

CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS PRIMORDIALES GERMINALES MURINAS Y SU RELACION CON LA HEMOPOYESIS

CATALINA C. BIANCHI de DI RISIO, PABLO ARGIBAY

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME), Hospital Italiano, Buenos Aires

Resumen Las células germinales primordiales (PGC) son una población de células positivas a la fosfatasa alcalina, que se suelen observar en embriones de 7.5 días *post coitum* (dpc) y que migran luego por varios tejidos hasta alojarse en las gonadas. La hematopoyesis es un complejo sistema en el cual las células estaminales hemopoyéticas (HSC) se desarrollan a partir de una simple célula multipotente. Las PGC y HSC están reguladas por un conjunto de factores de crecimiento que controlan la proliferación y diferenciación de los mismos. El factor inhibidor leucémico (LIF) es una citoquina que regula la diferenciación y el fenotipo totipotencial de las PGC como también la capacidad proliferativa de las HSC. Recientemente otros factores de crecimiento: factor de células estaminales (SCF), factor macrófágico (MGF) y forskolin (FRSK) han sido propuestos como posibles reguladores de estos progenitores *in vivo* e *in vitro*. La inducción a la hemopoyesis de células germinales embrionarias primitivas indica que las células germinales poseen la potencialidad de diferenciarse en el sistema hemopoyético. La coincidente presencia en la región donde la hemopoyesis temprana se establece, para PGC y HSC y el requerimiento de los mismos factores de crecimiento, apoyan la hipótesis que las PGC pueden ser consideradas como células iniciadoras de la hemopoyesis.

Palabras clave: células germinales primordiales, regulación, hemopoyesis

Abstract *Characteristics of murine primordial germ cells and their relation with hemopoiesis.* Primordial germ cells (PGC) are a population of cells characterised by a positive reaction to alkaline phosphatase, usually present in the mouse embryo at 7.5 days *post coitum* (dpc). These cells migrate through various tissues before they become incorporated into the gonadal ridges. Hematopoiesis is a complex developmental system in which the hemopoietic stem cells (HSC) were experimentally shown to have been derived from a single multipotent stem cell. PGC, as well as HSC are regulated by a range of growth factors that control both proliferative and differentiative processes. Leukemia inhibitory factor (LIF) is a cytokine that regulates the differentiation and the totipotential phenotype of PGC. Recently, other growth factors, such as stem cell factor (SCF), macrophage growth factor (MGF), and forskolin (FRKL) have been proposed as the possible *in vivo* and *in vitro* regulators for PGCs and HSCs. Induction of hematopoiesis in an embryonic germ cell derived from PGCs indicates that germ cells acquire the potentiality to differentiate toward hematopoietic cells. The coincidental presence of both PGCs and HSCs at the sites where early hematopoiesis is established, together with similar growth factor requirements support the hypothesis that PGCs may also be considered hemopoiesis initiating cells.

Key words: primordial germ cells, regulation, hemopoiesis

Origen de las células primordiales germinales (PGC)

Las células primordiales germinales (PGC) son células madres (*stem cells*) con capacidad de autorrenovación y de diferenciación hacia varios tejidos dentro del embrión. Ellas constituyen al inicio, un conjunto singular de células en el mesoderma extraembrionario en la base del alantoide de un embrión de 7 días *post coitum* (dpc), cuya característica fundamental es la de ser inmortales y de encon-

trarse contemporáneamente en diferentes tejidos en distintos estadios de desarrollo embrionario, como también en algún tejido adulto. Su característica fundamental es la de ser precursores embrionarios de los gametas¹.

No obstante la importancia de estas células para la sobrevivencia de la especie, su origen embriológico es poco conocido.

Las PGC proliferan activamente en los embriones. El mecanismo de dicha proliferación en mamíferos y su control quedaron, durante mucho tiempo, desconocidos.

Recibido: 8-XI-2000

Aceptado: 9-IV-2001

Dirección postal: Dra. Catalina C. Bianchi de Di Rasio, Potosí 4240, 1199 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4959-0200

e-mail: prebora@hitalba.edu.ar

Utilidad

Conocer todos los procesos que llevan al desarrollo, proliferación y diferenciación del embrión puede ser de

mucha importancia biológica y médica dado que en el embrión en desarrollo un mal funcionamiento a nivel de estos procesos puede llevar a la esterilidad, al cáncer o a enfermedades hereditarias^{2, 3}.

Sobre la base de los estudios efectuados en ratones, el conocimiento de estos procesos implica en humanos un enorme potencial clínico, tanto en investigación básica y en trasplantes, como en ensayos de drogas, para tests teratogénicos y terapia génica. El esclarecimiento precoz puede conducir a la utilización de estrategias médicas para dilucidar algunas enfermedades, como también ser un fundamento para los avances terapéuticos en oncología⁴.

Desarrollo

Las PGC en embriones de ratón, cuya edad gestacional es de 21-22 días, al tercer dpc se encuentran en el epiblasto en número aproximado de 10 células positivas a la fosfatasa alcalina (FA). De aquí, migran al endodermo del saco vitelino y a los 10.5 dpc su número aumenta llegando a 25 000 células. Del endodermo del saco vitelino, posteriormente, pasan a las gónadas por activa motilidad, a través del mesenterio dorsal, donde se diferencian a los 12.5 dpc en oogonias en el ovario y espermatogonias en el testículo^{5, 6}.

En las gónadas en desarrollo a los 13.5 dpc, las PGC cesan la división mitótica y entran en arresto mitótico en el testículo y meiótico en el ovario. En este desplazamiento ellas pasan por diferentes tejidos sólidos donde encuentran varios tipos de células y moléculas extracelulares. Al llegar a las gónadas las PGC se adhieren fuertemente a las células del entorno y pierden su actividad locomotora y proliferativa.

Esta pérdida de actividad locomotora y proliferativa, se efectúa por interacciones entre las células germinales y la matriz extracelular gonadal; perdiendo algunas características de células migratorias siendo incorporadas así por las células somáticas gonadales⁷.

A través de varios estudios por medio de anticuerpos específicos, se logró identificar moléculas de adhesión, consideradas antígenos, en la superficie de las PGC. Por coloración histoquímica de la enzima FA fue posible encontrar su expresión en la superficie de las PGC, y aún, esa coloración sigue siendo utilizada ampliamente para identificar histológicamente estas células⁸.

Movilización de las PGC

Hay evidencias de que la fibronectina (Fn) juega un rol muy importante en la migración de las PGC estimulando su motilidad. Esta provee un sustrato adhesivo que las PGC necesitan para desplazarse⁹. Estudios por

inmunohistoquímica demuestran que grandes acúmulos de Fn están presentes a lo largo de la ruta de migración; pero pocos días después de su arribo a las gónadas, las células germinales pierden completamente la capacidad de adherirse a la Fn. Estudios posteriores mostraron además, que las PGC emiten pseudopodios que les permiten efectuar esta migración.

Hasta hace poco más de una década los intentos de cultivar *in vitro* PGC habían tenido poco éxito por la poca capacidad de éstas de sobrevivir en un medio extracorpóreo. En efecto, las PGC no pueden subsistir como células independientes *in vitro* y necesitan un sustrato que les proporcione nutrientes necesarios para su desarrollo. Si bien hasta ahora no se ha logrado proveer las condiciones óptimas para la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de las PGC *in vitro*, en cambio se detectó que éstas necesitan del entorno del microambiente¹⁰. Para ello se utilizaron diferentes monocapas de células o *Feeder Layer* (FL) derivadas o bien de células somáticas extraídas de las propias gónadas o de células de una línea establecida CM4, obtenida de células de Sertoli¹¹.

Factores de crecimiento

Son sustancias cuya propiedad fundamental es la de estimular el desarrollo de las células madres, cuyas progenies maduras necesitan para su supervivencia que estén presentes dichos factores. Estas sustancias pueden ser específicas para un determinado progenitor, compartir algunas características para el desarrollo celular y además poseer sinergismo entre sí. Las células progenitoras primordiales, para que entren en ciclo, necesitan de la presencia de estos factores de crecimiento, también llamados factores estimulantes de colonias o interleuquinas, que actúan aumentando la síntesis de ADN dentro de la célula¹².

Recientemente se identificaron factores que junto a FL actúan aumentando y sosteniendo la proliferación y sobrevivencia de las PGC. Uno de ellos es el factor inhibidor leucémico (LIF) y otro es el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), este último capaz de estimular las células del entorno del microambiente en la producción de LIF. Sin embargo el desarrollo de PGC se ve afectado a los 5 días de cultivo. El agregado de compuestos de crecimiento hace aumentar el número de PGC, pero esto no cambia el límite en la detención del crecimiento, lo cual evidencia que la proliferación de PGC es un proceso independiente y autoprogramado^{13,14,15}.

Pocas horas después de su aislamiento de las crestas gonadales, las PGC entran en muerte celular programada o apoptosis, lo cual proporciona una explica-

ción a la rápida degeneración de estas células en cultivo. Esta rápida eliminación podría considerarse como un camino elegante para prevenir la migración aberrante¹⁶.

Sin embargo, con el agregado de otros factores como Forskolin (FRSK), que es un activador de la adenilciclase, cuya función es elevar los niveles de cAMP (ame-pecíclico) en los PGC y SCF (factor de crecimiento de células progenitoras o *stem*), se puede prolongar el tiempo de proliferación de una pequeña población de PGC desarrollada *in vitro*. Esta población de PGC queda constituida por EG (células embrionarias germinales totipotentes), cuya característica es la de dar origen a diferentes líneas celulares, como: endoteliales, germinales, hemopoyéticas etc. El CSF fue identificado en 1990 por varios laboratorios de investigación y su efecto se visualiza no solamente sobre las PGC, sino también sobre los progenitores hemopoyéticos. Al agregarlo a los cultivos disminuye marcadamente el número de células en apoptosis¹⁷. Experiencias llevadas a cabo en Roma acerca del rol especial del agregado de estos factores al cultivo, demuestran que estos producen dentro de las células aumento de los niveles de cAMP, compuesto responsable del aumento de la proliferación celular. El SCF, en particular, actúa indirectamente estimulando el crecimiento de las células somáticas gonadales, que hace que en las PGC se incrementen los niveles de cAMP^{18,19}. La función de éstas hormonas tróficas y de otros factores, durante el desarrollo embrionario, es la de prevenir la muerte celular programada o apoptosis.

Apoptosis

El proceso apoptótico se manifiesta en las células por condensaciones atípicas de cromatina, paralelamente con la fragmentación de las mismas, y en los lugares internucleosomales el citoplasma empieza a condensarse y la membrana se fragmenta formando cuerpos apoptóticos.

Dijimos que cuando se aíslan *in vitro* PGC ellas rápidamente van a la apoptosis; sin embargo si se les agregan factores solubles como SCF, LIF, entre otros, se previene este proceso, a pesar de que en breve tiempo, 4-5 hs, su efecto se debilita. La explicación sería que a través de un proceso activo de muerte celular, se puede regular el número de células germinales por señales que pueden inhibir o estimular la apoptosis. Esto hace suponer que la proliferación aberrante de las PGC es causada por una falla en la apoptosis., prolongando indebidamente la sobrevivencia de algunas células, lo cual conduciría a un teratoma o teratocarcinoma²⁰.

Relación con la hemopoyesis

La mutación murina de los genes *White* (W) y *Steel* (St) que respectivamente codifican el receptor c-kit tirosina kinasa y su ligando conocido como *Steel Factor* (SF), SCF o MGF, lleva a la disminución en el número de las células primordiales germinales, como también de las células primordiales hemopoyéticas (SCH), de los mastocitos y de los melanocitos. Este es un hecho muy singular y de gran interés para entender la relación que existe entre los dos sistemas: germinales y hemopoyéticos²¹.

La hematopoyesis es un evento complejo en el cual las SCH pluripotentes, tienen la capacidad de autodividirse por un cierto tiempo, hasta formar progenitores más diferenciados, resultando en un aumento y diferenciación de las células más maduras.

Las células hemopoyéticas derivan del mesodermo esplácnico. A los 7 días de gestación, en embriones de ratones, se forma el mesodermo en la región de la primitiva línea germinal y entre los 7-7.5 dpc las células salen del mesodermo y empiezan a migrar a lo largo de la pared amniótica y el endodermo visceral. Estas células migratorias son responsables de las primeras islas sanguíneas que se encuentran en el sitio vascularizado del saco vitelino y más tarde se conectarán para formar los primeros vasos sanguíneos, constituyendo así el primer sistema circulatorio²².

Aquí las primeras células diferenciadas son eritroides, junto a un pequeño número de macrófagos, y son transportadas por el sistema vascular impulsadas por el corazón embrionario, a los lugares sanguíneos definitivos.

Sobre el origen de las SCH se formulan dos hipótesis: 1) o bien son creadas *de novo* en cada uno de los lugares donde se observa actividad hemopoyética durante la embriogénesis, 2) o bien el saco vitelino o la región del embrión llamada AGM (aorta- gónada- mesonefro) son los lugares de nacimiento de las SCH que constituirán luego el sistema hemopoyético definitivo²³.

Esta última hipótesis, que es la más aceptada, sugeriría que el saco vitelino y la región de AGM son los lugares de nacimiento de todas las SCH, las que integrarán, por último, el sistema hemopoyético definitivo del adulto²⁴.

El marcador para células progenitoras hemopoyéticas y endoteliales en adultos es el CD34. Durante el desarrollo murino se observa que también las células del endotelio, que limita los vasos del saco vitelino, son CD34 positivas, sosteniendo la hipótesis de que las células endoteliales proveen un entorno hemopoyético capaz de estimular la producción de progenitores eritroides y mieloides^{25,26}.

En embriones de vertebrados todos los tejidos hemopoyéticos que son sucesivamente activos durante la ontogénesis (hígado fetal, timo, bazo y médula ósea) están colonizados por *stem cells* hemopoyéticas extrínsecas.

Estos datos, muestran que las SCH y PGC, dentro del mismo distrito embrionario y en el mismo estadio de desarrollo, son reguladas por los mismos factores de crecimiento y son sensibles a las mismas señales, sosteniendo así las hipótesis que las SCH o bien se originan de PGC migratorias y post-migratorias o bien de un progenitor común²⁷.

Para concluir, los factores de crecimiento requeridos, la totipotencialidad intrínseca de las PGC, el requerimiento de factores de crecimiento similares a las SCH, las mutaciones comunes que afectan ambas líneas (germinales y hemopoyéticas) junto a la coincidencia de las regiones donde son establecidas, apoyan la hipótesis de que las PGC pueden ser consideradas como células iniciadoras de la hemopoyesis.

Bibliografía

- Loeffler M, Pottern CS. Stem cells and cellular pedigree- a conceptual introduction. In: CS Potten (Ed), Stem Cells, New York: Acad Press, 1997; p. 1-27.
- Rooij DG de, Dissel-Emiliani FMF von. Regulation of proliferation and differentiation of stem cells in the male germ line. In: Stem Cell, New York: Academic Press 1997; p 283-308.
- De Felici M. Regulation of primordial germ cell development in the mouse. *Int J Dev Biol* 2000; 44: 1-6.
- Gearhart J. New potencial for human embryonic stem cells. *Science* 1998; 282: 1061-2.
- De Felici M. Isolation and culture of germ cells from the mouse embryo. *Cell Biology. A Laboratory Handbook* 1998; Vol. 1, 73-85.
- Resnick JL, Bixler S, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992; 359: 550-1.
- Huang H, Auerback R. Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 10110-4.
- De Felici M, Pesce M, Giustiniani Q, Di Carlo A. In vitro adhesiveness of mouse primordial germ cells to cellular and extracellular matrix component substrata. *Microscopy* 1998; 8: 1-7.
- De Felici M, Dolci S, Pesce M. Cellular and molecular aspects of mouse primordial germ cell migration and proliferation in culture. *Int J Dev Biol* 1992; 36: 205-13.
- Lieschke GJ, Dunn AR. Development of functional macrophages from embryonal stem cells in vitro. *Exp Hematol* 1995; 23: 328-34.
- De Felici, Dolci S. Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. *Dev Biol* 1991; 147: 281-4.
- Gronda M, Di Risio BCC. Regulación de la hemopoyesis. *Medicina (Buenos Aires)* 1993; 53: 167-71.
- Rich IN. The developmental biology of hemopoiesis: Effect of growth factors on the colony formation by embryonic cells. *Exp Hematol* 1992; 20: 368-70.
- Riley GP, Gordon MY. Characterization of cultured stromal layers derived from fetal and adult hemopoietic tissues. *Exp Hematol* 1987; 15: 78-84.
- Pesce M, Ferrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M. Stem cell factor and leukaemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 1993; 118: 1089-94.
- Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, et al. Effect of steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 1991; 353: 750-2.
- Heyworth CM, Testa NG, Buckle AM, Whetton AD. Growth factors and the regulation of haemopoietic stem cells. In: CS Potten (Ed) Stem Cells; New York: Academic Press: 1997; p 423-45.
- De Felici M, Dolci S, Pesce M. Proliferation of mouse primordial germ cells in vitro: A key role for cAMP. *Dev Biol* 1993; 157: 277-80.
- Dolci S, De Felici M. Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor and cAMP on in vitro proliferation of mouse primordial germ cells. *Molec Reprod Develop* 1993; 35: 134-9.
- Pesce M, De Felici M Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anat Embryo* 1994; 189: 435-40.
- Godin I, Dieterlen-Liévre F, Cumano A. Emergence of multipotent hematopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splechnopleura in mouse embryo, beginning at 8,5 days postcoitum. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 773-7.
- Rich IE. Primordial germ cells are capable of producing cells of the hematopoietic system in vitro. *Blood* 1995; 86: 463-72.
- Moore MAS, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Brit J Haematol* 1970; 18: 279-96.
- Sanchez MJ, Holmes A, Miles C, Dzierzak. Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 1996; 5: 513-25.
- Fennie C, Cheng J, Dowbenko D, Young P, Lasky LA. CD34+ endothelial cell lines derived from murine yolk sac induce the proliferation and differentiation of yolk sac CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 1995; 15: 4454-67.
- Landsdorff PM. Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 1995; 23: 187-91.
- Nakano T, Kodama H y Honjo T. In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science* 1996; 272: 722-4.