

Tendências / Trends

## Identificação de células tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado

### *Identification of the hematopoietic stem cells: conventional flow cytometry versus automated hematological counter*

Helena Z. W. Grotto  
José F. A. Noronha

A célula tronco hematopoiética (*stem cell*) é definida como uma célula com grande capacidade de auto-renovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sangüíneas e a reconstituição da população hematopoiética a partir de uma única célula.<sup>1</sup> Constituem de 0,05% a 0,1% da medula óssea humana e das células hematopoiéticas circulantes. O fenótipo da célula tronco hematopoiética inclui a expressão dos antígenos CD34 e CD90 (Thy-1) e ausência do CD38. O antígeno CD34 funciona como uma molécula de adesão e o Thy-1 parece estar envolvido na sinalização da transdução gênica.<sup>2</sup> Um subgrupo primitivo das *stem cells*, correspondente aos precursores das células CD34<sup>+</sup>, não expressa ou expressa quantidades muito baixas de CD34. Essas células podem ser selecionadas por possuírem marcador para CD133 e são parte predominante de um pool quiescente de células precursoras hematopoiética e mesenquimal. Essas células CD34<sup>+</sup> podem se diferenciar em células CD34<sup>+</sup>, circulam no sangue periférico, voltam à medula (*homing*), aumentando a população de células progenitoras.<sup>3</sup> Sugere-se que a expressão do CD34 varie dependendo do estado de ativação da *stem cell*.<sup>4</sup> Outra característica da célula tronco é a presença da gp 170 de membrana (MDR-1), responsável pelo efluxo de agentes quimioterápicos e corantes vitais.<sup>5</sup>

Um aspecto interessante das células tronco da medula é a sua plasticidade, ou seja, a sua capacidade de se converter de um tipo a outro de célula, podendo se diferenciar em células não hematopoiéticas. Em artigo recente, Moore e Quesenberry<sup>6</sup> discutem diversas questões a respeito da plasticidade das células tronco e usam o termo *transdiferenciação* como o processo em que uma célula de uma linhagem particular é convertida em célula de outra linhagem, implicando num movimento horizontal de uma linhagem a outra. O assunto é fascinante porque faria da infusão de células tronco uma ferramenta terapêutica promissora, capaz de reconstituir órgãos e reparar tecidos. Vários estudos têm indicado que *stem cells* da medula óssea têm o potencial de se diferenciar em células maduras do coração, fígado, rim, músculos e cérebro, por exemplo.<sup>7-12</sup> Apesar do entusiasmo que o assunto possa gerar, na revisão sobre o tema os autores enfatizam que há necessidade de outros estudos, onde resultados mais contundentes e precisos possam estabelecer as reais características das células envolvidas e dos processos em que participam.<sup>6</sup>

Mais consistente e já consagrado na prática médica como uma modalidade de tratamento efetivo é o transplante autólogo e alogênico de células progenitoras do sangue periférico (PBSC) em pacientes com doenças hematológicas, imunodeficiência, doenças genéticas e alguns tumores como o câncer de mama.<sup>13-16</sup> O procedimento consiste, através de quimioterapia e/ou radioterapia, na eliminação dos sistemas hematológico e imune do

---

Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp.

**Correspondência para:** Prof. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto  
Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp – Departamento de Patologia Clínica  
Caixa Postal 6111 – 13084-971 – Campinas-SP  
Email: grotto@fcm.unicamp.br

paciente e a reinfusão de células progenitoras coletadas do sangue periférico após estímulo com fator de crescimento. Tem como principal vantagem sobre o transplante autólogo de medula óssea promover uma rápida e durável reconstituição hematopoiética, além de reduzir o número de transfusões, episódios febris, uso de antibióticos e dias de internação.<sup>17,18</sup> Como a quantidade de células tronco hematopoiéticas na circulação é pequena, o transplante é precedido pelo processo de mobilização, que combina o uso de quimioterápicos com fatores de crescimento celulares. Desse modo, um número substancialmente maior de células pode ser obtido. Tem sido preconizado que o número total de células colhidas idealmente deve ser de, pelo menos,  $5 \times 10^6$  células/kg de peso para que haja uma boa recuperação medular pós-infusão.<sup>19</sup> No entanto, alguns estudos mostram sucesso na “pega” do enxerto com um número menor de células mobilizadas,<sup>20,21</sup> enquanto pacientes que recebem menos de  $1$  a  $2 \times 10^6$  células/kg têm maior chance de apresentar um retardamento ou falha no transplante.<sup>22</sup> São apontados vários fatores relacionados ao produto ou número de aféreses necessárias no processo de mobilização, como: tempo de diagnóstico, tipo e duração de quimioterapia prévia,<sup>23</sup> número de células CD34<sup>+</sup> no sangue periférico antes do procedimento,<sup>24</sup> dia de recuperação dos leucócitos após a administração de quimioterapia e fator de crescimento.<sup>25</sup> Mais recentemente, num estudo retrospectivo com 104 pacientes (62,5% deles com diagnóstico de câncer de mama e 25% com doenças hematológicas), mobilizados com quimioterapia e G-CSF recombinante, foi observado que o melhor fator preditivo para o número total de células CD34<sup>+</sup> coletadas foi a concentração de células CD34<sup>+</sup> no sangue periférico no dia da aférese ( $r^2 = 0,78$ ,  $p < 0,001$ ), seguido pelo número de células CD34<sup>+</sup> no sangue periférico no dia anterior à aférese ( $r^2 = 0,55$ ,  $p < 0,001$ ).<sup>26</sup>

Um aspecto importante no processo de mobilização é precisar o momento em que a aférese deve ser iniciada e, assim, evitar coletas improdutivas. Têm sido sugeridos alguns fatores preditivos para o início da coleta, como contagem de leucócitos circulantes,<sup>27</sup> a concentração de células CD34<sup>+</sup> no dia da aférese,<sup>28</sup> a contagem absoluta de monócitos<sup>29</sup> e de plaquetas.<sup>30</sup>

A determinação do número de células CD34<sup>+</sup> na circulação tem sido considerada o melhor parâmetro para indicar o momento de se iniciar o

procedimento de coleta de PBSC e o número de aféreses necessárias para que se atinja o número de células desejado a ser infundido. Normalmente, a identificação e quantificação de células CD34<sup>+</sup> é feita através de citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD34<sup>+</sup>.<sup>31</sup> A citometria de fluxo, entretanto, é um método relativamente demorado e caro. Um método simples e rápido de identificar as PBSCs é proposto pelos contadores hematológicos de última geração, utilizados rotineiramente na realização dos hemogramas. A tecnologia envolvida consiste da utilização de um reagente capaz de separar as células maduras das imaturas, valendo-se da diferença constitucional da membrana das células de acordo com seu grau de maturidade. Leucócitos imaturos têm menos colesterol, mais fosfatidilcolina e menos esfingomielina na composição lipídica da membrana do que células maduras.<sup>32</sup> Através de um reagente lisante ocorre o rompimento imediato da membrana dos eritrócitos e dos leucócitos maduros, enquanto a membrana dos leucócitos imaturos é também lesada, formando pequenos poros por onde surfactantes presentes no mesmo reagente penetram nas células e fixam o citoplasma antes que tenha sido dissolvido. Assim, essas células são fixadas com sua membrana e citoplasma retidos. Posteriormente, essas células são detectadas por radiofrequência (RF), que fornece informações sobre o conteúdo celular, como tamanho do núcleo, densidade e presença de grânulos, e sinal de corrente direta (DC), que reflete o tamanho e volume das células. Essas células são quantificadas e identificadas como HPCs (*hematopoietic progenitor cells*).<sup>33</sup>

Os primeiros trabalhos de avaliação das HPCs datam de 1995 e mostraram uma significativa correlação ( $r = 0,90$ ,  $p < 0,01$ ) entre a porcentagem de células CD34<sup>+</sup> identificadas pelo citômetro usual e as HPCs detectadas por equipamento hematológico em amostras de PBSC.<sup>34</sup> A quantificação de células CD34<sup>+</sup> e HPC durante a mobilização de PBSC mostra boa correlação desses parâmetros no que diz respeito à sinalização para iniciar a aférese.<sup>35</sup> Pollard et al<sup>36</sup> conduziram um trabalho semelhante e estudaram a possibilidade da quantificação de HPC ser indicativa do momento de iniciar-se a aférese, em substituição à contagem de células CD34<sup>+</sup> feita por citometria de fluxo. Através de seus resultados puderam concluir que a contagem de HPC inclui outras células além daquelas CD34<sup>+</sup>, provavelmente células mais maduras ou outra população proge-

nitora. Observaram, ainda, que a quantificação de HPC obtida pelo equipamento hematológico como preditora do produto da aférese (número de células progenitoras coletada) poderia servir como teste de triagem: contagens de HPC inferiores a  $10 \times 10^6/l$  deveriam ser confirmadas pela contagem de células CD34<sup>+</sup>, enquanto, se superiores a este valor, seriam favoráveis ao início da aférese. Uma segunda fonte de células precursoras seria o sangue de cordão umbilical. Contagens de HPC em sangue de cordão foram comparadas às contagens de células CD34<sup>+</sup> e número de unidades formadoras de colônia (CFUs). De acordo com os valores de *cut off* estabelecidos para se iniciar a aférese, a porcentagem de falsos negativos do método automatizado para detecção das HPC foi de 70,4%, o que demonstra a limitação do método usando sangue de cordão.<sup>37</sup> Em estudo recente, foi relatada a determinação das HPCs em pacientes com linfoma e mieloma múltiplo. A correlação entre as contagens de HPC e células CD34<sup>+</sup> foi boa, mesmo quando as contagens de HPC estavam baixas, o que sugere que a determinação de HPC pode ser usada como indicativa do momento que a aférese deve ser iniciada.<sup>38</sup>

A nossa experiência com a utilização dos contadores hematológicos na determinação das HPC em sangue periférico de pacientes mobilizados é parcial, mas tem mostrado resultados interessantes. Acompanhamos até o momento 18 pacientes atendidos no Hemocentro/Unicamp e observamos o comportamento dessas células durante o processo: ausência durante o período mieloablativo pós- quimioterapia e aparecimento em quantidades crescentes durante a recuperação medular. Em dois pacientes que apresentaram falha no regime de mobilização, as HPC estiveram ausentes durante todo o seguimento. A ausência de HPC no material de hemograma poderia ser, então, um contra-indicativo da contagem de células CD34 pela citometria convencional, e, obviamente, do início da aférese.

A pergunta que se faz é a seguinte: é possível substituir a contagem de células CD 34<sup>+</sup> pelo citômetro convencional pela contagem das HPCs realizada pelos contadores hematológicos automatizados? A nosso ver, neste momento, essa substituição seria precipitada. De acordo com os dados da literatura, podemos observar que os estudos realizados usando a determinação de células progenitoras pelos equipamentos de automação, embora não conclusivos, são promissores. Novos

estudos devem ser conduzidos no sentido de se avaliar com precisão que tipo de célula está sendo realmente detectada, a sensibilidade e especificidade do método nos regimes de mobilização de PBSC e em outros procedimentos onde a determinação dessa célula seja importante. A possibilidade de utilizar esse método, simples e rápido, como auxiliar no monitoramento dos processos de mobilização de PBSC merece ser investigada.

### Referências Bibliográficas

1. Quesenberry PJ, Colvin GA. in *Williams Hematology*. Ed Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, 6<sup>th</sup> ed.: 153-174, McGraw-Hill Companies, North America, 2001.
2. Humeau L, Bardin F, Maroc C, Alario T, Galindo R, Mannoni P, Chabannon C. Phenotypic molecular, and functional characterization of human peripheral blood CD 34<sup>+</sup>/Thy1<sup>+</sup> cells. *Blood* 1996;87:949-955.
3. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34 hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem cells* 2000;18:1-9.
4. Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999; 94 (8):2.548-2.554.
5. Goodell MA, Rosensweig M, Kim H et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997;3:1.337-1.345.
6. Moore BE, Quesenberry PJ. The adult hemopoietic stem cell plasticity debate: idols vs new paradigms. *Leukemia* 2003;17:1.205-1.210.
7. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1.229-1.234.
8. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Aversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci* 2001;938:221-229.
9. Masuya M, Drake CJ, Fleming PA et al. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood* 2003;101: 2.215-2.218.
10. Szmítko PE, Fedak PWM, Wisel RD et al Endothelial progenitor cells. New hope for a broken heart. *Circulation* 2003;107:3.093-3.100.
11. Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood *J Neurosci Res* 2002;16;69(6):880-893.
12. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Am N Y Acad Sci* 2001;938:208-218.
13. Baynes RD, Hamm C, Dansey R, et al. Bone marrow and peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation: focus on autografting. *Clin Chem* 2000; 46(8B):1.239-1.251.

14. Lenarsky C, Parkman R. Bone marrow transplantation for the treatment of immune deficiency states. *Bone Marrow Transplant* 1990;6:361-369.
15. Lenarsky C, Kohn DB, Weinberg KI, Parkman R. Bone marrow transplantation for genetic diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990;4(3):589-602.
16. Antman KH, Rowlings PA, Vaughan WP et al. High dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support for breast cancer in North America. *J Clin Oncol* 1997;15:1.870-1.879.
17. Byrne JL & Russel NH. Peripheral blood cell transplants. *Clin Pathol* 1998;51:351-355.
18. Schmitz N, Linch DC, Dreger P, et al. A randomised trial of filgrastin-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 1996; 347: 3.563-3.570.
19. Stiff PS. Management strategies for the hard-to-mobilize patients. *Bone Marrow Transplant* 1999;23 (suppl 2):S29-S33.
20. Gandhi MK, Jestice K, Scott MA et al. The minimum CD34 threshold depends on prior chemotherapy in autologous peripheral blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(1):9-13.
21. Fu S, Liesveld J. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev* 2000;14:205-218.
22. Besinger W, Appelbaum F, Rowley S et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral blood stem cells. *J Clin Oncol* 1995;13:2.547-2.555.
23. Ketterer N, Salles G, Moullet I et al. Factors associated with successful mobilisation of peripheral blood progenitor cells in 200 patients with lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 1998;103:235-242.
24. Schwella N, Siegert W, Buyer KJ et al. Autografting with blood progenitor cells: predictive value of preapheresis blood cell counts on progenitor cell harvest and correlation of the reinfused cell dose with hematopoietic reconstitution. *Ann Hematol* 1995;71:227-234.
25. Marques JV, Vigorito AC, Aranha FJ et al. Early total white blood cell recovery is a predictor of low number of apheresis and good CD34<sup>+</sup> cell yield. *Transfus Sci* 2000;23(2):91-100.
26. Ford CD, Chan KJ, Reilly WF, Petersen FB. An evaluation of predictive factors for CD34<sup>+</sup> cell harvest yields with chemotherapy and growth factors. *Transfusion* 2003; 43:622-625.
27. Keung YK, Cobos E, Dunn D et al. Determining factors for the outcome of peripheral blood progenitors cells harvest. *J Clin Apheresis* 1996;11:23-26.
28. Schwella N, Beyer J, Schwaner I et al. Impact of preleukapheresis cell counts on collection results and correlation of progenitor-cell dose with engraftment after high-dose chemotherapy in patients with germ cell cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:1.114-1.121.
29. Hansson M, Stevenson A, Engervall P et al. Increase of monocytes predicts mobilization of peripheral stem and progenitor cells after chemotherapy followed by G-CSF administration. *Eur J Haematol* 1995;54:321-328.
30. Morton J, Morton A, Bird R et al. Predictors for optimal mobilization and subsequent engraftment of peripheral blood progenitor cells following intermediate dose cyclophosphamide and G-CSF. *Leukemia Res* 1997; 21: 21-27.
31. Auer RL, Holtom P, Smith H, Fegan CD, Milligan DW. Circulating CD 34<sup>+</sup> counts and apheresis planning. *Hematol Oncol* 1998;16:69-75.
32. Eugene LG. Lipid patterns of leukocytes in health and disease. *Semin Hematol* 1972; 9: 241-250.
33. Ishii T, Kawasumi I, Matsumoto H. SE-9000 IMI Channel – focusing on the roles and functions of surfactant. *Sysmex J Intern* 1997;7:123-128.
34. Yamane T, Takekawa K, Tatsumi. Possibility of identification of hematopoietic stem cells using a conventional blood cell counter. *Eur J Haematol* 1995; 55:207-208.
35. Peng L, Yang J, Yang H, et al. Determination of peripheral blood cells by the Sysmex SE-9500. *Clin Lab Haematol* 2001;23(4):231-236.
36. Pollard Y, Watts MJ, Grant D, Chavda N, Linch DC, Machin SJ. Use of haematopoietic progenitor cell count of the SE-9500 to refine apheresis timing of peripheral blood stem cells *Br J Haematol* 1999;106(2):538-544.
37. Kraai R, Reymer AG, Brouwer-Mandema GG, van Beckloven JM, Hoogeboom M, le Cessie S, Kluin-Nelemans JC. Hemopoietic stem and precursors cell analysis in umbilical cord blood using the Sysmex SE-9500 IMI channel. *Cytometry* 2001; 46 (2): 114-118.
38. Vogel W, Kopp HG, Kanz L, Einsele H. Correlations between hematopoietic progenitor cell counts as measured by Sysmex and CD34<sup>+</sup> cell harvest yields following mobilization with different regimens. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128 (7): 380-384.

Avaliação: O tema abordado foi sugerido e avaliado pelo editor.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 15/08/2003

Aceito: 25/08/2003