
- 8.- Estrov, Z., Rolfman, C., Wang, Y. P., Grunberger, T., Gelfand, E. W. and Freedman, M. H.: The regulatory role of interleukin 2- responsive T lymphocytes on early and mature erythroid progenitor proliferation. *Blood*. 67: 1607-1610. (1986)
- 9.- Gregory, C. J.: Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture. *J. Cell. Physiol.* 89: 289-293. (1976)
- 10.- Hanson, S. and Harker, L. A.: Simultaneous Cr- platelet survival measurements. *Thromb. Haemost.* 38: 140-147. (1977)
- 11.- Hirsh, J. and Dacie, J. V.: Persistent post splenectomy thrombo-embolism: a consequence of continuing anaemia. *Br. J. Hematol.* 12: 44-53. (1966)
- 12.- Kunz, L., Löhr, G. W. and Fauser, A. A.: Lymphokine (s) from isolated T lymphocyte subpopulations support multilineage hematopoietic colony and megakaryocytic colony formation. *Blood*. 68: 991-995. (1986)
- 13.- Levin, J.: Murine megakaryocytopoiesis in vitro: an analysis of culture systems for study of megakaryocyte colony forming cells and of the characteristics of megakaryocytic colonies. *Blood*. 61: 817-821. (1983)
- 14.- Long, M. W., Williams, N. and McDonald, T. P.: Immature megakaryocytes in the mouse: in vitro relationship to megakaryocyte progenitor cells and mature megakaryocytes. *J. Cell. Physiol.* 112: 339-343. (1982).
- 15.- McDonald, T. P.: Assays for thrombopoietin. *Scand. J. Haematol.* 18: 5-9. (1977)
- 16.- McDonald, T. P.: Immunoassay and bioassay for thrombopoietin utilizing mice in rebound thrombocytosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 44: 1006-1013. (1973)
- 17.- Mayer, M., Schaefer, J. and Queisser, W.: Identification of young megakaryocytes by immunofluorescence and cytophotometry. *BWT*. 37: 265-269. (1978)
- 18.- Mazur, E. M., Cohen, J. L., Wong, G. G. and Clark, S. C.: Modest stimulatory effect of recombinant human GM-CSF on colony growth from peripheral blood human megakaryocyte progenitor cells. *Exp. Hematol.* 15: 1128-1133. (1987)

19.- Nakeff, A.: Multivectorial analysis of megakaryocytic differentiation. *Semin. Thromb. Hemost.* 13: 228-231. (1987)

20.- Nakeff, A. and Daniels-McQueen, S.: In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor colony forming unit megakaryocyte (CFU-M). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151: 587-592. (1976)

21.- Odell, T. T., Jr. and Jackson, C. W.: Polyploidy and maturation of rat megakaryocytes. *Blood.* 32: 102-107. (1968)

22.- Paulus, J. M.: Kinetics of platelets, megakaryocytes and their precursors, what to measure. *Blood Cells.* 6: 215-219. (1980)

23.- Paulus, J. M., Prenant, M., Deschamps, J. F. and Amar, M. H.: Polyploid megakaryocytes develop randomly from a multicompartmental system of committed progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 4410-4413. (1982)

24.- Queisser, U. and Spiertz, B.: Poliploidization in patients with idiopathic thrombocytopenic. *Br. J. Haematol.* 20: 489-494. (1971)

25.- Solberg, L. A. Jr., Jamal, N. and Messner, H. A.: Characterization of human megakaryocytic colony formation in human plasma. *J. Cell. Physiol.* 124: 67-71. (1985)

26.- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. and Weissman, I. L.: Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Sci.* 241: 58-59. (1988)

27.- Tayrien, G. and Rosenberg, R. D.: Purification and properties of a megakaryocyte stimulating factor present both in the serum free conditioned medium of human embryonic kidney cells and in thrombocytopenic plasma. *J. Biol. Chem.* 262: 3262-3268. (1987)

28.- Vainchenker, W., Kieffer, N., Cramer, E., Vinci, G., Debili, N., Henri, A., Titeux, M., Guichard, J., Mighaie, Z. and Breton-Gorius, J.: Expression of platelet proteins during maturation of human megakaryocytes and of the K562-HEL cell lines, in Levin, R. F., Williams, N., Levin, J. and Evatt, B. L.(eds): *Megakaryocyte development and function.* New York, Liss. 301-306. (1986)

29.- Verma, D. S., Spitzer, G., Johnston, D. A., Beran, M., Zander, A. R. and Mc Credie, K. B. : Monoocyte-macrophago modulation of T lymphocyte-derived colony-stimulating activity elaboration in man. *Scand. J. Haematol.* 28: 254-263. (1982)

30.- Visser, W. H., Bauman, J. G. J., Mulder, A. H., Eliason, J. F. and DeLium, A. M.: Isolation of murine pluripotent hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 59: 1576-1578. (1984)

31.- Williams, J. W.: *Haematology*, 3th. ed., Mc Graw-Hill, New York. 121-132. (1983)

32.- Williams, J. W.: *Haematology*, 3th. ed., Mc Graw-Hill, New York. 1189-1190. (1983)

33.- Williams, N. and Eger, R. R.: Two factor requirement for murine megakaryocyte colony formation. *J. Cell. Physiol.* 110: 101-106. (1982)

- 34.- Williams, N. Gill, K., Yasmeen, D. and McNiece, I.: Murine megakaryocyte colony stimulating factor: its relationship to interleukin-3. *Leuk. Res.* 9: 1487-1491. (1985)
- 35.- Williams, N., Levin, R. F.: The origin development and regulation of megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* 52: 173-177. (1982)
- 36.- Wintrobe, M.: *Clinical Hematology*, 8th. ed., Lea and Febiger, Philadelphia. 383-386. (1981)
- 37.- Woods, M. J., Wagner, B. E., Greaves, M. and Trowbridge, E. A.: The isolation of circulating megakaryocytes. *Blood Cells.* 13: 451-458. (1988)
- 38.- Zukerman, K. and Haak, M.: Mitogen-induced stimulation and supression of erythroid burst promoting activity production by human mononuclear cells. *Br. J. Haematol.* 55: 145-153. (1983)