

Hematopoese, células-tronco e diferenciação – Imunofenotipagem

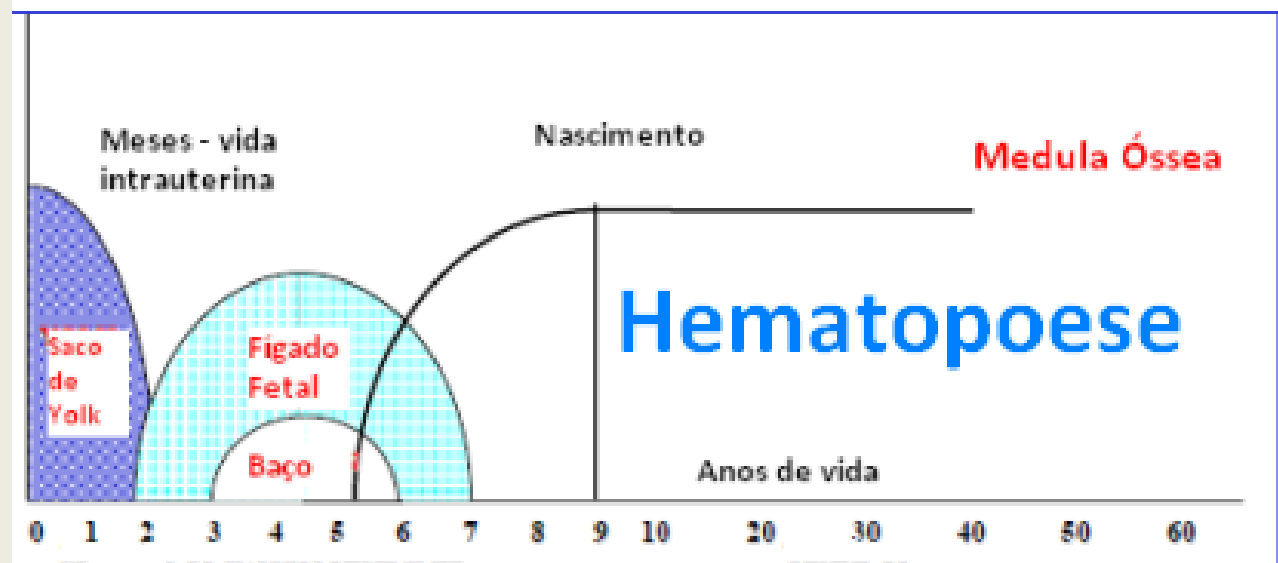
Silvia I.A.C.de Pires Ferreira
HEMOSC – Lab Medico Santa Luzia
Florianópolis, SC



Hematopoese - Conceito

- Processo biológico coordenado com a expressão de genes, regulados por citocinas hematopoiéticas, através do qual as **células-tronco primitivas proliferam e se diferenciam** para produzir as células maduras do sangue
- A interação complexa entre os processos genéticos intrínsecos das **células e seu microambiente**, determinara o estado quiescente, a proliferação, diferenciação ou auto-renovação das células - tronco, células progenitoras e células maduras especializadas

Locais de produção



Fisiológicos:

O processo se inicia no embrião no saco vitelino (19 dia de vida), na semana 9 a 24 ocorre no fígado fetal. A partir da 24ª semana a Medula óssea é o principal produtor. MO ativa no adulto: pelve, vértebras, crânio, maxilar inferior, esterno, costelas, úmero, fêmur.

Hematopoese – Função

1- Preservação da vida

- * nutrição
- * energia
- * renovação do “pool” de células tronco
- * manutenção do “status quo”

2- Resposta a agressões

- * anemia
- * sangramento
- * infecção



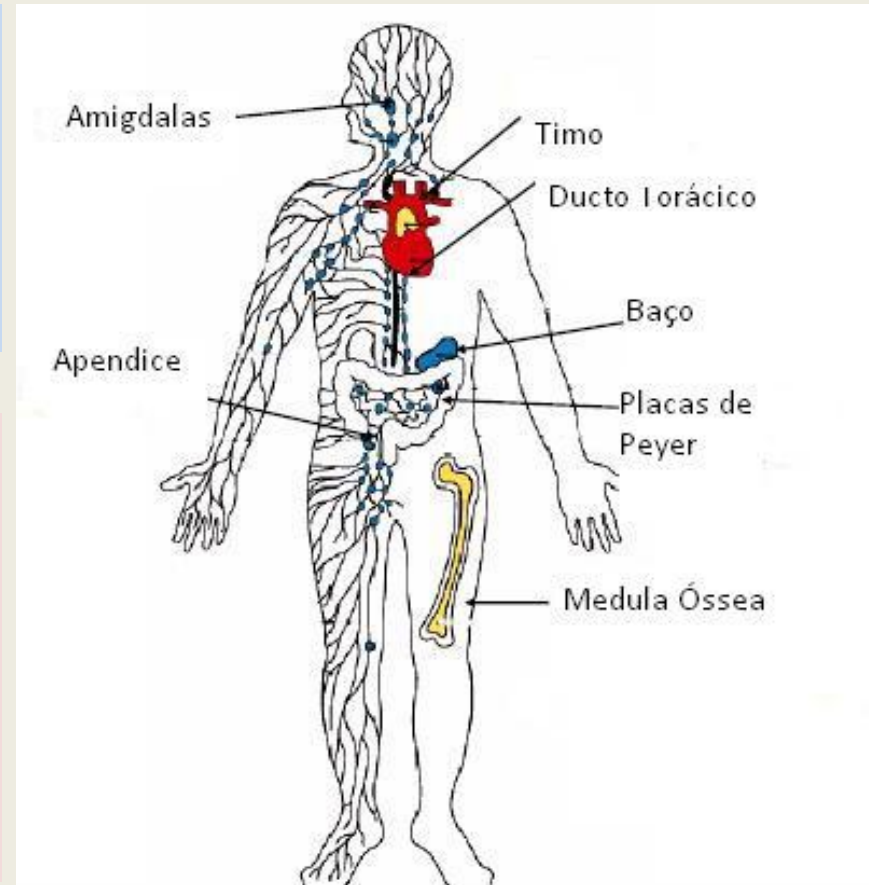
Tecidos Hematopoéticos

CENTRAL OU PRIMÁRIO

- 1- **Medula óssea**: maior nº célula tronco
- 2- **Timo**: Maturação de células progenitoras T
Exportação para tecidos secundários

PERIFÉRICO OU SECUNDÁRIO

- 1- **Baço**: Fase final de maturação de eritrócitos
Reparação e destruição celular, fagocitose
“Pool” linfócitos imunocompetentes
Depósito de plaquetas
- 2- **Linfonodo e MALT**: Atuam como filtros.
Atividade imunológica



Hematopoese – Produção

<u>Célula</u>	<u>Vida Média</u>	<u>Morte/Dia</u>	<u>Produção/Hora</u>
Eritrócitos	120 dias	240 bilhões	10 bilhões
Leucócitos	Dias a Anos	24 bilhões	1 bilhão
Plaquetas	10 dias	100 bilhões	4 bilhões

O sangue periférico contém 24 trilhões de eritrócitos
= **1/3** das células do organismo



Estudos Da Medula óssea

Punção / Aspiração

Mielograma (May Grunwald- Giemsa)

Perl (depósitos de ferro)

Biopsia MO

Morfologia

Imunohistoquímica

Citogenetico (cariotipo normal 46,XY ó 46,XX)

CITOMETRIA DE FLUJO



Hematopoese

CÉLULAS TRONCO



Células- tronco / Classificação

Estado evolutivo

Embrionárias:

Células do estágio inicial do embrião, originam as múltiplas células especializadas que formam o organismo



Somáticas ou Adultas:

Células dos tecidos e órgãos, geram células do tecido da capa embrionária correspondente.



Potencialidade celular

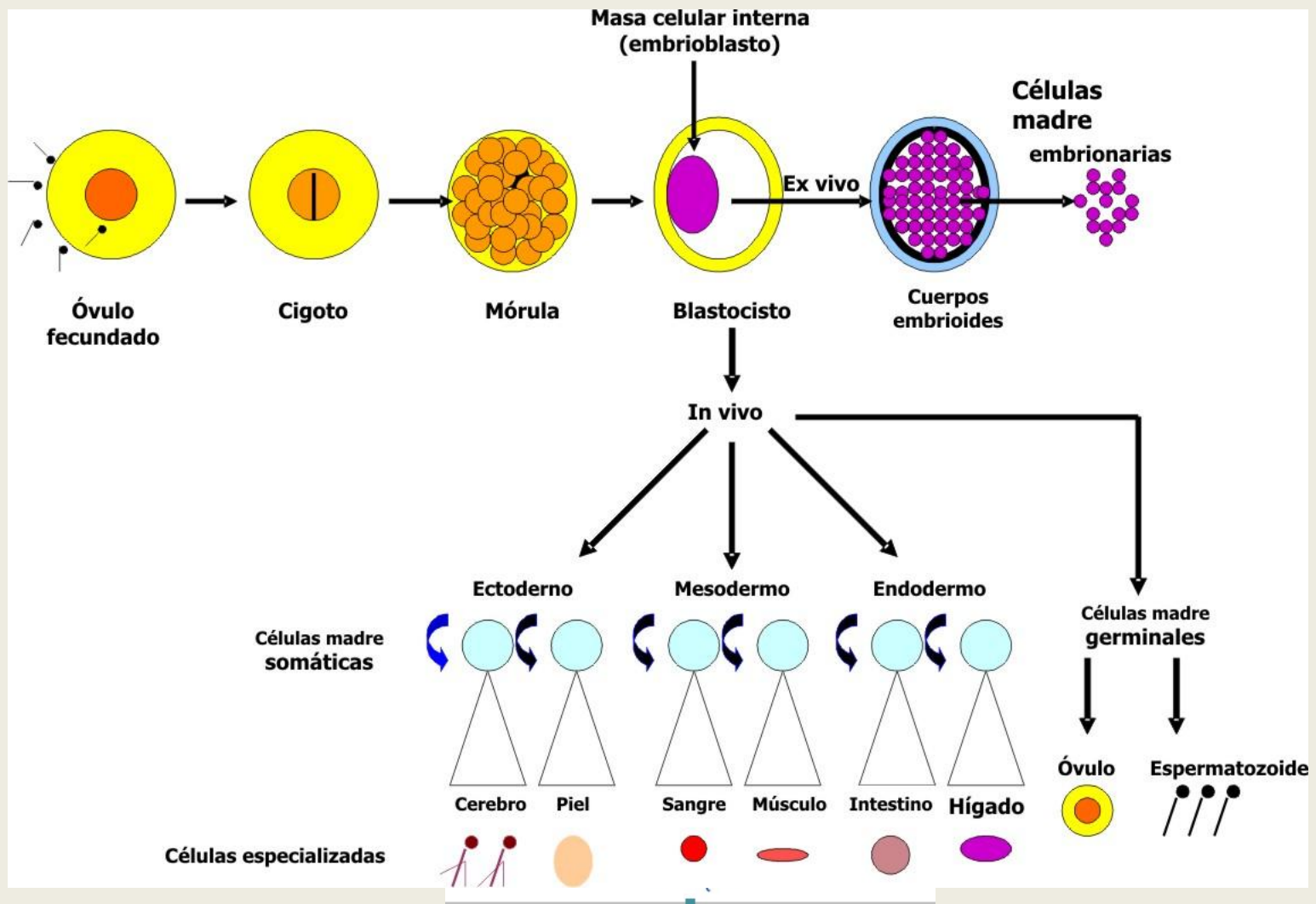
Totipotentes – é o ovulo fertilizado, capazes de originar um individuo completo .

Pluripotentes: Células do interior do blastocisto. Capacidade de diferenciação a tecidos procedentes das 3 capas embrionárias, não produzem um individuo.

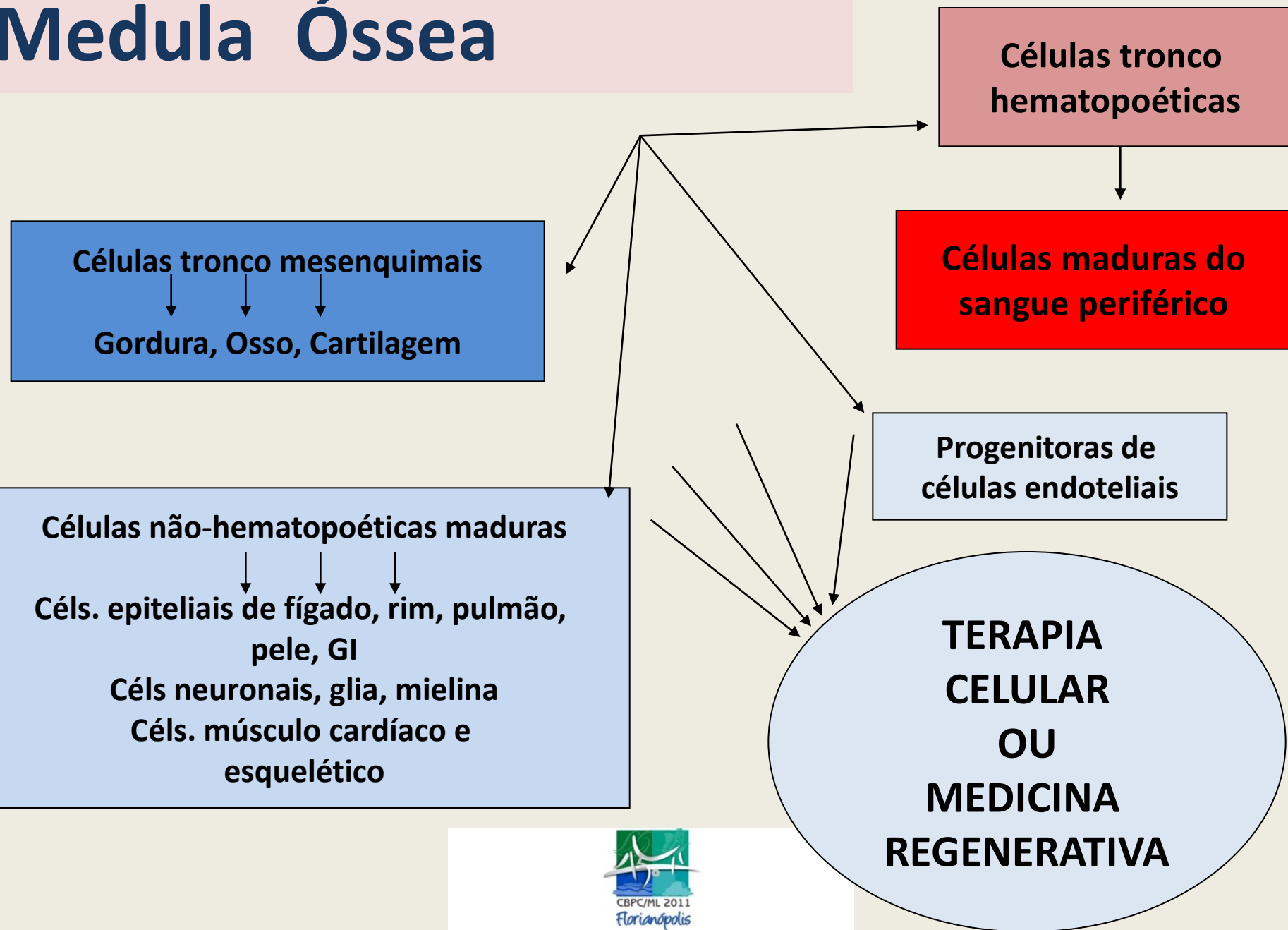
Multipotentes: Capacidade de diferenciação a tecidos procedentes da mesma capa embrionária.
Ex. célula-tronco hematopoética.

Células- tronco

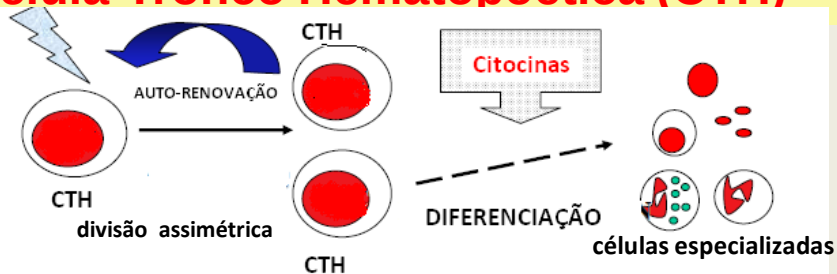
Evolução



Medula Óssea



Célula-Tronco Hematopoética (CTH)

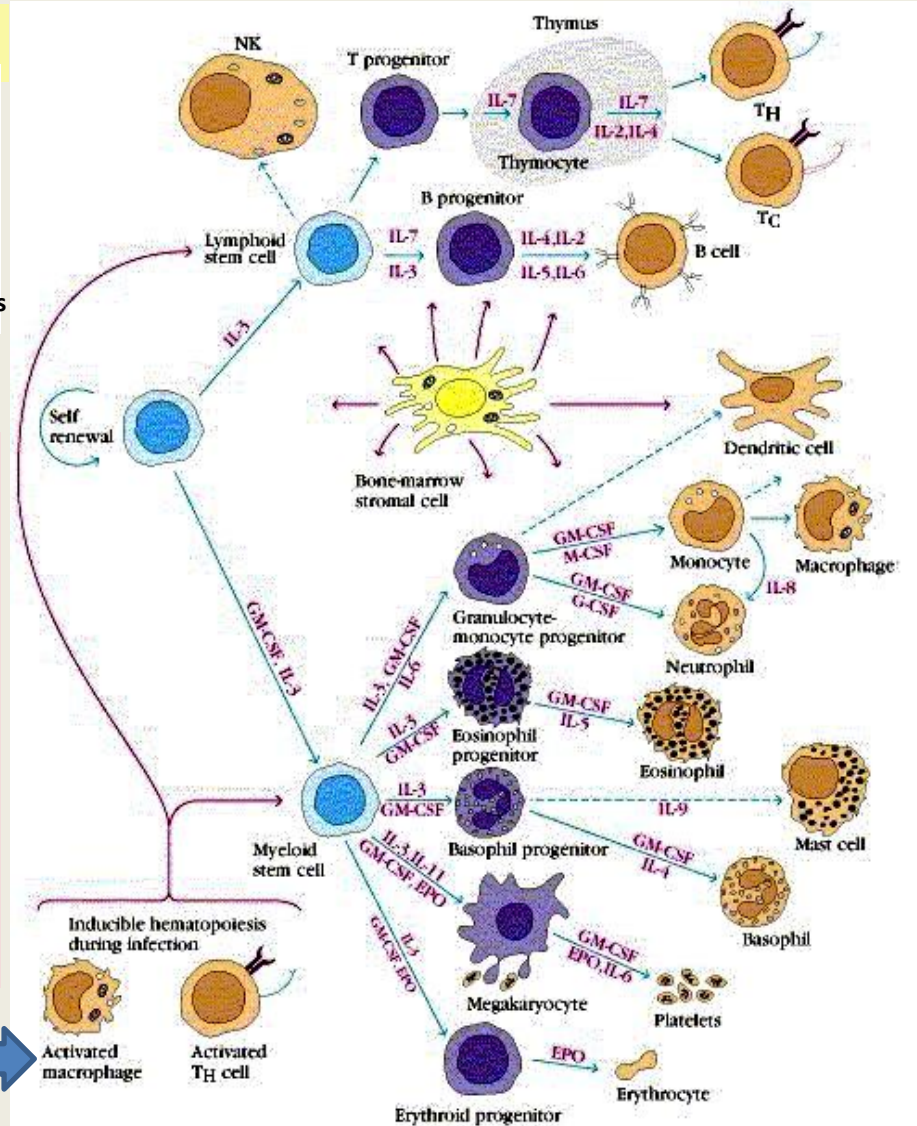


Matriz estromal

microambiente adequado para proliferação e diferenciação

- **citocinas hematopoéticas** (fatores de crescimento, hormônios)
- **matriz extracelular** (fibronectina, colágeno, laminina, proteoglicanos, hialurônico)
- **interação célula/ célula** (osteoclastos, fibroblastos, células endoteliaes, reticulares e dendríticas, macrófagos)

HEMATOPOESE



Célula-Tronco Hematopoética (CTH)

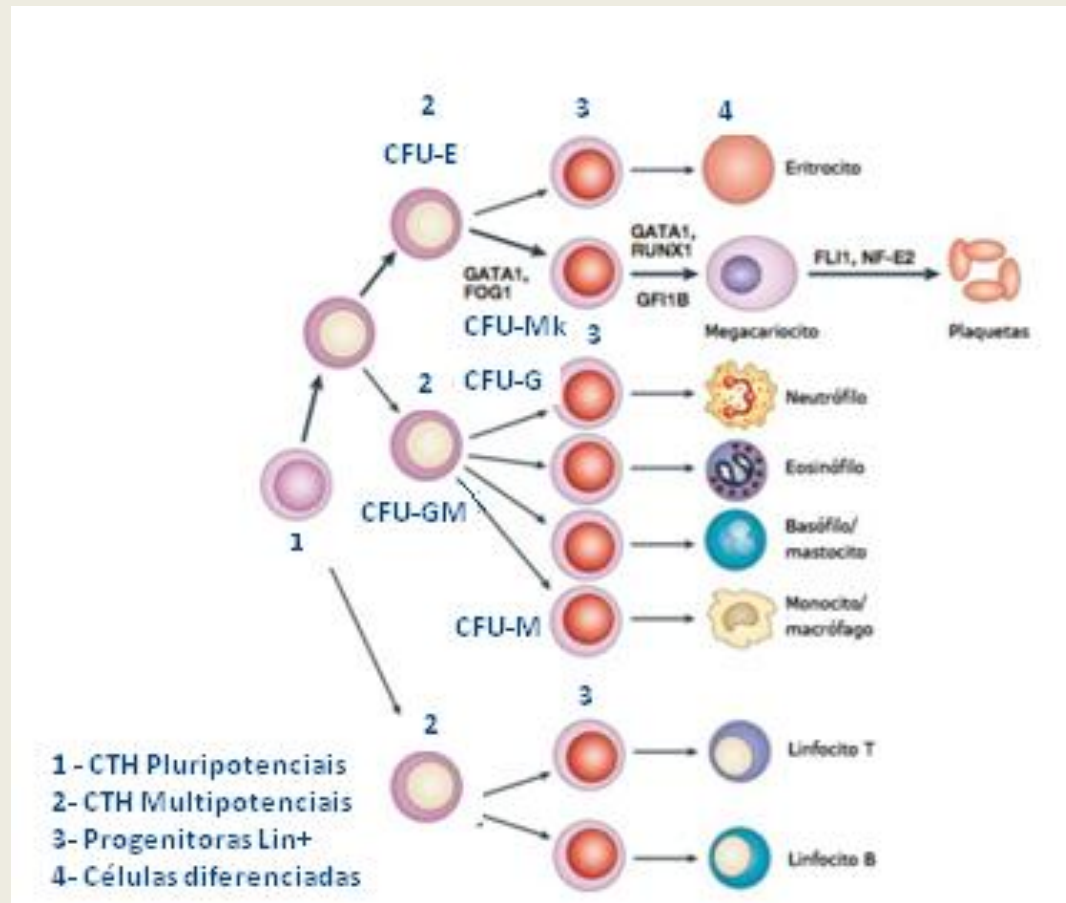
- Primeira célula tronco identificada
- Capacidade de auto-renovação e diferenciação
- Origina os bilhões de elementos de sangue periférico
- A medula óssea, sangue periférico (em mobilização) e o cordão umbilical são as principais fontes de CTH, utilizadas para o transplante.

Célula Precursora Hematopoética

- Se originam de células progenitoras.
- Perdem a capacidade de auto-renovação
- São diferenciadas: apresentam características específicas de uma linhagem celular



CTH e Progenitoras Linhagem comprometidas (Lin+)



Marcador antigênico de CTH

CD34

- Cadeia única de glicoproteína transmembrana expressada em células-tronco, endotélio vascular, fibroblastos embrionários e algumas células de fígado fetal e tecido nervoso adulto.
- Promove adesão interativa entre células-tronco e elementos da matriz estromal em medula óssea
- Provavelmente regula a associação entre células-tronco e o microambiente, via regulação indireta de fatores de adesão.
- É o principal marcador antigênico utilizado na clínica, para identificação de células-tronco hematopoéticas



Marcadores antigenicos utilizados para detecção de CTH e definição de linhagem

Pan-Hematopoético CD45

Imaturidade

CD34, CD38, CD117,
HLA-DR, CD90 ,AC133,
TDT,

Linhagem

Mielóide

MPO, CD13, CD33, CD35,
CD36, CD61, CD64, CD105,
CD123, CD203c

Linfóide B

CD19, cCD79a, cCD22

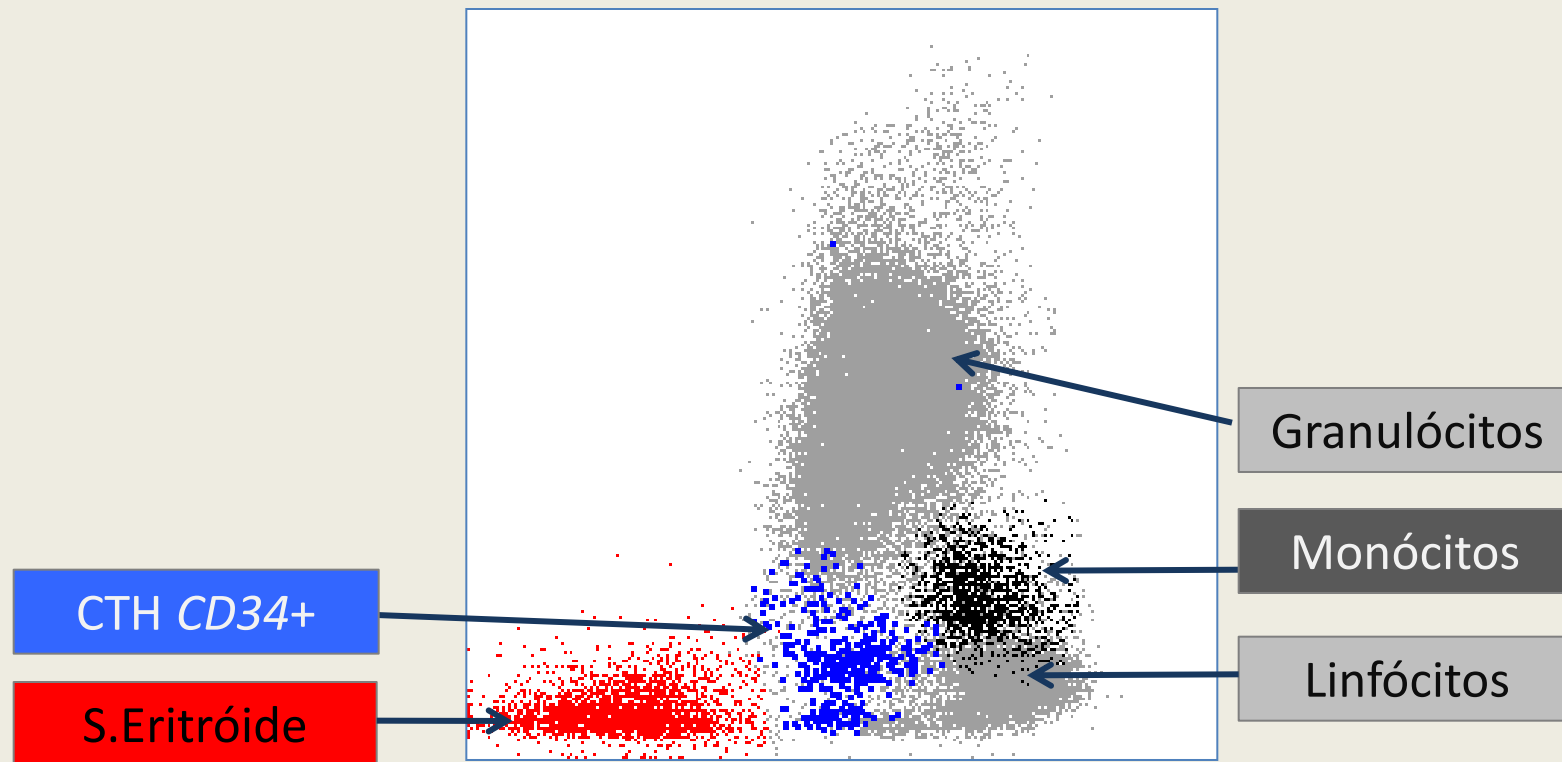
Linfóide T

cCD3, CD7, CD5

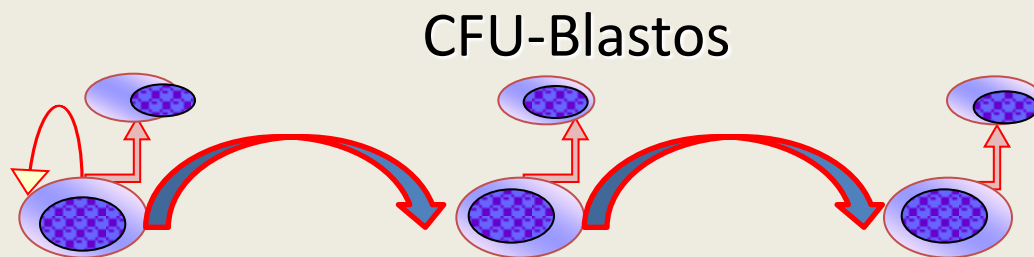
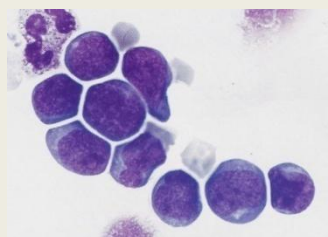
Células NK

CD44, CD56, CD135

Dot Plot - Populações na MO normal pela expressão de CD45



Fenótipo das CTH Imaturas



ESTADIO I ESTADIO II ESTADIO III

CD34+	CD34+	CD34+
CD117^{lo}	CD117⁺	CD117⁺
HLADR+	HLADR+	HLADR+
CD38-/+	CD38+	CD38+
CD90+	CD90-/+	CD90-
AC133+	AC133-	AC133-
		Lin+

Auto-renovação

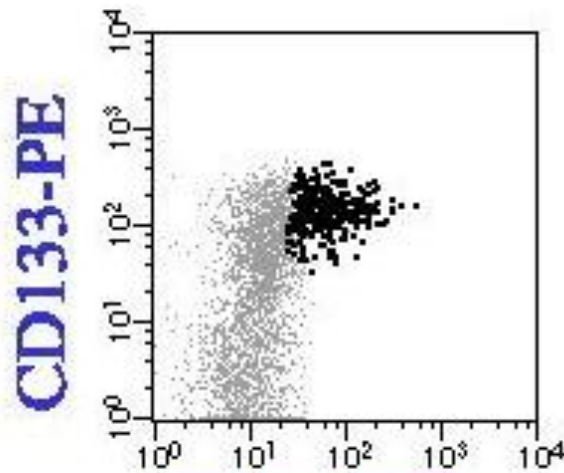
Capacidade de diferenciação

CFU: Unidade Formadora de Colônias

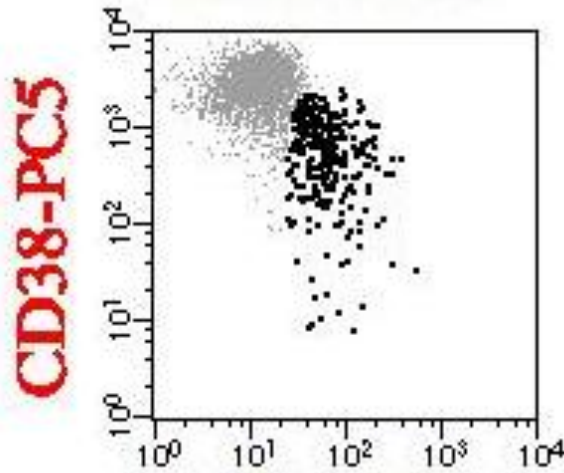


Fonte: Brendel C.; Neubauer A.. Characteristics and analyses of normal and leukemic stem cells: current concepts and future directions. Leukemia 2000. 14; 1711-1717

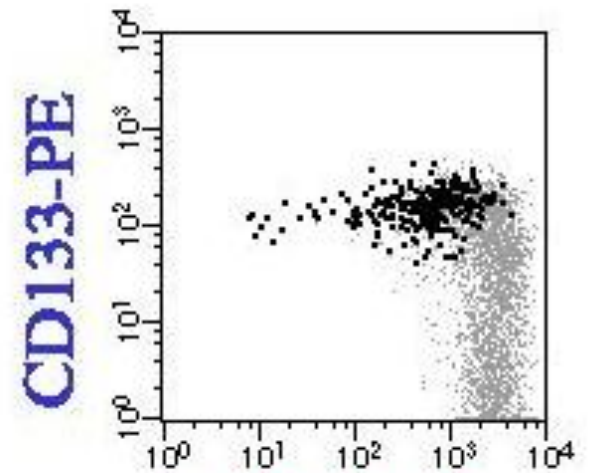
Fenótipo CTH Imaturas Lin-



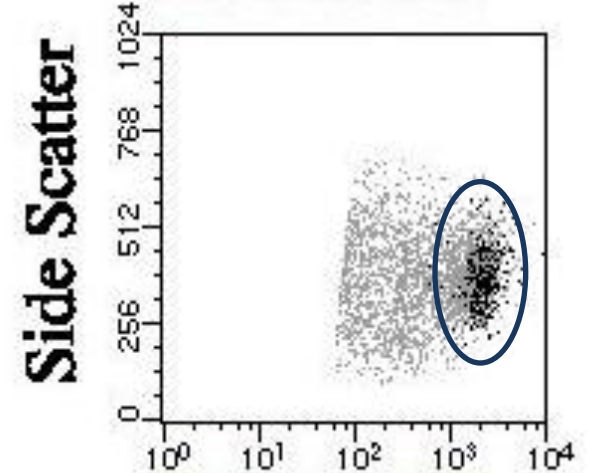
CD90-FITC



CD90-FITC



CD38-PC5

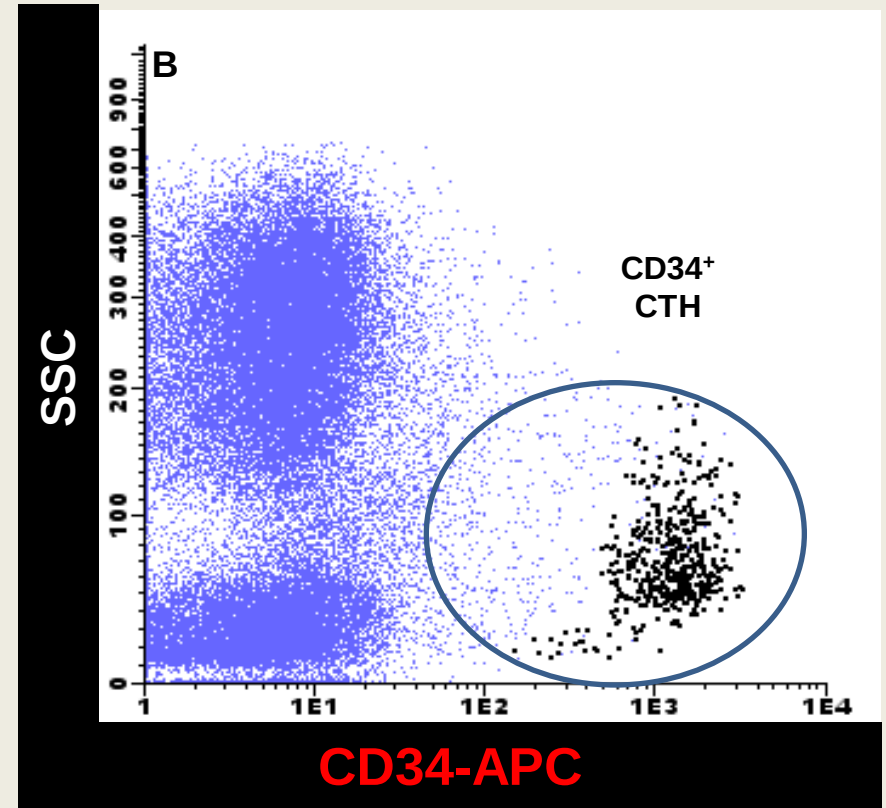


CD34-APC

IMF de CD34+ CTH

Linhagem comprometidas (Lin +)

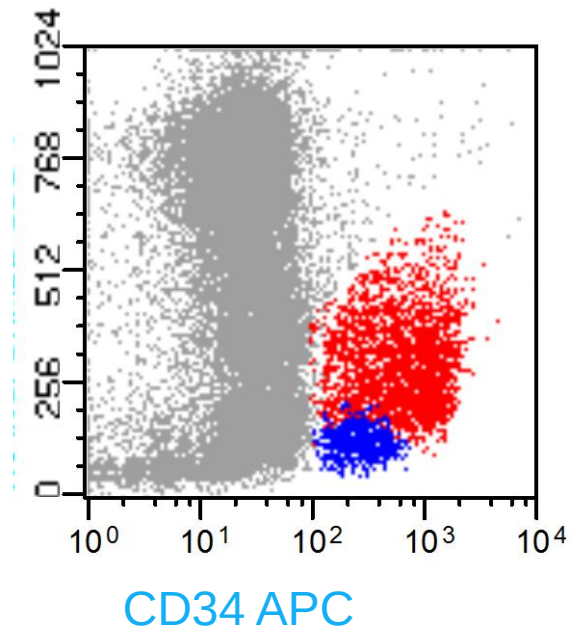
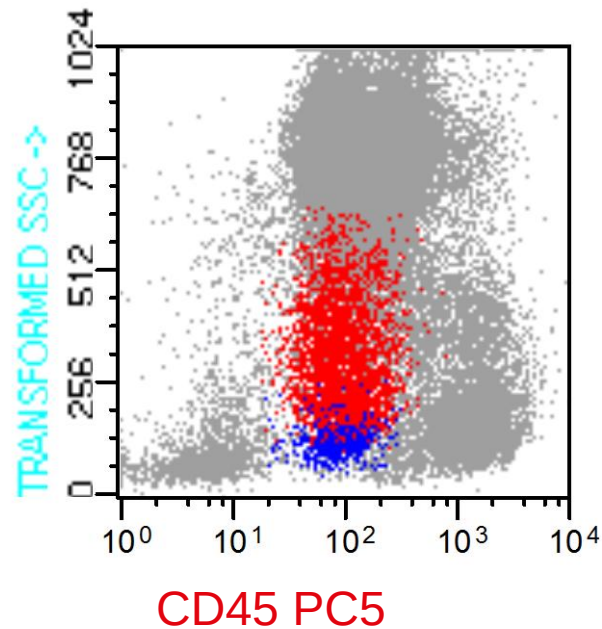
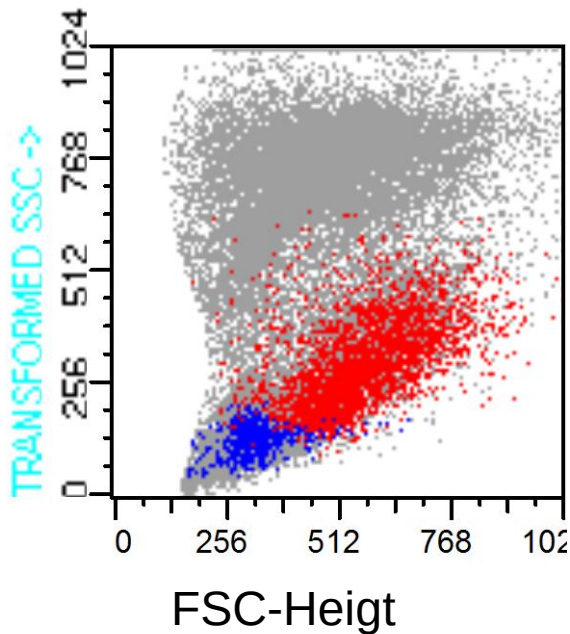
Linhagem	%	Frequência
Eritroide	15	5 - 35
Megacariocítica	<1	
Neutrofilica	31	12 - 39
Eosinofilica	<1	
Basofilica	<1	<1 - 3
Monocítica	5	3 - 15
Mastocítica	<1	
Dendritica Pl	6	1 - 15
Linfoide B	23	<1 - 45
Total	81	



% CD34⁺ CTH: 1.1 ± 0.6 (0.3-2.6)

Orfao A. , Simpósio Citometria, Sao Paulo 2009

CTH Linhagem comprometidas (Lin+)



Características de dispersão de luz:
SSC: Complexidade citoplasmática
FSC: Tamanho

Precursor Linfóide: <SSC ,<FSC

Precursor Mielóide: >SSC ,>FSC



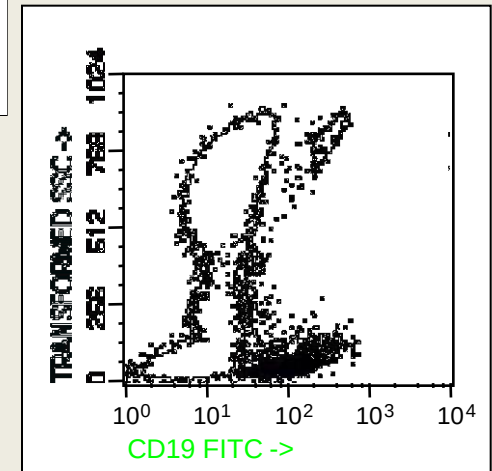
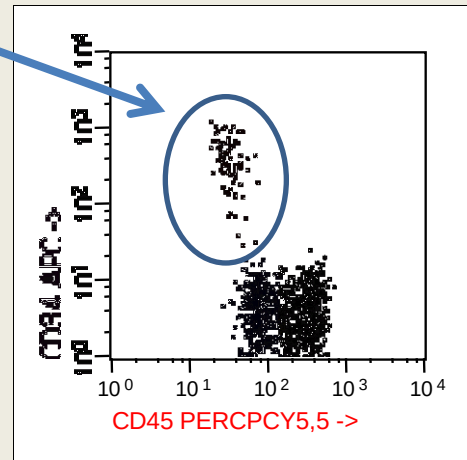
Marcadores fenotípicos das CTH comprometidas a Lin. Mielóide

Linhagem Celular	SSC	Marcadores Precoces	Marcadores Adicionais
Eritróides	Estavel	CD36+	CD105
Megacariocíticas	Alto	CD61+	
Granulocíticas	Alto	MPO+	CD15/65, CD64
Basofilos	Baixo	CD123+ forte, CD203c	
Mastócitos	Baixo	CD117+forte	Triptase CD203c
Monocíticas	Estavel	CD64+	CD35
Dendríticas Pl	Estavel	CD123+ forte CD36+	

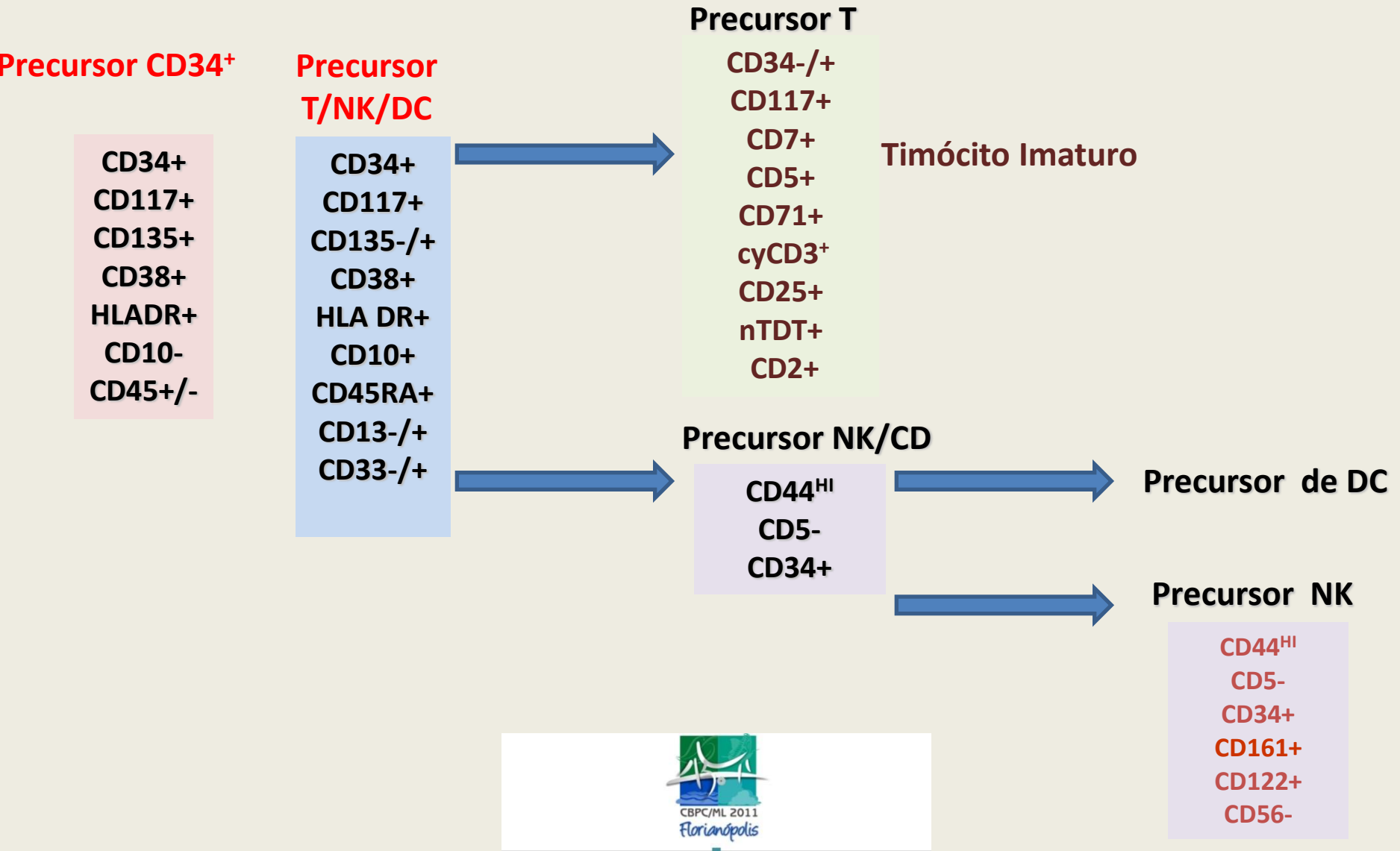
Identificação fenotípica das CTH CD34+ comprometidas a Lin Linfóide B

Precursor B CD34⁺

CD34 ⁺	CD34 ^{lo}
CD19 ^{lo}	CD19 ⁺
CD22 ⁺	CD22 ⁺
CD38 ⁻	CD38 ⁺
CD45 ^{lo}	CD45 ^{lo}
HLADR ⁺	HILA-DR ⁺
CD117 ⁻	CD117 ⁻
TdT ⁺	TdT ⁺



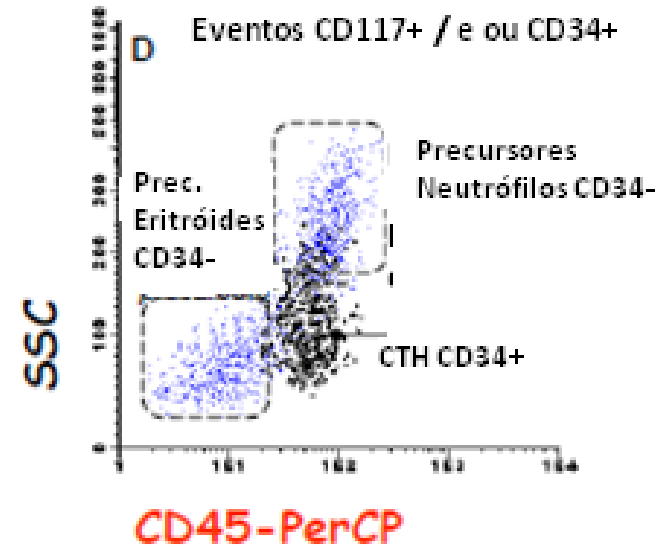
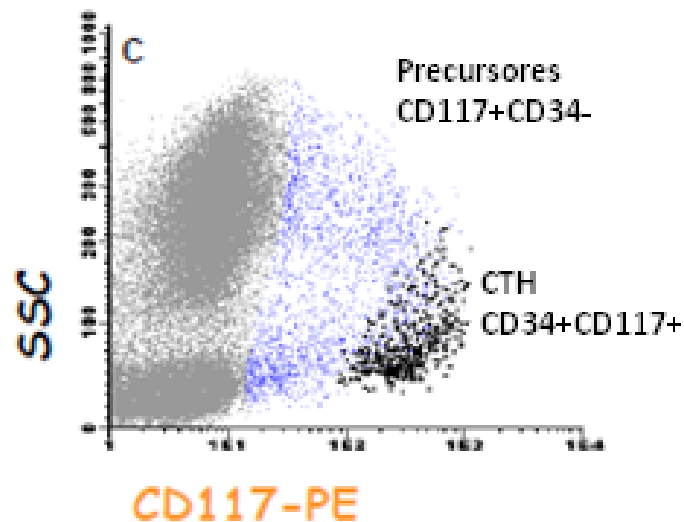
Fenótipo das Células tronco hematopoiéticas linhagem linfóide T/NK/DC



Identificação fenotípica

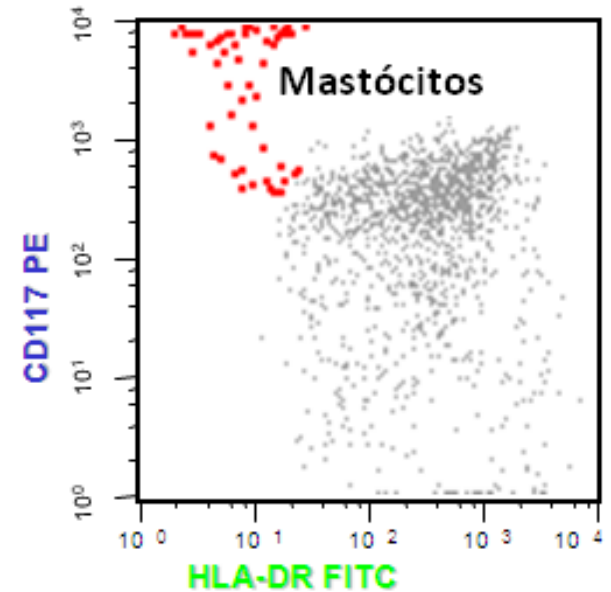
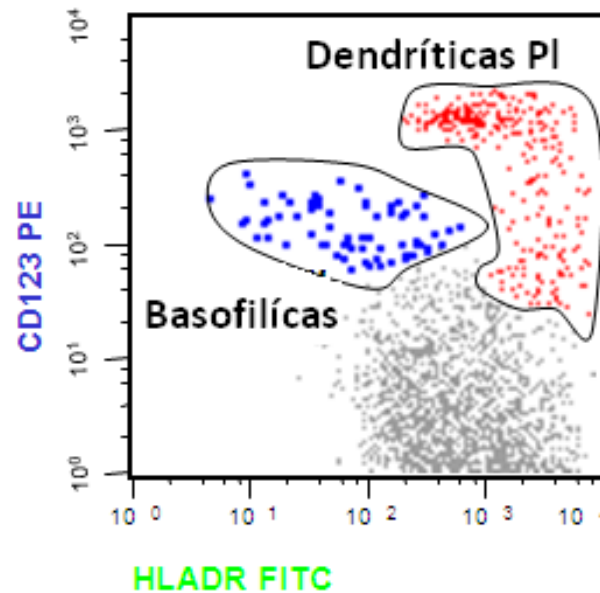
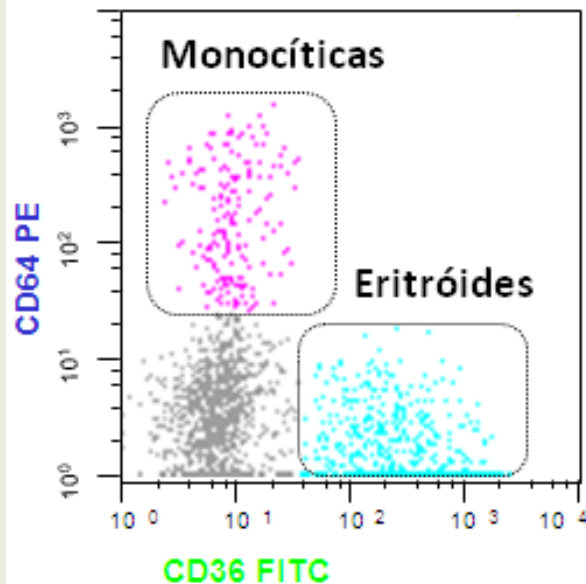
Células Imaturas da Linhagem mielóide

Expressão de CD117+ e ou CD34+



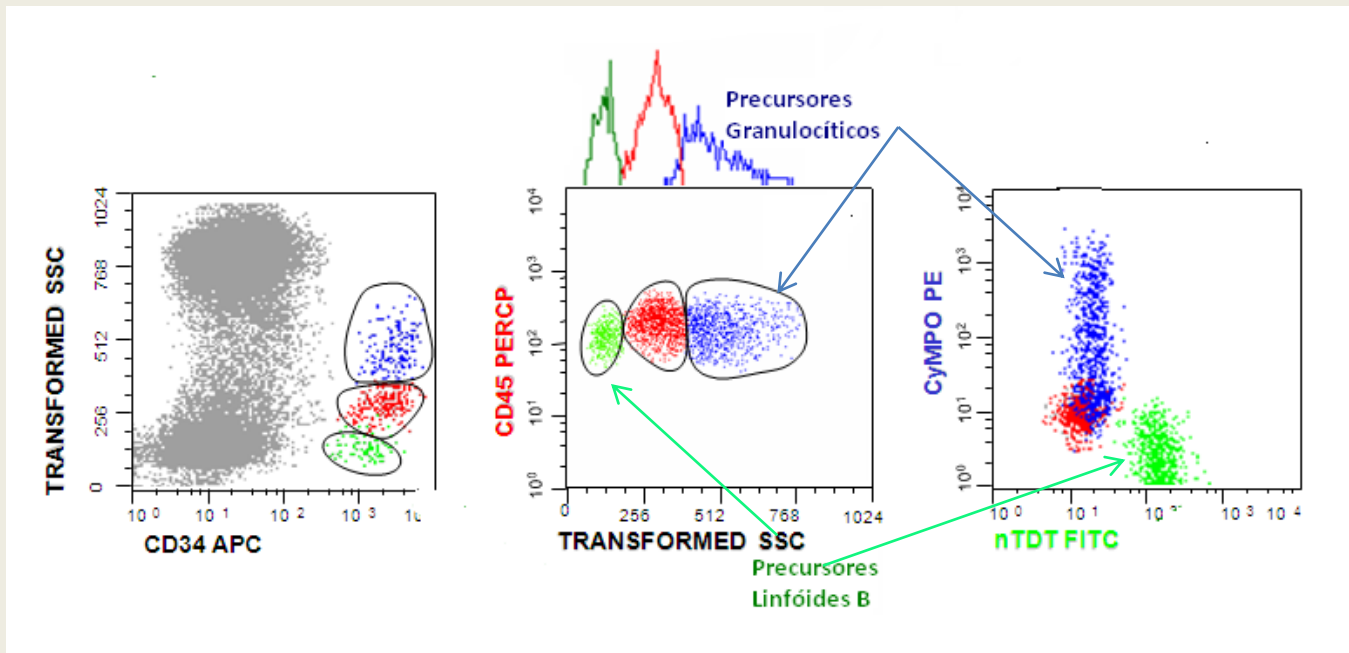
Orfao A. , Simpósio Citometria, Sao Paulo 2009

Identificação fenotípica das CTH CD34+ comprometidas a Lin Mielóide



Matarraz S et al. Leukemia 2008

Identificação fenotípica das CTH CD34+ Linhagem comprometidas



MO Normal e alterada

CTH CD34+

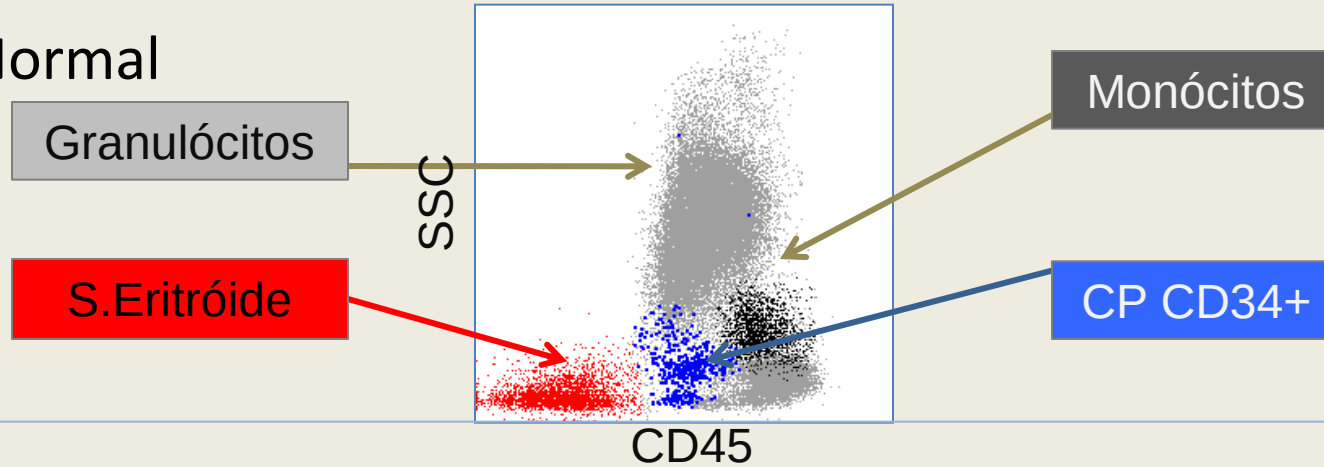
Informação Fenotípica

- Identificação e enumeração das CP CD34+ da MO e seu comprometimento às diferentes linhagens :
 - Imaturas e comprometidas a linhagem neutrofilica e linfoides B
 - Outras CP: monociticas, basofilicas, dendriticas (pDC), mastocíticas e eritróides.
- Caracterização fenotípica dos diferentes compartimentos das CP CD34+ (MO normal x MO alterada) :
 - Detecção de bloqueios maturativos em MO displásica
 - Investigação de padrões alterados na expressão de antígenos individuais.

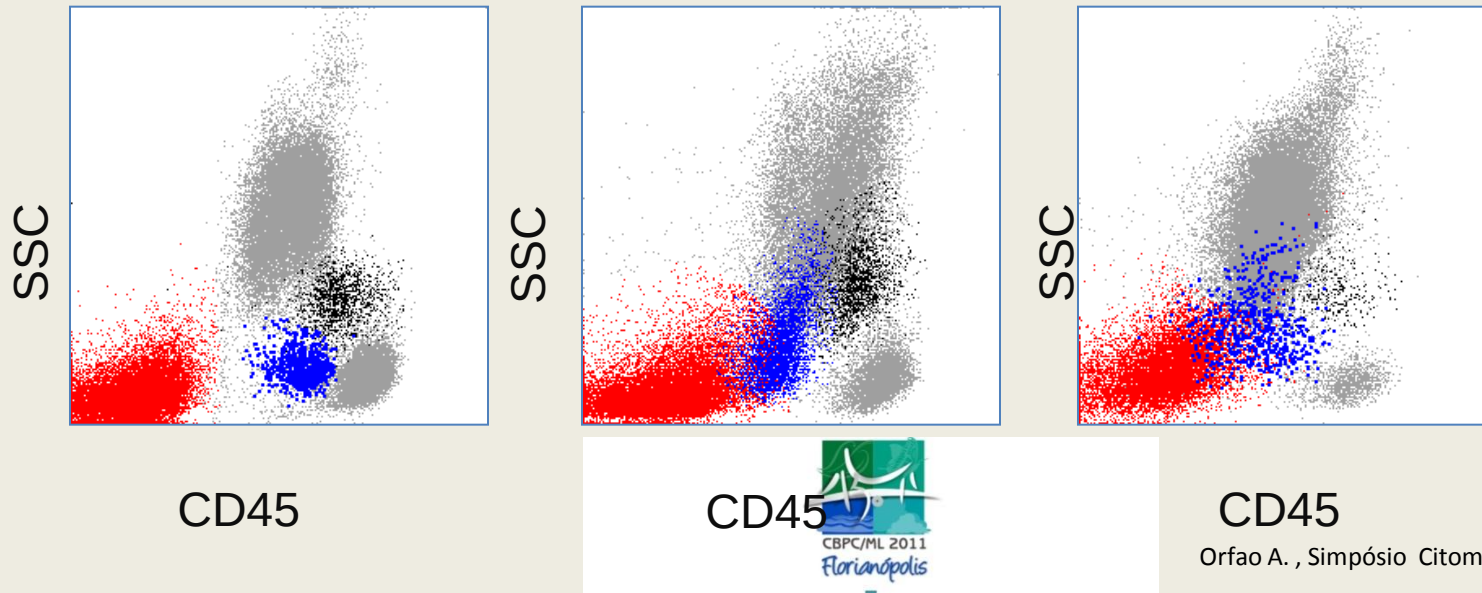
Caracterização imunofenotípica

MO normal x MO alterada

MO Normal



MO :Fenótipos Alterados



Alterações da Hematopoese

Celularidade

MO

SP

❖	MO	+ ↓ SP	MIELODISPLASIA
❖	↓ MO	+ ↓ SP	APLASIA MEDULAR
❖	↑ MO (bl)	+ ↓ SP(↑bl)	LEUCEMIA AGUDA
❖	↑ MO	+ ↓ SP	MEGALOBLASTICA
❖	↑ MO	+ ↑ SP	MIELOPROLIFERATIVO

Importância da diferenciação imunofenotípica da Hematopoese

O conhecimento da expressão fenotípica dos marcadores de linhagem, maturidade e imaturidade na hematopoese normal é fundamental para o reconhecimento dos **padrões anormais de diferenciação**

É importante combinar os anticorpos monoclonais em painéis que permitam separar as diferentes populações de acordo com a linhagem, seu grau de diferenciação e detectar a presença de **desvios ou aberrações celulares**



