

capítulo • 2

Hematopoese. Regulação e Microambiente

Helder Henrique Paiva • Eduardo Magalhães Rego

HEMATOPOESE: DEFINIÇÃO E DESENVOLVIMENTO

As diferentes células maduras do sangue apresentam algumas características semelhantes, como a vida-média curta (horas a dias) e a origem comum a partir de Células-Tronco Hematopoéticas (CTHs) presentes na Medula Óssea (MO). Essas células caracterizam-se por serem as mais imaturas na hierarquia de diferenciação para células sanguíneas. As CTHs são aquelas capazes de dar origem às mais diversas linhagens hematopoéticas, como eritroides, mieloides e linfoides, além de apresentarem a capacidade de reconstituir a hematopoese, no longo prazo e de forma completa, de um indivíduo (humano ou cobaia animal), após terapias supressoras como radioterapia ou quimioterapia.

As CTHs são classificadas em duas subpopulações: a LT-HSC e a ST-HSC. A LT-HSC (*Long Term Hematopoietic Stem Cell*) é a responsável pela manutenção do *pool* hematopoiético imaturo e indiferenciado. Essas células, chamadas de vida-longa (*long term*) geralmente estão na fase G_0 do ciclo celular, de forma que se mantêm relativamente constantes e presentes ao longo de toda a vida, sofrendo poucos ciclos de divisões mitóticas. A ST-HSC (*Short Term Hematopoietic Stem Cell*) também é quiescente, como a anterior, entretanto se origina de divisões celulares assimétricas da LT-HSC, resultando célula-filha LT-HSC e outra ST-HSC, com potencial maior de proliferação e comprometimento para gerar os precursores das diferentes linhagens sanguíneas. Os últimos são conhecidos como *unidades formadoras de colônias* (do inglês CFU, *Colony-Forming Units*) e podem dar origem a uma ou mais linhagens hematopoéticas. Por exemplo, o precursor CFU-G (*Colony-Forming Unit – Granulocytic*) produz apenas granulócitos, enquanto o CFU-GM (*Colony-Forming Unit – Granulocytic/Monocytic*) produz granulócitos e monócitos. Quanto mais diferenciado o precursor, menor é o número de tipo celular a que pode dar origem.

As CTHs são responsáveis pela produção de 10^9 glóbulos vermelhos e 10^8 leucócitos em média, por hora, além da produção de plaquetas e de outras linhagens celulares. Essa alta atividade proliferativa, entretanto, não está associada à extinção do *pool* de CTHs, uma vez que, além de produzir progenitoras das diferentes linhagens hematopoéticas, as CTHs também são capazes de produzir, através da divisão celular, células-filhas que preservam as características de CTHs. Chamamos de *hematopoese* ao conjunto de eventos envolvidos em três principais funções fisiológicas: 1) auto-manutenção do *pool* indiferenciado de CTHs; 2) geração e manutenção do *pool* de células comprometidas com uma linhagem hematológica (chamadas precursoras); e 3) proliferação e diferenciação de células precursoras em células diferenciadas que migram para a corrente sanguínea.

Em humanos, a hematopoese inicia-se trinta dias após a formação do embrião. Nesta fase, chamada *primitiva*, as CTHs estão localizadas no saco vitelínico e são capazes de dar origem apenas a eritrócitos. A capacidade de gerar todas as linhagens hematopoéticas e de autorrenovação das CTHs (fase *definitiva* ou *adulta*) emerge na quarta semana de gestação, quando o nicho hematopoiético passa a localizar-se na mesoderme (mais especificamente, nas regiões da Aorta-Gônadas-Mesonefro (AGM). Ainda na vida intrauterina, a hematopoese migra da AGM para a placenta e fígado fetal em torno da quinta semana e, definitivamente, para a medula óssea na décima segunda semana de gestação. Após o nascimento, a MO é a única responsável pela produção de células hematopoéticas, salvo em alguns casos patológicos quando pode ocorrer *metaplasia* – expansão de tecido hematopoiético para regiões extramedulares, como baço e fígado.

Nos primeiros anos da infância, a atividade hematopoiética pode ser detectada em todos os ossos e em toda a medula óssea. Próximo da puberdade, há a substituição gradual da medula hematopoiética ativa (chamada verme-

lha), por um tecido gorduroso (amarelo). Esse processo ocorre principalmente em ossos longos e inicia-se nas diáfases, restringindo gradualmente o tecido hematopoético ativo às epífises, além de ossos chatos como pélvis, crânio, vértebras, costelas e esterno.

A hematopoese tem como pré-requisito a existência de um microambiente normal, capaz de sintetizar fatores necessários à sobrevivência das células progenitoras, favorecer as interações entre células de diferentes tipos e acomodar as células em desenvolvimento. Desta forma, nos diferentes nichos hematopoéticos descritos desde a vida uterina até fase adulta, existem, além dos precursores hematopoéticos, outras células, que constituem o estroma, formado por componente celular (representado por fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, células-tronco mesenquimais, adipócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais dos sinusoides medulares), e um componente acelular, composto por substâncias que modulam as atividades celulares, chamadas fatores de crescimento, citocinas e proteínas de matriz extracelular, as quais favorecem a organização e a estrutura da MO. A regulação de CTH compreende, portanto, um processo multifatorial, incluindo também sinais químicos, físicos e mecânicos, como temperatura, força de cisalhamento, tensão de O_2 constituintes de matrix e presença de íons (ex.: Ca^{+2}).

A seguir descreveremos os principais aspectos do microambiente e dos fatores humorais relevantes para a regulação da hematopoese.

MICROAMBIENTE E FATORES DE CRESCIMENTO

► Microambiente

A exposição das CTHs a diferentes microambientes durante a vida uterina tem importante influência na sua maturação e em seu desenvolvimento. Na AGM e placenta fetal, as células hematopoéticas originam-se no endotélio de grandes vasos, como vitelínico, aorta dorsal e artérias umbilicais. Esses dados fomentam a hipótese de *endotélio-hemogenia*, segundo a qual as CTHs surgem diretamente de células endoteliais, que perdem as características fenotípicas endoteliais e passam progressivamente a expressar marcadores hematopoéticos. Por outro lado, a hipótese da origem das CTHs a partir de *hemangioblastos* defende a existência de um precursor bipotente e indiferenciado comum às células endoteliais e hematopoéticas. Ainda durante a gestação, a hematopoese fetal migra para a medula óssea, que se torna, por fim, o principal reservatório de células-tronco. Acredita-se que essa realocação seja resultado do surgimento de osteoblastos e condrócitos, que são, então, capazes de formar o novo nicho para manutenção e desenvolvimento de CTH.

De forma simplista e didática, dois tipos de nichos medulares têm sido descritos: o *endosteal* ou *osteoblástico*, onde as células-tronco hematopoéticas permanecem próximas aos osteoblastos das trabéculas ósseas; e o *perivascular*, onde as

células-tronco ficam mais próximas do endotélio vascular (sinusoides da medula), nos quais a tensão de O_2 é maior. As células hematopoéticas mais imaturas estão localizadas ao longo da superfície *endosteal*, com um gradiente de diferenciação movendo-se em direção ao eixo central da cavidade medular para a região perivascular. As células adiposas situam-se adjacentes aos sinusoides e também participam da regulação da hematopoese secretando fatores solúveis inibitórios de diferenciação e funcionando como uma reserva de lipídeos que são necessários ao metabolismo das células em proliferação. De fato, o nicho das células-tronco hematopoéticas atua como uma unidade funcional e anômica onde células do tecido ósseo, células endoteliais, adiposas e elementos mesenquimais coexistem em proximidade, regulando as células-tronco de forma combinada.

Várias moléculas relacionadas ao estroma estão envolvidas na regulação de CTH. O fator de células-tronco (*Stem Cell Factor* – SCF) é produzido por células endoteliais, quer na forma solúvel, quer como uma proteína transmembrana. SCF liga-se ao receptor KIT (também conhecido como SCFR e CD117) presente na superfície das CTHs. Esta ligação é necessária para a regulação tanto da manutenção do estado quiescente característico das células-tronco, quanto da sua localização no nicho. As CTHs também expressam Notch, que se une ao seu ligante Jagged 1 em osteoblastos e, assim, desencadeiam sinais que contribuem para evitar a diferenciação. Osteoblastos e células endoteliais também secretam moléculas quimioatraentes que orientam a volta de células-tronco para a medula óssea, quando estas estão presentes na corrente sanguínea (*homing*). Por exemplo, a quimiocina CXC-12 (CXCL12, também conhecida como SDF1) é produzida por osteoblastos e células endoteliais medulares e se liga ao receptor de quimiocina CXC-4 (CXCR4) da superfície de CTH.

Estudos *in vivo* realizados com camundongos geneticamente modificados contribuíram para a melhor compreensão da relação entre o estroma e as células hematopoéticas. O produto do gene *W* é o receptor de membrana chamado c-Kit (CD117), expresso na superfície das células progenitoras hematopoéticas. O produto do gene *Sl* é o ligante de c-Kit, também chamado *Stem Cell Factor* (SCF), expresso em forma solúvel e na membrana de células estromais. Mutações que causam a inativação desses genes, quando presentes em homozigose (*W/W* e *Sl/Sl*), são letais ao embrião. Entretanto, foram identificados alelos *W* e *Sl* mutantes que mantêm parte de sua função, chamados *W^v* e *Sl^d*. Camundongos heterozigotos *W/W^v* e *Sl/Sl^d* apresentam efeitos pleiotrópicos comuns: alterações pigmentares, esterilidade e anemia congênita. Animais *W/W^v* quando irradiados de forma subletal e, em seguida, transplantados com células-tronco provenientes da medula óssea de um camundongo normal (tipo selvagem) foram capazes de reconstituir a hematopoese, o mesmo não ocorrendo com os mutantes *Sl/Sl^d*. O experimento complementar, no qual a medula óssea de camundongos *Sl/Sl^d* foi injetada em receptores *W/W^v* irradiados, mostrou que a hematopoese era reconstituída

nos receptores. Esse conjunto de experimentos mostrou que os mutantes Sl/Sl^d possuem células-tronco normais e o estroma defeituoso, enquanto que nos camundongos W/W^v ocorre o oposto. Desta forma, a ativação do receptor *c-Kit* é essencial para a sobrevivência e o desenvolvimento das células progenitoras hematopoéticas.

Além do SCF, o estroma também é responsável pela produção de G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, TGF- β , entre outros fatores que participam da regulação da hematopoese. O estroma ainda contém matriz extracelular composta por várias proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas produzidas pelas células estromais. Essas macromoléculas que mantêm a estrutura tridimensional do compartimento e que dão suporte às células incluem o colágeno (tipos I, III, IV, V e VI), fibronectina, laminina, hemonectina, sulfato de heparina e sulfato de condroitina. As células progenitoras hematopoéticas possuem receptores de superfície para essas macromoléculas e se ligam a sítios específicos do estroma, o que, acredita-se, contribui para regular sua proliferação e diferenciação.

► Fatores de crescimento

A regulação da hematopoese é dependente tanto de interação célula-célula quanto de fatores de crescimento solúveis presentes nos diferentes microambientes, compondo os nichos hematopoéticos. Os fatores de crescimento são glicoproteínas secretadas pelas células estromais que atuam na sobrevivência, na proliferação e diferenciação das células hematopoéticas. São citocinas e hormônios que se ligam a receptores específicos nas superfícies das células-tronco e células progenitoras exercendo atividades modulatórias sobre elas. Esses fatores não possuem uma função única, podendo ser relevantes para a sobrevivência das células-tronco em uma dada associação de citocinas ou ser importantes para a função de células diferenciadas em outra nova combinação. Os efeitos da associação desses fatores podem ocorrer de duas formas: a) permitindo a proliferação e diferenciação de células que, sem o estímulo, morreriam ou permaneceriam quiescentes; ou b) agindo em sinergismo na proliferação de uma subpopulação específica de células precursoras.

Durante o estágio embrionário, as linhagens estromais da AGM produzem altas quantidades de fatores que estimulam a expansão de células-tronco e a formação de precursores hematopoéticos. São mais comuns, nesta fase, a expressão de BMP-4 (*Bone Morphogenetic Protein-4*), uma proteína da família do TGF- β ; do fator neurotrófico β -NGF (*β -Nerve Growth Factor*); e da quimiocina (C-C) MIP- γ (*Macrophage Inflammatory Protein- γ*). No fígado

fetal, angiopoietina 2 e 3 e IGFBP-2 (*Insulin Growth Factor Binding Protein-2*) foram identificadas como os principais fatores responsáveis pela manutenção da autorrenovação das CTHs, além de sua expansão e diferenciação.

Os osteoblastos secretam G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e interleucina 6 (IL-6), os quais estimulam sobrevivência e diferenciação das CTHs. Ainda, osteoblastos produzem angiopoietina, trombopoietina, WNT, Nocht, N-caderina e esteopoietina que, embora os mecanismos de ação ainda sejam desconhecidos, regulam o número de CTH no nicho.

Na regulação da mielopoese, que dá origem a hemácias, granulócitos, monócitos e megacariócitos, a IL-3 e o GM-CSF atuam em um amplo espectro de precursores imaturos, enquanto que o G-CSF e M-CSF são necessários para o desenvolvimento de células granulocíticas e monocíticas maduras, respectivamente. Ademais, o GM-CSF inibe a migração, aumenta a atividade fagocítica e induz a Citotoxicidade Dependente de Anticorpos (*antibody-dependent cytotoxicity*, ADCC) dos neutrófilos polimorfonucleares do sangue. Já o G-CSF induz a síntese de superóxido e estimula a ADCC dos neutrófilos, e o M-CSF ativa macrófagos maduros.

Na regulação da eritropoese, a eritropoietina exerce um papel essencial nos processos de maturação e apoptose dos precursores da linhagem eritroide. Sua produção é controlada pelo teor de O_2 do sangue arterial que irriga as células peritubulares no córtex renal. Além dela, o ligante Kit, a IL-3 e o GM-CSF também participam na regulação da proliferação e diferenciação.

A linfopoese é regulada principalmente por interleucinas, tais como IL-7 e IL-6, que exercem importante função na proliferação dos precursores de linfócitos B, ao passo que IL-2, IL-3 são mais relevantes aos precursores de células T. Deve ser lembrado que a diferenciação das células T se faz no timo, e que as vias envolvidas na proliferação/ativação dos linfócitos serão discutidas em outro capítulo.

In vitro, a megacariocitopoese é regulada por fatores que atuam nos precursores imaturos associados a várias linhagens, tais como IL-3, IL-6, GM-CSF e ligante Kit, e o número de precursores megacariocíticos depende diretamente da presença da combinação desses fatores. Entretanto, a diferenciação dos megacariócitos e a produção de plaquetas são controladas *in vivo* pelo número de plaquetas no sangue periférico, o qual não afeta a produção desses fatores. O fator responsável por esta modulação é a Trombopoietina (TPO), produzida principalmente no fígado, que atua através do receptor da família das citocinas chamado Mpl.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Cannistra SA, Griffin JD. Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Semin Hematol.* 1988;25(3):173-88.
2. Coskun S, Hirschi KK. Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2010;90(4):229-42.
3. Fried W. Erythropoietin and erythropoiesis. *Exp Hematol.* 2009;37(9):1007-15.
4. Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:147-52.
5. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(10):643-55.
6. Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok AA, Touw IP, Friedman AD. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia.* 2000;14(6):973-90.