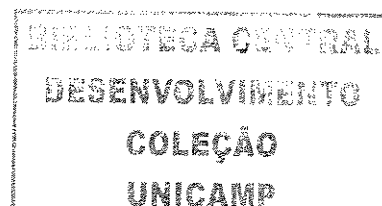


**ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE SANGUE DE CORDÃO  
UMBILICAL HUMANO: IMPLICAÇÃO NO  
CICLO CELULAR**

Campinas-SP

2005



# **ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO: IMPLICAÇÃO NO CICLO CELULAR**

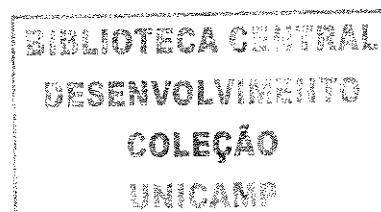
**Aluna: Ângela Cristina Malheiros Luzo**

**Orientadora: Prof Dra Sara T. O. Saad**

*Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas  
para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de  
Clínica Médica.*

Campinas-SP

2005



|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE    | BC                                  |
| Nº CHAMADA | +1/UNICAMP                          |
|            | L979a                               |
| V          | EX                                  |
| TOMBO BC/  | 65962                               |
| PROC.      | 16-P-00086-03                       |
| C          | <input type="checkbox"/>            |
| D          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO      | 11,00                               |
| DATA       | 05/10/05                            |
| Nº CPD     |                                     |

BIBID - 366395

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L979a

Luzo, Ângela Cristina Malheiros

Análise da expressão gênica das células mononucleares de sangue de cordão umbilical humano: implicação no ciclo celular. / Ângela Cristina Malheiros Luzo. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Sara Teresinha Ollala Saad

Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Medula Óssea 2. Expressão gênica. 3. Ciclo celular.  
4. Sangue fetal. I. Saad, Sara Teresinha Ollala. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

## DEDICATÓRIA

---

Fernando e Julia, humildade para reconhecer as limitações que às vezes a vida nos impõe e tentar aprender com seus erros. Persistência para não desistir nos piores momentos, mesmo que vocês achem que desta vez não tem jeito! Sempre existe uma saída ou solução, basta acreditar. Nunca estamos verdadeiramente sós, há sempre alguém ao nosso lado. Amor em todos os seus atos e para com todos, indistintamente. A tese é para vocês, por todo amor, companheirismo e confiança que são a base de nosso relacionamento e que vocês sabem tão bem transmitir. Amo muito vocês.

Aos meus pais, Francisco e Zaida, pelo exemplo de vida em todos os sentidos, e que deve ser seguido por seus filhos e netos. Acho que estarei eternamente em dívida para com vocês. Obrigado pela oportunidade de ter nascido de vocês, de poder compartilhar a vida que vocês levam e como se relacionam. Espero que nós, seus filhos e netos possamos absorver um pouco da sabedoria com que vocês vêm administrando as pedrinhas e as coisas boas que fazem parte de nossa existência.

Professora Doutora Sara, Sarita, é um prazer e honra tê-la como orientadora. A convivência com você, a oportunidade de partilhar toda esta ebulição que faz parte do seu modo de ser, curiosidade científica e disposição para enfrentar novos desafios é algo inestimável. Espero ter a honra de continuar em sua equipe de pesquisa, muito obrigado por tudo.

## AGRADECIMENTOS

---

Bem, A lista é imensa não daria para citar todas as pessoas que de alguma forma interferiram e me ajudaram a realizar este trabalho.

Agradeço a Val e Andréia pela paciência, carinho e apoio. Sem a ajuda de vocês coordenando a casa e tomando conta do Fernando e da Julia, não teria tranquilidade para trabalhar.

Adriana, são quase dez anos de parceria, convivência e amizade. Obrigado por tudo, você é um exemplo de persistência e competência, lhe admiro muito.

Quero agradecer a toda equipe de funcionários da Transfusão, pelo apoio e compreensão durante este período de final de tese. Estamos juntos à muito tempo e vocês já fazem parte da minha família. Vocês são especiais.

Aos alunos e funcionários do Prof Dr Fernando Costa e a equipe de bio-informática que ajudaram na realização e na análise do SAGE muito obrigado. Este foi um trabalho de equipe e sem vocês não teria sido possível realizar. Anderson, Ducinéia, Babi, Camila, Flávia, Gustavo e Tarcísio a convivência com vocês foi muito boa, espero continuar com a parceria e amizade de todos vocês.

Ao Professor Doutor Fernando Costa muito obrigado pelo estímulo e atenção durante todo este tempo.

Arlete e Leonardo a atenção e presteza com que vocês nos socorrem no momento final da tese (correções, impressões, etc), a gente sempre atrasado e com pressa, melhor seria dizer desesperados, vocês nos devolvem a tranquilidade, muito obrigado.

*Lá fora onde árvores são  
O que se mexe a parar  
Não vejo nada senão,  
Depois das árvores, o mar.  
É azul intensamente,  
Salpicado de luzir,  
E tem na onda indolente  
Um suspirar de dormir.  
Mas nem durmo eu nem o mar,  
Ambos nós, no dia brando,  
E ele sossega a avançar  
E eu não penso e estou pensando.*

***Fernando Pessoa***

## SUMÁRIO

---

|                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                                       | xi  |
| LISTA DE TABELAS .....                                                            | ix  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                            | x   |
| RESUMO .....                                                                      | xi  |
| ABSTRACT .....                                                                    | xiv |
| INTRODUÇÃO .....                                                                  | 16  |
| OBJETIVOS .....                                                                   | 27  |
| HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA .....                                                    | 29  |
| Hipótese .....                                                                    | 30  |
| Justificativa .....                                                               | 30  |
| MATERIAL E MÉTODO .....                                                           | 31  |
| 1. Coleta de sangue de cordão .....                                               | 32  |
| 2. Manipulação Celular .....                                                      | 34  |
| 3. Ensaio Clonogénico .....                                                       | 35  |
| - Meio .....                                                                      | 36  |
| - Leitura .....                                                                   | 36  |
| - Meio .....                                                                      | 36  |
| - Concentração celular .....                                                      | 37  |
| 4. Análise da expressão das proteínas de ciclo celular por western blotting ..... | 37  |
| - Separação de células para extração de proteína. ....                            | 37  |
| - Extração de proteína .....                                                      | 37  |
| - Quantificação protéica .....                                                    | 38  |
| - Análise dos resultados através de densitometria no aparelho "Eagle Eye". ....   | 39  |
| 5. Análise Seriada de Expressão Gênica (SAGE) .....                               | 39  |
| - Extração do RNA .....                                                           | 39  |
| - Protocolo SAGE .....                                                            | 40  |
| 6. Análise do SAGE através de programas de bio informática. ....                  | 42  |
| - Sagetags .....                                                                  | 42  |
| - Análise funcional .....                                                         | 43  |

---

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7. Validação do SAGE .....                                                                                      | 43 |
| - Critérios de seleção para os onze genes submetidos à validação.....                                           | 43 |
| - Extração de RNA .....                                                                                         | 44 |
| - Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR).....                                         | 45 |
| <i>RESULTADOS</i> .....                                                                                         | 49 |
| 1. Comparação entre as bibliotecas de sangue de cordão e medula óssea .....                                     | 51 |
| 2. Classificação Funcional .....                                                                                | 51 |
| 3. Validação .....                                                                                              | 54 |
| 4. Ensaio clonogênico de sangue de cordão de neonatos prematuros e de termo e diferenças no ciclo celular ..... | 61 |
| 5. Análise da expressão das proteínas de ciclo, p130 e p107 pela técnica de western blotting .....              | 67 |
| <i>DISCUSSÃO</i> .....                                                                                          | 72 |
| <i>CONCLUSÃO</i> .....                                                                                          | 83 |
| <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....                                                                         | 85 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Cultura de sangue de cordão de neonatos prematuros. ....                                                                                                                                          | 64 |
| Figura 1A: Cultura, em meio de metilcelulose, no 70 dia de cultura ,demonstrando colônia de CFU-GM.....                                                                                                            | 64 |
| Figura 1B: Cultura em meio de metilcelulose, no 70 dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-E em diferentes fases de hemoglobinizacão e CFU-GM. Há intensa proliferação                                         | 64 |
| Figura 1C: Cultura em meio de metilcelulose, no 14 <sup>o</sup> dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-E e intensa proliferação da linhagem granulo-monocítica .....                                          | 65 |
| Figura 1D: Cultura em meio de metilcelulose, no 14 <sup>o</sup> dia de cultura,demonstrando colônia de CFU-E e intensa proliferação da linhagem granulo-monocítica, notando-se a presença de fibroblastos (F)..... | 65 |
| <b>Figura 2:</b> Cultura de sangue de cordão de neonato de termo. ....                                                                                                                                             | 66 |
| Figura 2A: Cultura em meio de metilcelulose, no 7 <sup>o</sup> dia de cultura, demonstrando colônias de CFU-GM.....                                                                                                | 66 |
| Figura 2B: Cultura, em meio de metilcelulose, no 14 <sup>o</sup> dia de cultura, demonstrando colônias de CFU-E em diferentes fases de hemoglobinizacão e colônia de CFU-GM .....                                  | 66 |
| Figura 2C: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 14 <sup>o</sup> dia de cultura, demonstrando colônias de CFU-GM.....                                                                          | 67 |
| <b>Figura 3:</b> Resultado da análise da expressão da proteína de ciclo celular p130 nas células mononucleares de sangue de cordão de prematuros e de termo obtida através da técnica de western blotting. ....    | 68 |
| <b>Figura 4:</b> Resultado da análise da expressão da proteína de ciclo celular p107 nas células mononucleares de sangue de cordão de prematuros e de termo obtida através da técnica de western blotting. ....    | 70 |

## LISTA DE TABELAS

---

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Genes escolhidos para a validação do SAGE.....                                                                                         | 45 |
| <b>Tabela 2:</b> Sequência dos iniciadores ( <i>primer</i> ) utilizados no qPCR.....                                                                    | 48 |
| <b>Tabela 3:</b> Análise global da expressão gênica de células mononucleares de sangue de cordão e medula óssea.....                                    | 50 |
| <b>Tabela 4:</b> Genes 10 x mais ou somente expressos em sangue de cordão. ....                                                                         | 53 |
| <b>Tabela 5:</b> Genes 10 x mais ou somente expressos na medula óssea.....                                                                              | 54 |
| <b>Tabela 6:</b> Ensaios clonogênicos .....                                                                                                             | 61 |
| <b>Tabela 7:</b> Número de colônias hematopoiéticas obtidas de cultivo de células mononucleadas de sangue de cordão de recém – nascidos prematuros..... | 62 |
| <b>Tabela 8:</b> Número de colônias hematopoiéticas obtidas de cultivo de células monucleadas de recém nascidos de termo.....                           | 63 |

## LISTA DE GRÁFICOS

---

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfico 1:</b> | Genes diferencialmente expressos, com abundância $\geq 10$ x ou $\leq 10$ x, classificados de acordo com o programa UniGene. ....                                                                                                               | 52 |
| <b>Gráfico 2:</b> | Resultados da validação do SAGE pelo método de Reação em cadeia pela polimerase em tempo real quantitativo (qPCR). Os resultados forma obtidos da média do $2\Delta\Delta C_t$ das dez amostra de sangue de cordão e sete de medula óssea. .... | 55 |
| <b>Gráfico 3:</b> | Análise da expressão por densitometria das bandas da proteína p130 das amostras de sangue de cordão de prematuros e de termo. ....                                                                                                              | 69 |
| <b>Gráfico 4:</b> | Análise da expressão por densitometria das bandas da proteína p107 das amostras de sangue de cordão de prematuros e de termo. ....                                                                                                              | 71 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

- OMS: Organização Mundial da Saúde.
- CAFC: Unidade formadora de colônias em pequenos poços (96).
- SAGE: Análise seriada de expressão gênica
- CPD: Citrato, fosfato e dextrose
- RPMI: Roswell Park Memorial institute
- CFU-E: Unidade de colônia formadora de linhagem eritrocitária
- CFU-GM: Unidade de colônia formadora de linhagem granulomonocítica
- CFU-GEMM: Unidade de colônia formadora de linhagem granulo, eritro, mono, megacariocítica
- GM-CSF: Fator estimulante de crescimento de linhagem granulocítica
- Rpm: rotações por minuto
- DEPC: Dietilpirocarbonado
- Tags: etiquetas
- Ditags: conjunto de duas etiquetas
- Est: seqüência de tags expressa
- ORFS: Quadro de leitura aberta de seqüências
- PCR: Reação de polimerase em cadeia
- qPCR: Reação de polimerase em tempo real quantitativo
- Primers: Iniciadores

## RESUMO

---

A reconstituição da linhagem hematopoiética é um procedimento comum no tratamento de várias doenças hematológicas e não hematológicas. A medula óssea tem sido a principal fonte de obtenção de células tronco nos últimos 50 anos. Recentemente, células tronco obtidas de sangue periférico pós-mobilização e células mononucleares de sangue de cordão umbilical humano têm sido utilizadas com sucesso. Entretanto, as células tronco parecem ter características diferentes. Vários estudos foram publicados, recentemente, analisando a expressão gênica de sub populações de células tronco de linhagem hematopoiética de medula óssea, sangue periférico e de sangue de cordão. Tendo em vista que os procedimentos de terapia celular e transplante são realizados com a infusão de sangue total, o objetivo deste trabalho foi de analisar a expressão gênica das células mononucleares totais de sangue de cordão umbilical humano, a partir da técnica de análise seriada de expressão gênica (SAGE), e compará-la com a biblioteca de células mononucleares de medula óssea depositada *on line* no *Sagemap database*. A expressão das proteínas de ciclo celular foi estudada através do método de “immunoblotting”, a partir de células de sangue de cordão de recém nascidos prematuros e de termo, submetidas a cultura líquida de curta duração e em cultura em meio semi-sólido de metilcelulose, suplementados com fatores estimulantes de crescimento. As células foram analisadas de quatro em quatro horas durante 24 horas e após, a cada 24 horas até 96 horas. A leitura das culturas em metilcelulose foi realizada no 7º e no 14º dia. A análise de expressão gênica das células mononucleares de sangue de cordão evidenciou: 44.924 *tags totais* (15.519 *tags* únicas; 7772 genes conhecidos; 3935 seqüências preditas ou anotadas e 3812 genes desconhecidos) A medula apresentou 36577 *tags totais* (13075 *tags* únicas, 6711 genes conhecidos; 3371 seqüências preditas ou anotadas e 2993 genes desconhecidos). A análise funcional foi realizada através dos programas *Gene Ontology Consortium* e *David*. A distribuição por categoria foi similar nas duas bibliotecas. A análise detectou 48 genes com diferença na abundância de expressão  $\geq 10$  e  $\leq 10$  e classificados no programa UniGene. Trinta e

cinco foram mais expressos em sangue de cordão e estavam relacionados com resposta imune, ciclo celular e migração trans endotelial (*homing*). A validação do SAGE foi realizada através do método de reação em cadeia da polimerase, em tempo real quantitativo (qPCR), em 11 genes diferencialmente expressos, confirmando os resultados obtidos em 10 dos 11 genes validados, apresentando uma porcentagem de confirmação de 90%. Os resultados de alfa, beta e gama globina foram comparáveis aos da ontogenia da linhagem hematopoiética. F11 receptor, CDC25B, TGFA, SMARCC2, SKP1A, e NKG7 foram mais expressos em sangue de cordão e S100-A8 na medula óssea. A análise dos ensaios clonogênicos evidenciou um aumento significativo no número de colônias no 7<sup>o</sup> e no 14<sup>o</sup> dia nas culturas de sangue de neonatos prematuros, com significância estatística. Houve um aparecimento precoce das colônias no sétimo dia de cultura. As características morfológicas das culturas das células dos prematuros, no sétimo dia, eram semelhantes as das culturas de termo no décimo quarto dia. As culturas de prematuros no décimo quarto dia apresentavam grande quantidade de fibroblastos e se assemelharam, em número e morfologias, às de recém nascidos de termo com vinte e um dias de cultura. A análise da expressão das proteínas de ciclo celular demonstrou aumento de expressão de p130 à partir de 4 horas, cumulativo, desaparecendo ou diminuindo a partir de 24 horas. A expressão de p107 ocorreu após as 24 horas de cultura, acumulando até 96 horas. Entretanto, as expressões de p130 e p 107 foram maiores nas células de sangue de cordão que nas da medula óssea. Estes resultados sugeriram que as células de sangue de cordão umbilical de recém nascidos prematuros poderiam apresentar uma rápida progressão em ciclo celular.

Os resultados aqui obtidos abrem novas perspectivas na caracterização funcional destes genes que poderão contribuir para um maior conhecimento da biologia das células de sangue de cordão umbilical.

## ABSTRACT

---

Haematopoietic reconstitution is a common procedure for many haematological and non-haematological diseases. Up to now, total mononuclear bone marrow cells have been the main source for this procedure. Lately, total mononuclear peripheral and cord blood cells have also been successfully used. Many studies of gene expression profile of bone marrow, peripheral or cord blood manipulated cells have been performed during the last few years but, as total mononuclear cells have usually been used in clinical practice, the present study had the aim to compare, using serial analysis of the gene expression (SAGE), cord blood mononuclear cells with the bone marrow mononuclear cell library already deposited in Sagemap database. The cell cycle proteins expression were analysed by immunoblotting proceeding with umbilical cord blood cells from premature and full term neonates, submitted to clonogenic assays performed with short liquid culture and semi-solid methylcellulose culture, supplemented with growth factors. The cells were collected and analysed each four hours during the first 24 hours. Then, they were collected and analysed each 24 hours till 96 hours

Cord blood revealed 44.924 tags (total) representing 15.519 unique tags (7772 known genes; 3935 sequence predicted or annotated; 3812 no matches). Bone marrow showed 36577 tags (total) representing 13075 unique tags (6711 known genes; 3371 sequence predicted or annotated; 2993 no matches). Genes were annotated using Gene Ontology Consortium. Category distribution was similar in both libraries. We found 48 genes with fold change difference  $\geq 10$  and  $\leq 10$  and UniGene number. Thirty-five were most expressed in cord blood and were related with immune response, cell cycle and homing. SAGE validation was performed by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) of 11 differentially expressed genes confirming the SAGE results in 10 genes with a confirmation rate of 90%. Alpha, beta and gamma globin results were comparable with haematopoiesis ontogeny. F11 receptor, CDC25B, TGFA, SMARCC2, SKP1A, and NKG7 were most expressed in cord blood and S100-A8 in bone marrow. Fourteen highly expressed genes were function described.

The semi-solid cultures analysis demonstrated that the cells of premature neonates had an early growth of CFU-E/BFU-E, CFU-GM and CFU-GEMM on the 7<sup>th</sup> day of culture, and the number of these colonies on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of culture was higher than full term neonate's cells culture with statistic significance. The morphological characteristics on 7<sup>th</sup> day of culture were comparable to those from full term neonates obtained on the 14<sup>th</sup> day. The premature cells cultures on the 14<sup>th</sup> day showed even fibroblasts and were comparable to those of full term neonates on the 21<sup>st</sup> day in terms of number and morphology of the colonies.

The cell cycle protein expression analysis demonstrated the expression of p130 increased after the first 4 hours and accumulated, disappearing, or diminishing after 24 hours. On the other hand the p107 expression appeared after 24 hrs and accumulated until 96 hrs. However, the p130 and p107 expression was twofold higher in premature cells compared to full term cells. These results suggest that premature cells have a rapid exit from G0/G1 to S-phase

Thus, homing, cell cycle differentiation, and immune response related genes seem to be highly expressed in cord blood cells. Further studies verifying the role of these genes may contribute for greater knowledge regarding cord blood cell biology.

# ***Introdução***

---

Células tronco, “*stem cell*”, células progenitoras ou precursoras são células indiferenciadas, pluripotentes que possuem grande capacidade de auto-geração, proliferação, expansão e diferenciação. Nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando a grande plasticidade destas células em reconstituir tecidos lesados e até formar um novo órgão (Hipp *et al*, 2004). Podem ser transfectadas, incorporando de forma adequada a sequência gênica inserida, permitindo a sua utilização em terapia gênica.

Apesar de todas as linhagens celulares se iniciarem a partir de uma célula tronco, dando origem às demais células, durante o desenvolvimento de cada linhagem, elas se transformam em células tidas como maduras, com características definidas, onde a capacidade de regeneração e diferenciação para outras linhagens diminui consideravelmente. Persiste ainda, uma diminuta população de células progenitoras que, quando necessário, inicia o processo de regeneração do tecido. Estas células são de difícil localização, a maioria ainda sem marcadores conhecidos.

As células embrionárias e a linhagem hematopoiética são fontes importantes de obtenção de células tronco. As de origem embrionária são células primordiais, onde as características de auto-geração e capacidade de diferenciação são mais intensas. Elas são obtidas através de embriões (blastocistos) derivados da fertilização *in vitro*, que não foram utilizados (Lanzerdorf, *et al*, 2001; Thomson *et al*, 1998). O blastocisto é incubado com anticorpo anti-trofoectoderma, causando lise do trofoectoderma de modo que somente as células do interior do blastocisto sobrevivam. Esta massa de células seria então retirada e colocada em meio de cultura adequado, proporcionando a proliferação de células tronco de origem embrionária (Solter *et al* 2000). Estas células têm capacidade de auto-geração indefinida e habilidade para se diferenciar em células das três linhagens germinativas. Entretanto, existem algumas dificuldades para a sua utilização como a grande capacidade de diferenciação que dificulta a manipulação e expansão, a possibilidade destas células se diferenciarem em tecido tumoral (Erdo *et al*,

2003) e, por ser uma fonte alogênica, necessitar de altas doses de imunossupressão quando utilizadas.

A clonagem terapêutica, a partir de células embrionárias, seria outra forma de obtenção de células tronco onde o material gênico de uma célula somática do paciente seria transferido para o citoplasma de um óvulo que teria seu núcleo previamente retirado. Este óvulo seria estimulado por processos químico ou elétrico para entrar em divisão até a forma de blastocisto, quando de forma semelhante à citada anteriormente, teria sua massa celular interna isolada e retirada para ser cultivada em meio adequado (Hoechedlinger *et al*, 2003; Lanza *et al*, 1999; Polejaeva *et al*, 2000; Volgestein *et al* 2002). As células obtidas seriam compatíveis com as do paciente, não havendo necessidade de imunossupressão quando utilizadas na reconstituição de tecido lesado (Lanza *et al*, 2002). Apesar de promissor como fonte de obtenção de células tronco que poderiam ser manipuladas para reconstituir tecidos, ou mesmo criar órgãos, esta tecnologia ainda apresenta várias limitações. A eficiência no processo de clonagem ainda é baixa necessitando de um maior número de estudos (Hoechedlinger *et al*, 2002; Rudolf, 2004; Solter *et al*, 2000, Tsunoda *et al*, 2002).

As células de linhagem hematopoiética são utilizadas há vários anos nos procedimentos de terapia celular, como por exemplo, o transplante de medula óssea. À medida que os procedimentos relacionados com o transplante de medula óssea foram evoluindo, os estudos sobre as características e capacidade das celulares transplantadas levaram ao encontro de células do doador em órgãos outros que não a medula (cérebro, fígado, coração pele, pulmão, rim), fazendo surgir a hipótese de que células tronco de linhagem hematopoiética possuiriam plasticidade para, além de reconstituir linhagem hematopoiética, se diferenciarem em outras linhagens. Recentemente, vários artigos foram publicados demonstrando a capacidade das células tronco de linhagem hematopoiética em se diferenciarem em células de outras linhagens como; neurônios, músculo cardíaco, hepatócitos dentre outros (Alvarez-Dolado *et al* 2003; Fukuda *et al*, 2003; Kakinuma *et al*, 2003).

As principais fontes de obtenção das células tronco de linhagem hematopoiética são a medula óssea, o sangue periférico e o sangue de cordão (Brossard *et al* 1990; Broxmeyer *et al*, 1989; Broxmeyer *et al*, 1992; Gluckman *et al*, 1990, Gluckman *et al*, 1997; Wright-Kanuth *et al*, 2001). As células tronco, obtidas destas fontes, parecem ter características diferentes, sendo as da medula e de sangue periférico mais diferenciadas que as de sangue de cordão (Hao *et al* 1996; How *et al*, 1992). Pouco se sabe também sobre o ciclo celular destas células (Meister *et al*, 1994 Ogawa *et al*, 2001, Rozenfeld-Granot *et al*, 2002; Traycoff *et al*, 1994; Wagner *et al*, 2004). Quando comparadas com as de medula óssea e sangue periférico, as células de sangue de cordão apresentam alto nível de proliferação, auto-geração, sendo facilmente transfectáveis e quando expandidas apresentam alta expressão do material gênico transfectado (Kamel-Reid *et al* 1988; Larochele *et al*, 1995; Lubin *et al*, 1991; Lu *et al*, 1996; McCune *et al*, 1988; Moritz *et al*, 1993; Piacibelo *et al*, 1997; Vomoor *et al*, 1994; Wang, *et al* 1997). Segundo Lucotti *et al*, 2000, as células de cordão se encontram em grande parte em G0/G1 e rapidamente evoluíram para fase S, se estimuladas com fatores de crescimento (IL3, SCF e G-CSF), sem haver diminuição da celularidade. Estes dados também se correlacionam com os estudos de Pierelli *et al*, 2000 que descreveram uma maior quantidade de células primitivas subtipo de CD 34<sup>+</sup>, CD 34<sup>+</sup>/ CD 105<sup>+</sup> no sangue de cordão, possibilitando a utilização destas células em protocolos de expansão celular para transplante e terapia gênica.

O sangue de cordão apresenta ainda linfócitos imaturos, o que possibilita a sua utilização em transplantes sem total compatibilidade com o sistema de antígenos leucocitários de histocompatibilidade (HLA) (Champeix *et al*, 1996, Milosevits *et al*, 1995; Rabin-Berzog *et al*, 1992). Esta imaturidade de linfócitos resulta em baixa incidência de doença enxerto versus hospedeiro (GVHD), doença esta indesejável durante a realização de um transplante por aumentar o índice de mortalidade no procedimento (Socié *et al*, 1994). Apesar da imaturidade, o número de linfócitos NK existentes no sangue de cordão é semelhante ao de um indivíduo adulto promovendo a

ocorrência da reação enxerto versus leucemia (GVL), reação esta desejável num transplante (Keever *et al*, 1995).

Entretanto, em relação à diferenciação de células tronco de linhagem hematopoiética para outras linhagens, não há consenso sobre as vantagens de utilização de cada fonte ou se poderíamos utilizá-las indiscriminadamente. Também não há consenso ainda se a diferenciação ocorre por transdiferenciação ou fusão celular e qual seria a vantagem. Alguns estudos (Alvarez-Dolado *et al*, 2003; Camargo *et al*, 2004; Wagner *et al*, 2004 e Willenbring *et al*, 2004) demonstraram que quando as células utilizadas são as da medula óssea, o que ocorre seria uma fusão celular e não uma diferenciação total da célula tronco em outra linhagem. As de sangue de cordão, entretanto, teriam a capacidade de se diferenciar totalmente numa nova linhagem, fato este comprovado em trabalhos de diferenciação para hepatócitos e neurônios (Alvarez-Dolado *et al*, 2003; Newsome *et al*, 2003, Kakinuma *et al*, 2003).

A interferência das moléculas de adesão na capacidade de migração trans-endotelial das células tronco é objeto de estudos atuais que demonstram a importância destes fatores para que ocorra uma melhor reconstituição da medula óssea (Yamagushi *et al*, 1998). No entanto, os resultados são controversos. Alguns autores (Deguchi *et al* 2000; Franssoni *et al*, 2003; Liu *et al*, 2003) demonstraram que as células de sangue de cordão podem ter uma melhor capacidade de migração trans-endotelial (*homing*) que as da medula óssea. Esta capacidade promoveria uma melhor adesão e proliferação destas células no micro-ambiente da medula na vigência de um transplante, apesar do atraso existente na recuperação de linhagem leucocitária e plaquetária durante o primeiro mês, quando o sangue de cordão é utilizado.

Hattori *et al*, 2001 e Zheng *et al*, 2003 relataram que apesar das células de sangue de cordão apresentarem menor expressão de moléculas de adesão, o tratamento ex-vivo com fator estimulante de crescimento recombinante humano, para células tronco humanas (rHu-stem cell factor), por um curto intervalo de tempo, levaria a um aumento na expressão de moléculas relacionadas com migração trans-endotelial, aumentando o

potencial de *homing* destas células. Por outro lado, Denning-Kendall *et al*, 2003; Glim *et al*, 2000 e Ramirez *et al*, 2000 demonstraram que a expansão ex-vivo com citocinas pode aumentar a expressão das moléculas de adesão, mas pode levar a um decréscimo na capacidade de *homing*.

Apesar das vantagens das células provenientes de sangue de cordão sobre as da medula óssea e do sangue periférico, as técnicas de coleta atualmente utilizadas permitem a obtenção de baixo volume de sangue de cordão e conseqüentemente um menor número de células tronco (Tuner *et al* 1992). Este fato dificulta sua utilização para transplante em pacientes acima de 50 quilogramas de peso corpóreo. Recentemente foram publicados estudos onde pacientes adultos foram transplantados com cordões de diferentes doadores na tentativa de se obter número adequado de células (Cohen *et al*, 2004; Dalle *et al* 2004; Gluckman *et al*, 2004; Jacobsohn *et al*, 2004). Deste modo, a expansão destas células ex-vivo seria a solução para a sua utilização em qualquer paciente, independente do peso corpóreo (Broxmeyer *et al* 1992; Hirao *et al*, 1997; Hogan *et al*, 1997).

Para melhor utilizarmos as células tronco de origem hematopoiética de acordo com a fonte de obtenção, seria necessário um melhor conhecimento sobre a fisiologia destas células em relação ao ciclo celular, migração trans-endotelial e resposta imune. Não há estudos sobre o ciclo celular das células mononucleares de sangue de cordão. Não há consenso também, quando comparamos as células de neonatos de termo com os de prematuros (Haneline, *et al* 1996; Liang *et al*, 1998; Li *et al*, 2001; Lim *et al*, 1988; Gasparoni *et al* 2000). Wyrsh *et al*, 2000 em estudos com lentivirus, utilizando células de sangue de cordão de prematuros (24 a 34 semanas de idade gestacional), conseguiram transferência estável e boa amplificação do material gênico introduzido, demonstrando que as células de prematuros podem ser modificadas, e utilizadas em terapia gênica ainda no período intra-útero.

Rozenfeld-Granot *et al*, 2002 demonstraram que o receptor opióide mu está presente em sangue de cordão e apresenta uma maior expressão se comparado com

células CD 34<sup>+</sup> de sangue periférico. A ativação do receptor pode induzir ativação da cascata MAPkinase promovendo melhor resposta na proliferação e diferenciação celular das células de sangue de cordão, em comparação com as de sangue periférico e medula óssea.

Estudos realizados em nosso laboratório, para normatização da técnica de ensaios clonogênicos, demonstraram que o sangue de cordão de prematuros apresentava intensa proliferação, muito acima da observada em neonatos de termo. Apesar da concentração celular utilizada para a realização das culturas nos dois grupos (termo e prematuro) ser a mesma ( $1,0 \times 10^5$  células/ ml de meio), este aumento poderia ser explicado pelo fato de existir maior número de células precursoras (CD34<sup>+</sup>) no sangue de cordão de prematuros. Entretanto, no sangue de cordão de prematuro, observamos não só um maior número de colônias como também diferenciação mais precoce, encontrando-se, já no 7º dia de cultura, grande número de colônias mistas (CFU-GEMM). A cultura das células mononucleares de sangue de cordão de prematuros no 7º dia assemelhava-se às de termo no 14º de cultura e no 14º dia, apresentava colônias de BFU-E, e fibroblastos que são característicos de cultura de 21 dias. Provavelmente estas células poderiam entrar antecipadamente em ciclo celular.

O controle do ciclo celular (entrada e saída de ciclo) é realizado por holoenzimas, ciclinas/CDK, que controlam a progressão das células através do ciclo (Furukawa *et al*, 2002). Estas enzimas regulam em parte a transcrição de dois tipos de genes; o primeiro, cujos produtos protéicos são necessários para o metabolismo de DNA e o segundo, cujos produtos protéicos estão envolvidos com o controle do ciclo celular. Fazem parte da família de proteínas relacionada com o controle negativo de crescimento, a proteína pRB (produto do gene supressor de tumor retinoblastoma) e as proteínas p107 e p130, que são estruturalmente e funcionalmente relacionadas com pRB (Classon *et al*, 2001; Canhoto *et al*, 2000; Garriga *et al*, 1998; Mayol *et al*, 1995; Mayol *et al*, 1996; Smith *et al*, 1996; Takahash-Suzuki *et al*, 1995).

Outra família relacionada com o controle do ciclo é a E2F (Williams *et al*, 1997). A família E2F (E2F1, 2, 3, 4 e 5) são heterodímeros ativos, fatores de transcrição, que se relacionam com a família de proteínas 3DP. A transcrição de E2F é importante para a progressão do ciclo de G1 para fase S e a regulação de alguns genes que atuam no ciclo celular. A expressão de E2F1 é suficiente para induzir as células, em fase S, a entrarem em quiescência (Ishida *et al*, 2001).

As proteínas, pRB, p130 e p107 pertencentes à família retinoblastoma, regulam a atividade de E2F através de associação direta, inibindo a transativação dependente de E2F. Mas, esta associação é dependente do estado de fosforilação destas proteínas. Somente as formas hipofosforiladas são capazes de se ligar aos E2F, causando a inibição da transição G0 para G1, inibindo, portanto, a progressão do ciclo celular (Classon *et al*, 2001; Gaubatz *et al* 2000). As ciclinas/CDK integram sinais positivos e negativos de progressão do ciclo celular, induzindo à hiperfosforilação das proteínas, levando à quebra do complexo de proteínas de ciclo da família retinoblastoma-E2F e a conseqüente transcrição dos genes dependentes de E2F. Cada proteína, forma complexos com um membro específico da família E2F. A pRB se liga à E2F1, E2F2 e E2F3 e são detectadas a partir da metade de G1. As proteínas p130 e p107 se ligam à E2F4 e E2F5. O complexo p130-E2F4 é específico das fases G0 e G1 inicial e apesar de algumas células quiescentes poderem apresentar pRB, este raramente se liga à E2F4. O complexo p130-E2F4 inibe E2F1 e, portanto, a transcrição.

Deste modo, o conhecimento dos fatores que controlam o ciclo celular das células de sangue de cordão tem um papel relevante para viabilizar a expansão e diferenciação das células tronco de sangue de cordão.

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados com o intuito de estudar a expressão gênica das células tronco, assim como, analisar as diferenças existentes entre as células tronco dependente do tipo de fonte de obtenção. A análise comparativa da expressão gênica se tornou possível nos últimos anos, com o advento, dentre outras técnicas, de cDNA microarray (De Risi *et al*, 1997), DNA array com oligo de alta

densidade (Wodicka *et al*, 1997) e a análise seriada da expressão gênica ou SAGE (Claverie *et al*, 1997; Lash *et al*, 2000; Margulies *et al* 2000, Tuteja *et al*, 2004; Velculescu *et al*, 1995).

Os estudos iniciais de expressão gênica foram realizados em camundongos. Philip *et al*, (2000), comparando, células tronco e células maduras de linhagem hematopoiética de camundongos, detectaram vários transcritos super expressos através de análise por subtração de cDNA. Seguindo esta linha de pesquisa Park *et al*, (2001) compararam células tronco de linhagem hematopoiética com uma sub-população de células tronco Thy1.<sup>lo</sup> c-kit<sup>+</sup> Scan-1<sup>hi</sup> Lin<sup>-lo</sup> obtidas de camundongos. O método utilizado foi array de alta densidade e microarray. Eles identificaram ao redor de 5000 clones de cDNA que eram diferencialmente expressos. A comparação de medula óssea total com célula tronco de linhagem hematopoiética de camundongo foi realizada por alguns autores (Tersikh *et al*, 2001; Ma *et al*, 2002 e Alaski *et al*, 2003) que verificaram uma diminuição na expressão de vários genes, assim que as células iniciavam a diferenciação e comesçassem a exprimir genes específicos.

Recentemente Zhong *et al*, (2005) compararam células tronco de linhagem hematopoiética, responsáveis por reconstituição por longo tempo (LTR), com as responsáveis por reconstituição por curto tempo (STR) e demonstraram que 210 genes eram diferencialmente expressos e destes, 72 eram associados com as LTR.

As primeiras análises de expressão gênica de célula tronco de linhagem hematopoiética humana foram realizadas através do método de microarray (Steidl *et al*, 2002; Zhou *et al*, 2001), utilizando-se para a análise, células CD34<sup>+</sup> total, sem seleção de sub-grupo. No trabalho de Zhou *et al*, a análise da medula óssea identificou 42,399 tags únicas. A comparação entre medula óssea e célula tronco obtida de sangue periférico foi realizada por Steidl *et al* que identificaram 65 genes diferencialmente expressos.

Em 2002, dois grupos tentaram definir um fenótipo geral de expressão gênica para células tronco, a partir da análise de medula óssea, neurosfera de camundongos,

células embrionárias de camundongos, células de fígado fetal humano e de camundongo (Ramalho *et al*, 2002 e Ivanova *et al*, 2002). A comparação da lista dos genes super expressos, obtida destes dois trabalhos, foi realizada por outros autores revelando apenas seis genes comuns às duas listas. (Evasikov *et al*, 2003; Fortunel *et al*, 2003; Vogel *et al*, 2003).

Análise de células hematopoiéticas através do método de análise seriada de expressão gênica (SAGE) foi primeiramente publicada por Hashimoto *et al*, (1999) que reportaram a expressão gênica de células dendríticas derivadas de monócitos obtidos de CD34<sup>+</sup> de medula óssea, sangue de cordão e sangue periférico humanos.

Recentemente, dois estudos analisaram comparativamente a expressão gênica de células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão, medula óssea e de sangue periférico humanos (Ng *et al*, 2004 e Georgantas *et al*, 2004).

Ng *et al*, 2004 analisaram a expressão gênica destas células através de micro-arranjos (*Affymetrix Gene Chip*) contendo 12,600 genes e a capacidade proliferativa e de reconstituição de linhagem hematopoiética, através de estudos clonogênicos, *in vitro* e *in vivo*. As células, CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão, demonstraram uma maior capacidade de “pega” que as CD34<sup>+</sup> de medula óssea e sangue periférico nos transplantes realizados. Apresentaram também, um maior número de colônias nas culturas por *limiting-dilution* (CAFC). A análise comparativa da expressão gênica demonstrou 51 genes diferencialmente expressos, entre sangue de cordão e medula óssea e 64 entre medula óssea e sangue periférico. Estes genes estavam envolvidos com proliferação, diferenciação, apoptose e “pega”, confirmando as diferenças observadas entre as células tronco, dependentes da fonte de obtenção.

Georgantas *et al*, (2004) analisaram a expressão gênica de uma sub-população de células tronco de linhagem hematopoiética, CD 34<sup>+</sup>/ CD 38<sup>-</sup>/ Lin<sup>-</sup>, obtidas de medula óssea normal, sangue de cordão umbilical e célula tronco mobilizada de sangue periférico humanos. O método de micro-arranjo foi também utilizado para a análise da expressão (*Affimatrix Gene Chip*).

Estes dois estudos, entretanto, utilizaram populações selecionadas de células hematopoiéticas. Por outro lado, os procedimentos de terapia celular e transplante são realizados com células mononucleares totais obtidas de medula óssea ou de sangue de cordão. A população de células mononucleadas infundidas, além das células tronco e suas sub-populações já conhecidas, apresentam outros tipos de células como linfócitos, células mesenquimais e provavelmente outras células pluripotentes com maior plasticidade, ainda desconhecidas, que interfeririam na pega do transplante proporcionando uma melhor reconstituição da linhagem hematopoiética ou do material gênico transplantado. Recentemente dois estudos foram publicados (Kogler *et al* 2004, Cheng *et al* 2004) relatando a descoberta de outras sub-populações de células tronco, pluripotentes, com grande potencial de expansão, ainda sem marcadores de superfície definidos. No estudo de Kogler *et al*, 2004, a célula descoberta poderia ser expandida de 10 a 15 vezes, podendo se diferenciar de forma homogênea em células de várias linhagens, (hematopoiética, neuronal, condrócitos condroblastos, adipócitos, cardiomiócitos e hepatócitos) tendo sido observada diferenciação sem fusão para linhagem hepatocítica e para cardiomiócitos. Cheng *et al*, 2004, expandiu células aderentes de sangue de cordão que, cultivadas com 5-azatidine, originaram cardiomiócitos. Os estudos de avaliação de contratilidade demonstraram positividade para o corante de troponina.

Apesar da literatura apresentar vários estudos sobre expressão gênica de células tronco de linhagem hematopoiética, ainda não há estudo publicado comparando a expressão gênica das células mononucleadas de sangue de cordão e da medula óssea. Portanto, os objetivos, deste trabalho, foram analisar a expressão gênica de células mononucleares de sangue de cordão através da técnica de análise seriada de expressão gênica (SAGE) e compará-la com a biblioteca de células mononucleares de medula óssea já depositada *on line* no Sagemap *database* e analisar a expressão de proteínas de ciclo celular através da técnica de *immunoblotting*.

# ***Objetivos***

---

- Analisar, através da técnica de análise seriada da expressão gênica (SAGE), os genes expressos em células mononucleares de sangue de cordão e comparar os resultados com a biblioteca de medula óssea existente *on line*.
- Avaliar a expressão de proteínas do ciclo celular através da técnica de *immunoblotting*.

## ***Hipótese e Justificativa***

---

## **Hipótese**

As células mononucleares de sangue de cordão, por serem mais primitivas, podem apresentar diferença na expressão de genes relacionados com ciclo celular, migração trans-endotelial e resposta imune dentre outros, possibilitando maior capacidade de proliferação, diferenciação e expansão que permitem a sua utilização em transplantes sem a total compatibilidade ao sistema de antígenos leucocitários de histocompatibilidade.

## **Justificativa**

O sangue de cordão é uma das principais fontes de obtenção de células tronco de linhagem hematopoiética, devido à facilidade de coleta e características de suas células. Por serem mais primitivas, as células mononucleares têm maior capacidade de proliferação, expansão, auto-geração, diferenciação para outras linhagens e diferente padrão de resposta imune, quando comparadas com as obtidas da medula óssea ou de sangue periférico. No entanto, pouco se sabe sobre a fisiologia destas células. Um melhor conhecimento sobre o assunto nos permitiria escolher a fonte ideal de obtenção de células tronco para propósitos definidos.

## ***Material e Método***

---

## **1. Coleta de sangue de cordão**

A coleta foi realizada segundo protocolo específico do Banco de Sangue de Cordão Umbilical do Hemocentro, descrito a seguir.

### **– Critérios de exclusão**

Foram considerados critérios de exclusão, a presença de ruptura de bolsa amniótica acima de 6 horas anteriores ao parto, temperatura materna acima de 38°C, presença de mecônio no líquido amniótico 3+/4+, gestante em acompanhamento pelo Serviço de Medicina Fetal, gestante portadora de doença auto-imune em uso de corticoesteróide em altas doses (acima ou igual à 1mg/kg peso), gestante portadora de Hipertensão arterial e gestante portadora de Diabetes Mellitus.

### **– Critérios de inclusão**

Foram consideradas aptas, as gestantes que estivessem em trabalho de parto durante o período de dequitação placentária, sem intercorrências clínicas e obstétricas.

A idade gestacional foi avaliada pelo tempo de amenorréia e índice de Capurro e classificada pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). Esta classificação considera imaturidade extrema até 28 semanas, prematuros até 36 semanas e 6 dias e feto a termo acima de 37 semanas.

### **– Técnica de coleta de sangue de cordão**

O sangue de cordão foi coletado em trabalhos de parto normal, via vaginal (preferencialmente) ou cesárea, durante o período de dequitação placentária. Nos partos de fetos de termo, foi utilizada bolsa de coleta específica para sangue de

cordão, com capacidade de 150 ml com 21 ml de anticoagulante (CPD). Na coleta de sangue de cordão de neonatos prematuros, foi utilizada bolsa de coleta de sangue pediátrica de 70 ml com 3 ml de anticoagulante (CPD). Nestas bolsas foram coletadas no máximo 10 ml de sangue, devido à quantidade de anticoagulante adicionado.

O cordão foi clampeado com pinça de Kelly, cerca de 30 segundos após o parto, de 5 a 10 cm do umbigo. Após o clampeamento, a assepsia no cordão foi realizada com polvidine. A veia umbilical foi puncionada perto do clampe, utilizando-se a agulha do tubo coletor da bolsa de coleta. A bolsa foi colocada em cima do agitador, ficando próximo ao chão, em agitação contínua para evitar formação de coágulos. A coleta do sangue foi realizada por gravidade, via contração uterina, até que o término do fluxo, quando então, a agulha foi retirada, o cordão foi gentilmente ordenhado no sentido do períneo com pinça de Kelly, assepsia refeita e realizada nova punção à 5 cm da punção anterior. Este procedimento foi realizado no máximo por duas vezes. Após, quando o sangue parar de fluir ou a placenta aparecer no períneo, fecha-se os clampes e remove-se a agulha.

#### **– Coleta de medula óssea**

As amostras de medula óssea foram obtidas através de punção de crista ilíaca posterior, sob anestesia, após consentimento escrito e informado de sete doadores de medula óssea, de acordo com Protocolo da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas e Hemocentro UNICAMP. Foram coletados 10 ml de medula, e acondicionados em tubos de hemograma, tendo como anticoagulante o EDTA.

## **2. Manipulação Celular**

O fracionamento das células mononucleares e o estudo de viabilidade celular foram realizados segundo os respectivos protocolos do Banco de Sangue de Cordão Umbilical do Hemocentro, descritos abaixo.

### **– Separação de células mononucleares**

A separação foi realizada através de centrifugação com Ficoll-Hipaque, na densidade de 1077. O sangue foi diluído na proporção de 1:2 com meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), colocado gentilmente sobre o Ficoll (1:2) e centrifugado a 1800 rpm por 30 minutos. A nuvem esbranquiçada, que fica na interface do sobrenadante, contendo as células mononucleares foi então recolhida, adicionado RPMI e feito duas centrifugações a 1200 rpm, durante 10 minutos (lavagens). Após cada centrifugação o sobrenadante é descartado e o botão celular dissolvido com RPMI. Após a última centrifugação, o botão foi dissolvido em 1 ml de RPMI sendo analisado quanto à viabilidade celular e realizado a contagem celular.

### **– Vitalidade e contagem celular**

A vitalidade foi observada através da coloração de azul de tripan e a contagem em câmara de Neubauer.

### **– Congelamento**

Como meio de re-suspensão, foi utilizado RPMI com L glutamina e 20% de soro bovino fetal, mantido numa temperatura próxima a 0°C. A concentração celular foi acertada para  $1,0 \times 10^7$  células/ml. O meio para o congelamento consistiu de DMSO, RPMI e soro bovino fetal, na proporção de 1- 2-2, adicionado lentamente, mantendo-se



o tubo em recipiente com gelo. Foi adicionado a mesma quantidade de meio de congelamento que a utilizada para a re suspensão e feito alíquotas em criotubos. O transporte foi realizado em recipiente com gelo. A técnica de congelamento utilizada foi a programada, informatizada, com controle de declínio de temperatura gradual (Cryomed, Forma Scientific).

#### – Descongelamento

O descongelamento foi realizado rapidamente em banho-maria à 37°C, agitando-se delicadamente o tubo que era retirado do banho-maria ainda com a presença de cristal de gelo. O conteúdo do tubo foi despejado em outro tubo contendo 50 ml de RPMI com 20% de soro bovino fetal (SBF). Foram feitas duas lavagens utilizando-se centrifugação à 1200 rpm por 10 minutos. Após a primeira lavagem, as células foram re-suspensão com RPMI e SBF à 20% e, após a segunda, com 1ml de RPMI com L glutamina. A prova de viabilidade com azul de tripan e contagem das células viáveis em câmara de Neubauer foi repetida.

### 3. Ensaio Clonogênicos

Os procedimentos de cultura seguiram os protocolos existentes no serviço, descritos a seguir.

#### Cultura em meio semi-sólido

##### – Concentração celular

- A cultura foi semeada com  $1 \times 10^5$  células /1 ml de meio/ poço.

- **Meio**

- Foi utilizado 0,9% de metilcelulose, 30% de soro bovino fetal, 1% de albumina bovina,  $10^{-4}$  M de 2-mercaptoetanol, 2mM de L glutamina, 50ng/ml de Stem cell factor recombinante, 10ng/ml de GM-CSF, 10ng/ml de Interleucina 3 (Stem Cell Tech, Canadá) e adicionado 2U de eritropoietina recombinante (Sigma) à cada 1 ml de meio. As placas de cultura foram incubadas à 37°C em ambiente humidificado, numa atmosfera de 3% de CO<sub>2</sub>.

- **Leitura**

- A leitura das culturas foi realizada no 7° e 14° dias de cultura. Foram contadas como colônias agrupamentos com mais de 50 células das seguintes linhagens: eritróide (CFU-E/ BFU-E), granulomonocíticas (CFU-GM) e mista, granulo, eritro, mono, megacariocítica (CFU-GEMM).

## **Cultura líquida**

A cultura líquida foi realizada nos dois grupos estudados, prematuros (P) e de termo (T) tendo sido utilizados 47 amostras de sangue de cordão de recém-nascidos prematuros e 47 de termo, congeladas na concentração celular de  $1,0 \times 10^7$  células/ml de meio congelante, previamente estudadas quanto à sua viabilidade e capacidade clonogênica antes da criopreservação e após o descongelamento.

- **Meio**

O meio utilizado consistiu de 10 ml de IMDM (meio de Dulbecco modificado por Iscovich), suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), 2 mM de L glutamina, 10 ng/ml de stem cell factor, interleucina 3 e interleucina 6. As células foram cultivadas em diferentes garrafas para cada horário a ser estudado (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 e 96 horas) e para cada grupo de recém-nascidos (prematuro e de termo). As garrafas foram então colocadas em estufas humidificadas, contendo uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

- **Concentração celular**

O meio foi semeado com 0,5 a  $1,0 \times 10^6$  células / ml de meio.

#### **4. Análise da expressão das proteínas de ciclo celular por western blotting**

No intuito de investigar a diferença de comportamento detectada nos ensaios clonogênicos realizados em meio semi-sólido de metilcelulose, com células mononucleares de sangue de cordão de recém-nascidos de termo e prematuros, utilizou-se, para a análise de expressão das proteínas de ciclo celular, cultura líquida de curta duração, suplementada com fatores estimulantes de crescimento. A cultura foi repicada e as células coletadas para re-avaliação e extração de proteína; de quatro em quatro horas à partir do tempo 0; nas primeiras vinte e quatro horas de cultura, e após, à cada 24 horas até 96 horas. Foram realizados dois experimentos.

- **Separação de células para extração de proteína.**

Ao final de cada período de estudo, a cultura era homogeneizada, as células eram submetidas à centrifugação à 1200 rpm/ minuto, o sobrenadante desprezado e o botão celular re-suspenso com RPMI. A prova de viabilidade (coloração de azul de tripan) e a contagem das células em câmara de Neubauer eram refeitas. As células eram então separadas para extração das proteínas para o estudo de expressão das proteínas relacionadas com ciclo celular.

- **Extração de proteína**

As proteínas das células em cultura foram extraídas utilizando-se Tampão Ripa (*Ripas' Buffer*). As células foram submetidas à centrifugação à 14.000 rpm, à 4°C durante dez minutos e o botão lisado em 100µl da solução tampão que continha

125mmol/L de Tris pH7.5, 4% (wt/vol) sulfato de duodecyl sódico (SDS), 0,4% (vol/vol) de glicerol, 0,5 mmol/L DTT, 0,5 mmol/ml PMS, 0,5 µg/mL leupeptina, 0,5 µg/mL de inibidor de protease (Sigma), 1,0 µg/mL de inibidor de tripsina e 0,5 µg/mL de aprotinina. Foi adicionado 40µg/mL de orthovanadato para proteger contra a degradação proteica e desfosforilação das amostras.

#### - **Quantificação protéica**

A quantificação da proteína foi realizada através do método de Bradford (Bio-Rad) e a leitura através da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Após a quantificação, 45µg de proteína foi fracionada por eletroforese, em gel de SDS- poliacrilamida (8% (wt/vol)). Após, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,5 A, por 2 horas. A membrana foi incubada por 3 a 4 horas com 10% (wt/vol) de leite em pó, desnatado em PBS/0, 05% (vol/vol), Tween 20 (PBS/T), lavada e incubada novamente durante toda a noite, em temperatura de 4°C com o anticorpo primário em PBS/T 3% (wt/vol) e soro de albumina bovina (BSA). Os anticorpos primários utilizados foram p130 (C-20), p 107 (C-18) do laboratório Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Estes anticorpos são IgG policlonais de coelho, utilizados na concentração de 100ng/ml.

Após, as membranas foram lavadas três vezes em PBS/T, e incubadas à temperatura ambiente por 4 horas com o anticorpo secundário, proteína A sefarose [125 I] (*Activa Products Scientific*) em PBS/T à 3%, BSA à 3% e leite em pó desnatado.

Após, as membranas foram envoltas em filme plástico e expostas em filme de Rx durante 48 horas.

- **Análise dos resultados através de densitometria no aparelho “Eagle Eye”.**

Os resultados da análise da expressão das proteínas de ciclo celular, p130 e p107, foram analisados através de densitometria, no aparelho “Eagle Eye” (Stratagene). Os valores absolutos encontrados foram transformados em gráfico, comparando os resultados obtidos das amostras de sangue de cordão de recém nascidos prematuros com as amostras dos de termo.

## **5. Análise Seriada de Expressão Gênica (SAGE)**

A análise seriada da expressão gênica (SAGE) das células mononucleadas de sangue de cordão umbilical humano foi realizada conforme o protocolo I-SAGE Kit da Invitrogen a partir de 40 ml de uma amostra de sangue de cordão de neonato de termo de 40 semanas de gestação. A comparação com as células mononucleadas de medula óssea foi realizada a partir de biblioteca já existente nos bancos de dados dos programas SAGEmap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>) e GAPSAGEmapbestGenie (<http://www.cgap.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>).

- **Extração do RNA**

O RNA total foi extraído, utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), do botão de células mononucleares ( $1 \times 10^7$  células) submetidas a centrifugação pelo método de Ficoll-Hipaque na densidade de 1077. Foi adicionado ao botão, um ml de trizol, solução monofásica composta por fenol e guanidina isocianato, para cada  $5 \times 10^6$  células.

O precipitado contendo o trizol foi incubado à temperatura ambiente a fim de que houvesse uma completa dissociação dos complexos núcleo-proteicos. Após adição de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), foi realizada agitação vigorosa e centrifugação em velocidade máxima de 14000 rpm à 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, procedendo-se imediatamente à precipitação com isopropanol gelado. Após incubação à temperatura ambiente, procedeu-se centrifugação em velocidade máxima de 14000 rpm 4°C. Após esta centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado para que

houvesse uma completa remoção de sal, e então submetido à nova centrifugação, a 11500 rpm, à 4°C. Finalmente, o RNA foi re-suspenso em água estéril contendo dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado à 55°C por 10 minutos e 2 horas em gelo, para completa solubilização do RNA.

A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose à 1,2%.

#### - Protocolo SAGE

A primeira etapa ocorre com o isolamento do RNA mensageiro a partir do RNA total, através da ligação da cauda poli-A a 100 µl de oligonucleotídeos de timina (*oligo dT*) adaptados a esferas magnéticas. As caudas poli-A ligadas a estas esferas foram isoladas com o auxílio de uma estante magnética, que retém na parede do tubo somente o RNA mensageiro ligado às esferas magnéticas. A transcrição foi realizada a partir da enzima *Superscript II RTTM*, *E. coli* DNA Polimerase, *E. coli* DNA ligase e *RNase H*. A eficiência da síntese de cDNA foi verificada através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* para *GAPD-H* e *EEF1A1*. Após, foi realizada uma digestão com enzima-âncora *Nla III*, que reconhece a sequência *CATG*. O controle da eficiência da digestão foi realizado através de PCR utilizando-se *primers* de *GADPH* e *EF* para amostras de RNA humano. A digestão eficiente deve resultar na perda no sítio de ligação do prime de *GAPDH*. A linha de ligação do prime de *EF* permanece inalterada.

Estas fitas de cDNA são ligadas a adaptadores, seqüências de 40 pb que possuem nas suas extremidades coesivas as quatro bases complementares ao sítio da enzima *Nla III*, facilitando a sua ligação à extremidade das fitas de cDNA. Cada amostra foi dividida em duas alíquotas, e cada uma delas é ligada a um adaptador diferente, *A* ou *B*, utilizando a enzima *T4 DNA ligase*. Com ambas as alíquotas ligadas aos adaptadores *A* e *B*, procedeu-se a digestão com a *Bsm FI*, que é uma enzima do tipo de restrição IIS

(reconhece um sítio e faz o corte em outro ponto da sequência), que fez as etiquetas (*tags*). Neste passo é feita uma nova verificação da eficiência através de PCR.

Como esta enzima reconhece seu sítio e corta a fita de cDNA 10-14 pb distante do seu sítio de reconhecimento, ela liberou a fita de cDNA da esfera magnética, restando uma fita de cerca de 50 pb com uma extremidade 5' coesiva sobressalente de 4 pares de bases. Portanto, a etiqueta (*tag*) consiste de 40 pb da sequência do adaptador e 10 a 14 pb da etiqueta ou a *tag* propriamente dita, com a sequência única correspondente ao transcrito.

Em seguida, a extremidade 5' coesiva criada com a *Bsm FI* foi preenchida através da reação com a enzima *Klenow* polimerase. Foi feita a reação de ligação das *tags*, que foram unidas para formar uma *ditag* (26 pb), onde cada *tag* correspondente ao transcrito tem o adaptador *A* de um lado e o adaptador *B* do outro. Uma amplificação por PCR em larga escala é realizada, utilizando como molde o produto da ligação, ou seja, as *ditags* recém-formadas. Os produtos gerados possuem ao redor de 102 pb e foram combinados em apenas dois tubos, para extração com fenol-clorofórmio, precipitação com etanol, acetato de amônio e glicogênio e sendo fracionados em um gel de poliacrilamida 12%.

Os fragmentos de 102 pb foram reortados do gel e purificados em colunas para centrifugação, sendo as amostras eluídas e novamente precipitadas com etanol, acetato de amônio e glicogênio.

Uma segunda digestão, com *Nla III*, foi realizada nos produtos de PCR purificados para eliminar os adaptadores e deixar somente as *ditags* de 26 pb. O produto desta digestão foi aplicado em gel de poliacrilamida 12%.

Foram observadas bandas de 26 pb, com o sítio da *Nla III*, bandas de 40 pb correspondente aos adaptadores, e bandas de 60 e 100 pb resultantes de digestão parcial. Deste gel, foram removidas apenas as bandas de 26 pb, correspondentes as *ditags*, que foram submetidas à purificação em colunas.

A seguir, foi realizada uma reação de ligação com as *ditags* purificadas formando os concatâmeros, conjuntos de *ditags* ligadas umas as outras de forma contínua, atingindo tamanhos variáveis de cerca de 200 pb até mais de 1000 pb, dependentes do número de *ditags* que estiverem formando cada concatâmero.

Foi feita uma seleção por tamanho destes concatâmeros, através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, sendo separados, em tubos diferentes, os fragmentos com 200 a 500 pb, de 500 a 800 pb e os fragmentos superiores a 800 pb. Os concatâmeros de tamanhos diferentes foram então purificados e clonados em vetor *pZero-1*. Os vetores contendo os concatâmeros foram inseridos por eletroporação em bactérias eletrocompetentes da linhagem *DH10B*. A eletroporação foi realizada em cubetas de 0,1 cm no eletroporador, *Gene Pulser II* (Bio-Rad Laboratories) ajustado para as seguintes condições; 1,8 kV, 25mF e 200 W.

As células eletroporadas foram repicadas em meio ágar *LB Low Salt* (meio sólido) contendo o antibiótico *zeocina* e as colônias semeadas em placas de cultura com 96 poços, contendo meio líquido *2YT* também com *zeocina*. Uma alíquota desta cultura foi utilizada para reação de PCR, com iniciadores universais M13, nos dois sentidos.

Os insertos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e então utilizados para a reação de seqüenciamento, realizada em seqüenciador *MegaBace 1000* (Amersham Biosciences) utilizando *DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit* (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ)

## **6. Análise do SAGE através de programas de bio informática.**

### **- Sagetags**

O resultado do seqüenciamento foi submetido a análise através do programa eSAGE (Margulies e Innis, 2000) que transformou o resultado em sagetags. O programa extraiu e quantificou o número de tags, a quantidade de vezes que apareceram, a diferença de expressão entre os perfis gerados, abundância (fold), e submeteu este

valor à um método estatístico p valor segundo Audic-Claverie, (1997), onde a probabilidade esperada de se observar y ocorrências de um clone já observado x vezes é dada pela fórmula:  $p(y|x) = (x+y)! / x!y!2^{-(x+y+1)}$ . Como em nosso estudo foram analisadas duas diferentes bibliotecas, utilizando amostras de tamanhos diferentes, foi necessário utilizar outra fórmula, derivada da fórmula descrita acima.

$$p(y|x) = (N_2/N_1)^y (x+y)! / x!y!(1+N_2/N_1)^{(x+y+1)}$$

Portanto, p valores,  $p(y|x)$ s, pequenos caracterizam genes que exibem expressão regular, com relativa abundância, cuja abundância não é a mesma nas duas bibliotecas.

Os dados gerados pelo programa eSAGE foram então submetidos a programas de criação de bancos de dados e tabelas, como o Access e o Excel (Microsoft Corporation) para fins de análise. Para a identificação de cada tag, foram realizadas pesquisas em bibliotecas dos bancos de dados disponibilizado pelos programas SAGEmap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>) e CGAPSAGEmapbestGenie (<http://www.cgap.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>) comparando-as com as seqüências gênicas já conhecidas. O resultado da análise através do programa CGAPSAGEmapbestGenie foi utilizado para as análises funcionais e para a comparação com a biblioteca de medula óssea já depositada.

#### - **Análise funcional**

A análise funcional foi realizada em duas ontologias: função molecular e função biológica, nos níveis 1, 2, 3 e 5. Os programas utilizados para a classificação foram Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>) e David (<http://www.david.niaid.nih.gov/david/beta/index/htm>).

## **7. Validação do SAGE**

#### - **Crítérios de seleção para os onze genes submetidos à validação**

- Relação com ciclo, diferenciação celular, migração trans-endotelial (homing) ou resposta imune.

- Nível de expressão.

No intuito de obtermos uma população que representasse as diferenças de expressão tanto em sangue de cordão quanto em medula, foram selecionados 4 genes com a abundância maior que 10 e 3 genes com abundância de 6 em sangue de cordão; 3 genes mais expressos em medula com abundância de 3,5 e um com a praticamente a mesma abundância em sangue de cordão e medula óssea (-1,8).

#### - **Extração de RNA**

As células mononucleares ( $1 \times 10^7$  células) obtidas da separação pelo método de Ficoll-Hipaque (densidade de 1077), foram centrifugadas em tubos de microcentrífuga siliconizados, livres de RNase. O RNA foi extraído utilizando-se trizol, já descrito em itens anteriores. A integridade do RNA foi analisada através de eletroforese em gel de agarose à 1,2%, desnaturante. A concentração do RNA foi quantificada num espectrofotômetro GeneQuant UV (Pharmacia).

As amostras foram incubadas com DNaseI por 15 minutos em temperatura ambiente e foi adicionado EDTA para uma concentração final de 2mM para parar a reação.

A enzima foi subsequenteiramente inativada por 10 minutos à uma temperatura de 65°C. As amostras de RNA (5µg) tratadas com DNaseI foram submetidas a transcrição reversa com SuperScript II (Invitrogen) e oligo dt por 50 minutos à 42°C. RNase H (Invitrogen) foi então adicionada e as amostras foram incubadas por 20 minutos à temperatura de 37°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro GeneQuant UV (Pharmacia).

**Tabela 1: Genes escolhidos para a validação do SAGE.**

| Tags       | Hs      | Símbolo | SC  | MO   | Ab    | <i>p</i> valor |
|------------|---------|---------|-----|------|-------|----------------|
| GGGAAGCA   | 414.880 | F11 R   | 77  | 2    | 38.5  | 4.25609E-18    |
| GGCAGTGA   | 302.145 | Hb Gama | 30  | 0    | 30    | 1.425530E-0.8  |
| CCTCAGGATA | 170.009 | TGFA    | 25  | 2    | 12.5  | 2.50154E-0.5   |
| AATGGATGAA | 491.953 | SMARCC2 | 12  | 0    | 12    | 0.0007665203   |
| CAGGAACG   | 366.546 | MAP2K2  | 12  | 2    | 6     | 0.0196678797   |
| ACAGCCTGCA | 153.752 | CDC25B  | 6   | 0    | 6     | 0.0259316190   |
| GCGGTGTACA | 10.306  | NKG7    | 17  | 3    | 5.7   | 0.005619998    |
| TGTAGTTTGA | 171.626 | SKP1A   | 13  | 3    | 3.5   | 0.0340681326   |
| TACCTCTGA  | 416.073 | S100A8  | 645 | 1182 | - 1.8 | 1.060113E-61   |
| GTGCTGTCT  | 398.636 | Hb Alfa | 26  | 90   | -3.5  | 1.72504E-12    |
| AGCCTTCA   | 155.376 | Hb Beta | 15  | 41   | -3.4  | 2.766486E-05   |

**Legenda:** Hs= número no UniGene; SC = n<sup>o</sup> de tags em sangue de cordão; MO = n<sup>o</sup> de tags em medula óssea, Ab= abundância (*fold*).

#### - Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR).

O qPCR foi realizado com dez amostras de sangue de cordão e sete de medula óssea de diferentes doadores.

A técnica de real-time é baseada no monitoramento da fluorescência emitida durante a reação em cadeia da polimerase (PCR) pela ligação de uma sonda específica (Taqman, Molecular Beacon, etc) ou um corante (SYBRGreen), na fita recém sintetizada.

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando o reagente “SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems)”, que além de conter todos os reagentes necessários para a realização de uma reação de PCR (dNTPs, MgCl, Tampão, Taq Ampli-Gold) contém também o corante SYBRGreen, componente intercalante de DNA

dupla-fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo pelo equipamento acima citado.

Para a quantificação da expressão dos genes utilizamos o método de “análise relativa dos dados”, onde a expressão dos genes selecionados foi quantificada em relação a um gene de controle endógeno de expressão, a  $\beta$ -actina. Também utilizamos nesta análise situações denominadas calibradoras.

A análise relativa dos dados é expressa pela derivação da fórmula aritmética  $2^{\Delta\Delta CT}$ , de onde obtivemos os níveis de expressão gênica das amostras sempre em relação à amostra calibradora, como descreve o manual do equipamento (Livak *et al*, 2001).

Para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutiva é necessário que a reação ocorra em condições ótimas, com 90 a 100% de eficiência de amplificação. O cálculo de eficiência de amplificação é realizado através da fórmula  $10(-1/\text{slope})$  (Pfaffi, 2001 e Meijerink *et al*, 2001).

As reações de PCR em tempo real foram otimizadas testando-se várias concentrações de iniciadores (primers) em uma diluição seriada de cDNA.

Todas as amostras foram quantificadas sempre em duplicata em placas de 96 poços (MicroAmp Optical 96-well reaction plate -Applied Biosystems). As reações foram realizadas em um volume total de 25 $\mu$ l contendo 20ng de cDNA, 12,5 $\mu$ l de SYBRGreen Master Mix PCR (Applied Biosystems). Os dados para serem aplicados à fórmula aritmética foram coletados na forma de emissão de fluorescência na fase exponencial da reação pela determinação de um único “Threshod” para todas as amostras realizadas numa mesma placa de 96 poços. Este “Threshod” nada mais é que uma linha traçada na vertical. O ponto de encontro entre esta linha e a curva de amplificação é denominado “Cycle threshod”, ou “Ct”.

Estes dados em forma de “Ct” foram exportados para uma planilha de Excel. Foram extraídas as médias destes dados, uma vez que as amostras eram realizadas

sempre em duplicatas, e as normalizações dos dados com o controle de expressão endógena, primeiro passo da derivação aritmética denominada  $\Delta Ct$  ( $Ct$  da amostra com gene alvo menos  $Ct$  da amostra com gene de controle endógeno).

Após a normalização dos dados foi realizada a calibração dos mesmos, utilizando situações onde a expressão do gene alvo é inexistente, levando ao segundo passo da derivação aritmética denominada  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  da amostra a ser quantificada menos  $\Delta Ct$  da amostra calibradora – tempo 0 (zero)).

Os dados que foram normalizados e calibrados foram convertidos em níveis de expressão pela fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , onde se estima que a situação calibradora tem valor “1” (um) de expressão.

Para certificação de que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por amplificação inespecífica dos iniciadores (*primers*), foi feita a análise da curva de dissociação gerada pelo equipamento. Esta curva baseia-se no “ $T_m$ ” (Melting Temperature) específica de cada produto, que é determinada pela sua composição de nucleotídeos. A cada variação da temperatura, que acontece entre 60° C a 95° C logo após o término do PCR, são coletados dados de fluorescência. A curva de dissociação se dá quando em determinada temperatura o produto de PCR separa suas fitas e ocorre queda de fluorescência gerada pelo SYBRGreen, já que este intercala somente dupla fita. Controles sem adição de molde (NTCs) foram incluídos para cada par de iniciadores.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicatas para cada amostra de cDNA. Os iniciadores foram utilizados na concentração de 600 nM.

A análise foi realizada com a média de  $2^{\Delta\Delta Ct}$  das dez amostras de sangue de cordão e sete amostras de medula óssea.

**Tabela 2: Sequência dos iniciadores (*primer*) utilizados no qPCR.**

| Gene             | Iniciadores                          |
|------------------|--------------------------------------|
| alfa-globina-F   | 5'-CCCCACAGACTCAGAGA -3'.            |
| alfa-globina-R   | 5'-CGGCCTTGA CGTTGGTCTTT-3'.         |
| βeta-globina-F   | 5'-ATCTGTCCACTCCTGATGCAGTT-3'.       |
| βeta-globina-R   | 5'-AGGCACCGAGCACTTTCTTG-3'.          |
| gama-globina-F   | 5'-CATGGCAAGAAGGTGCTG-3'.            |
| gama-globina-R   | 5'-GCAAAGGTGCCCTTGAGATC-3'.          |
| βeta-actina-F    | 5'-TCACCGAGCGCGGCT-3'.               |
| βeta-actina-R    | 5'-TAATGTCACGCACGATTTCCC -3'.        |
| CDC25B-F         | 5'-AGCACCAAGACCTCAAGTACATCTC-3'.     |
| CDC25B-R         | 5'-AAACTTATCCACGATGTTGCTGAAC-3'.     |
| NKG7-F           | 5'-CTCAGCTATCCTCTTGCTCTGTACA -3'     |
| NKG7-R           | 5'-TGCCGCTCTTGCCCTTCTG-3'            |
| SKP1A vari.2-F   | 5'-AGCCCAGGTACGCAAAGAGA-3'           |
| SKP1A vari.2-R   | 5'-GCAACTAGTATTTGGAACAATCCTTACA-3'   |
| SMARCC2 vari.1-F | 5'-CAGTCACTGAGGATAAGAACAATGC-3'      |
| SMARCC2 vari.1-R | 5'-TTATCCCTCTTCATGACTGGTCGTA-3'      |
| TGFA-F           | 5'-GCACGTCCCCGCTGAGT-3'.             |
| TGFA-R           | 5'-TGGGAATCTGGGCAGTCATTA-3'.         |
| F11 receptor-F   | 5'-TGGACAGAAAGCGTGATTTTGA-3'.        |
| F11 receptor-R   | 5'- TGAAGGAAGCATTTTAAGGTGTAACCTT-3'. |
| S100-A8-F        | 5'-CGTCTACAGGGATGACCTGAAGA-3'.       |
| S100-A8-R        | 5'-GAGCTCCGGAGGGTTTTTCC-3'.          |
| MAP2K2-F         | 5'-CGGACCTGAAGATGCTCACA-3'.          |
| MAP2K2-R         | 5'-ACACAACCAGCCGCAAA-3'              |

# ***Resultados***

---

### – Análise seriada de expressão gênica (SAGE)

Os clones contidos nos concatâmeros foram seqüenciados e o resultado do seqüenciamento foi submetido à análise através do programa eSAGE, transformando o resultado em “sagetags”. O programa quantificou o número de “tags”, e a quantidade de vezes que estas apareceram. Estes parâmetros foram submetidos ao método estatístico de Audic-Claverie, 1997, e comparados com as seqüências gênicas já conhecidas e relacionadas em bibliotecas existentes “online” SAGEmap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>) e CGAPSAGEmapbestGenie (<http://www.cgap.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>).

**Tabela 3: Análise global da expressão gênica de células mononucleares de sangue de cordão e medula óssea.**

|                                                     | <b>Sangue de cordão</b> | <b>Medula óssea</b> |
|-----------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Tags únicas                                         | 15.519                  | 13.075              |
| Tags totais                                         | 44.924                  | 36.577              |
| Desconhecidas                                       | 3.812                   | 2.993               |
| ORFS                                                | 355                     | 268                 |
| EST                                                 | 1663                    | 1.465               |
| cDNA/ mRNA                                          | 740                     | 640                 |
| Seqüências Hipotéticas                              | 1177                    | 998                 |
| Genes ribossomais e mitocondriais                   | 286                     | 228                 |
| Genes conhecidos exceto ribossomais e mitocondriais | 7.486                   | 6.483               |
| Fator de correção para 1 milhão de tags             | 22,25982                | 27,33958            |

## 1. Comparação entre as bibliotecas de sangue de cordão e medula óssea

A comparação entre, as bibliotecas de células mononucleares de sangue de cordão e de medula óssea, demonstrou 23.981 genes comuns às duas bibliotecas.

Quando analisamos os genes comuns às duas bibliotecas através do método estatístico de Audic et Claverie (1997), foram obtidos 556 genes diferencialmente expressos ( $p \leq 0,05$ ). Analizando apenas transcritos com abundância de expressão  $\geq$  ou  $\leq 10$  vezes, foram detectados, com base no programa UniGene, 35 genes apresentando abundância de expressão 10 vezes maior em sangue de cordão do que em medula óssea e 13 genes onde ocorreu exatamente o inverso.

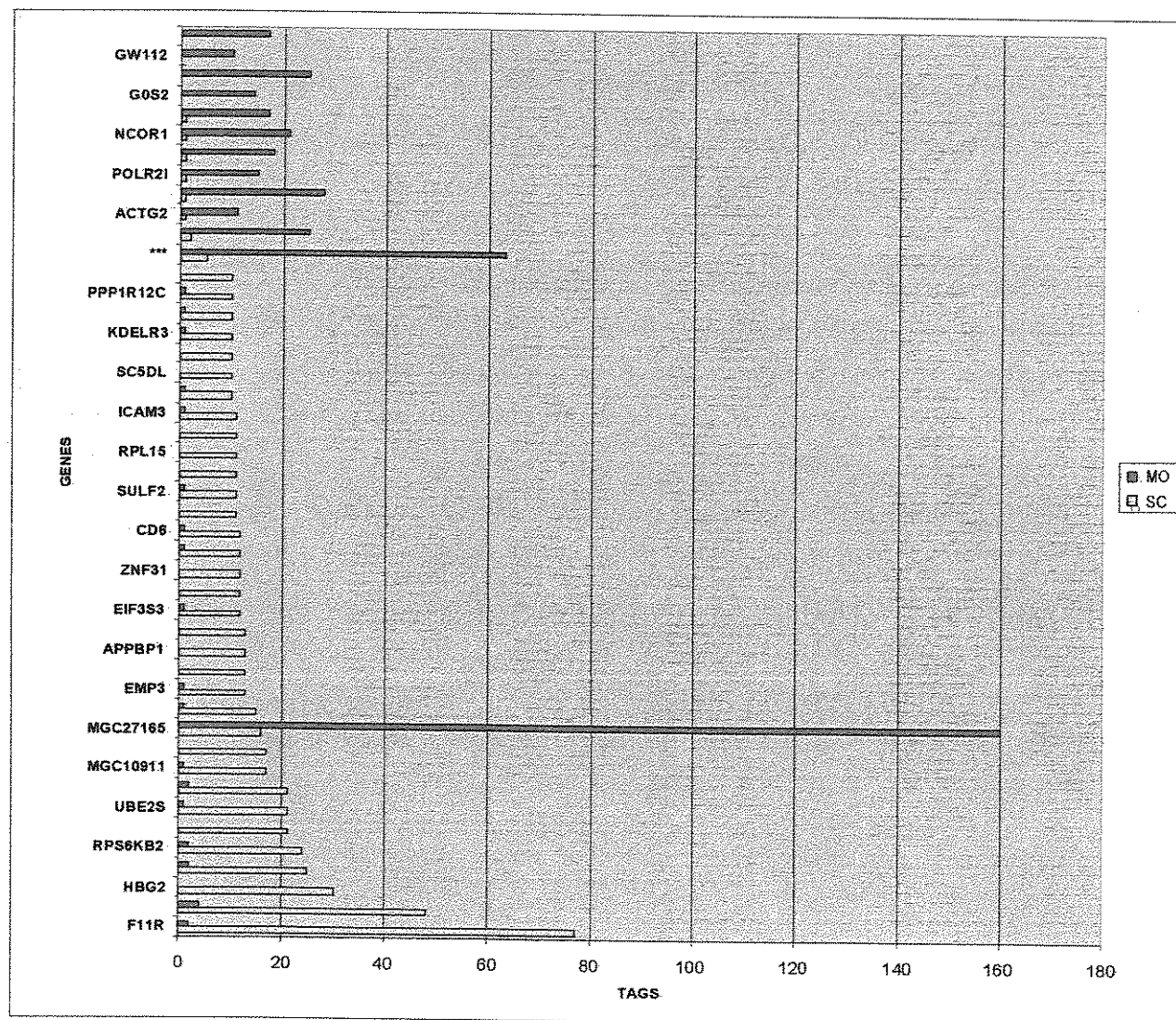
## 2. Classificação Funcional

A classificação funcional dos genes diferencialmente expressos foi realizada em duas ontologias; função molecular e função biológica, nos níveis 1, 2, 3 e 5. Os programas utilizados para a classificação foram Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>) e David (<http://www.david.niaid.nih.gov/david/beta/index/htm>).

Os gráficos obtidos destas análises se encontram “online” no site <http://www.hemocentro.unicamp.br/summary>. Estes gráficos, quando analisados, demonstraram uma distribuição similar, entre as várias categorias, nos níveis 1, 2 e 3. No nível 5 houve uma maior distribuição de “tags” em sangue de cordão nas seguintes categorias; resposta imune, ciclo celular, resposta inflamatória, resposta de defesa celular, replicação de DNA, metabolismo de mRNA, via de sinalização do receptor de proteína ativadora de linfócitos com proteína G acoplada, catabolismo de lipídios, regulação positiva da cascata de I-kappa B kinase-NF-kappa B, biossíntese de esteróides, resposta contra patógenos, regulação positiva de sinal de transdução, metabolismo de esteróides,

Os genes expressos com abundância  $\geq 10$  x ou  $\leq 10$  x, classificados de acordo com o programa UniGene estão demonstrados no gráfico 1 e nas tabelas 2 e 3

**Gráfico 1: Genes diferencialmente expressos, com abundância  $\geq 10$  x ou  $\leq 10$  x, classificados de acordo com o programa UniGene.**



As gama globinas,  $\gamma$  1 e  $\gamma$  2 foram retiradas do gráfico para que as outras colunas pudessem ser melhor demonstradas pois apresentavam valores de tags de 334 e 698 respectivamente.

\*\*\* sequência transcrita que apresenta moderada similaridade com a proteína sp: P01871.

**Tabela 4: Genes 10 x mais ou somente expressos em sangue de cordão.**

| tag        | SC  | MO | pvalor   | Fold   | Hs          | Símbolo   | Desc                                                                                                                      |
|------------|-----|----|----------|--------|-------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATGCAGAGCT | 608 | 6  | 1.2E-148 | 101.33 | Hs: 302.145 | HBG2      | hemoglobin, gamma G                                                                                                       |
| ATTCAGAGCT | 334 | 5  | 1.31E-79 | 66.8   | Hs: 449.631 | HBG1      | hemoglobin, gamma A                                                                                                       |
| GGGAAGCAGA | 77  | 2  | 4.26E-18 | 38.5   | Hs: 506.845 | F11R      | F11 receptor                                                                                                              |
| GTGACCACGG | 48  | 4  | 3.64E-09 | 12     | Hs: 449.065 | FLJ38374  | hypothetical protein FLJ38374                                                                                             |
| GGCAGTGAGC | 30  | 0  | 1.43E-08 | 30     | Hs: 302.145 | HBG2      | hemoglobin, gamma G                                                                                                       |
| CCTCAGGATA | 25  | 2  | 2.5E-05  | 12.5   | Hs:170.009  | TGFA      | transforming growth factor, alpha                                                                                         |
| GAACCGTCCT | 24  | 2  | 4.27E-05 | 12     | Hs: 32.156  | RPS6KB2   | ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2                                                                         |
| CCGACGGGCG | 21  | 0  | 3.31E-06 | 21     | Hs: 300.463 | ACO2      | aconitase 2, mitochondrial                                                                                                |
| CTTCTTGCC  | 21  | 1  | 3.63E-05 | 21     | Hs: 396.393 | UBE2S     | ubiquitin-conjugating enzyme E2S                                                                                          |
| GCACTGGGAA | 21  | 2  | 0.000209 | 10.5   | Hs: 376.208 | LTB       | lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)                                                                              |
| GCCCCCCCCT | 17  | 1  | 0.000341 | 17     | Hs: 446.311 | MGC10911  | hypothetical protein MGC10911                                                                                             |
| GCTTTCTCAA | 17  | 0  | 3.72E-05 | 17     | Hs: 410.578 | P4HB      | procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; |
| GCGCAGAGGT | 15  | 1  | 0.001031 | 15     | Hs: 520.738 | RPL41     | ribosomal protein L41                                                                                                     |
| CGACGAGGAG | 13  | 1  | 0.003079 | 13     | Hs: 9.999   | EMP3      | epithelial membrane protein 3                                                                                             |
| GACCCAGAGG | 13  | 0  | 0.000419 | 13     | Hs: 124.747 | FLJ35258  | hypothetical protein FLJ35258                                                                                             |
| GGCAAGAGGC | 13  | 0  | 0.000419 | 13     | Hs: 418.162 | APPBP1    | amyloid beta precursor protein binding protein 1, 59kDa                                                                   |
| GGTAGCCTGG | 13  | 0  | 0.000419 | 13     | Hs: 290.758 | DDB1      | damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa                                                                             |
| AACTCTTGAA | 12  | 1  | 0.005291 | 12     | Hs: 127.149 | EIF3S3    | eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa                                                        |
| AATGGATGAA | 12  | 0  | 0.000767 | 12     | Hs: 491.953 | SMARCC2*  | Transcribed sequences                                                                                                     |
| ATGAAACCCC | 12  | 0  | 0.000767 | 12     | Hs: 442.705 | ZNF31     | zinc finger protein 31 (KOX 29)                                                                                           |
| GCGAAACCCC | 12  | 1  | 0.005291 | 12     | Hs: 306.978 | LOC284912 | hypothetical gene BC001801                                                                                                |
| GGCTCAGACC | 12  | 1  | 0.005291 | 12     | Hs: 436.949 | CD6       | CD6 antigen                                                                                                               |
| AGGAGGTATC | 11  | 0  | 0.001404 | 11     | Hs:105.806  | GNLY      | granulysin                                                                                                                |
| GGAACCTTTA | 11  | 1  | 0.009052 | 11     | Hs: 43.857  | SULF2     | sulfatase 2                                                                                                               |
| GTGGCAGGCG | 11  | 0  | 0.001404 | 11     | Hs: 21.143  | SPPL3     | signal peptide peptidase 3                                                                                                |
| TCTGCTTACA | 11  | 0  | 0.001404 | 11     | Hs: 381.219 | RPL15     | ribosomal protein L15                                                                                                     |
| TGGATCCTGA | 11  | 0  | 0.001404 | 11     | Hs: 449.631 | HBG1      | hemoglobin, gamma A                                                                                                       |
| TTAGGGAGGA | 11  | 1  | 0.009052 | 11     | Hs: 353.214 | ICAM3     | intercellular adhesion molecule 3                                                                                         |
| ATGAAACCCT | 10  | 1  | 0.01     | 10     | Hs: 31.330  | **        | Clone HQ0319                                                                                                              |
| CATTAATGAA | 10  | 0  | 0.002571 | 10     | Hs: 287.749 | SC5DL     | sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog, fungal)-like                                                       |
| CCACTACACT | 10  | 0  | 0.002571 | 10     | Hs: 387.871 | TNFSF10   | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10                                                                     |
| GTTGAAACTC | 10  | 1  | 0.01     | 10     | Hs: 528.305 | KDEL3     | KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3                                                 |
| TCAGTTTGGA | 10  | 1  | 0.01     | 10     | Hs: 3.873   | PPT1      | palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1,                                                      |
| TGCAATAGGG | 10  | 1  | 0.01     | 10     | Hs: 437.055 | PPP1R12C  | protein phosphatase1regulate unit 12                                                                                      |
| TTACCCAGTG | 10  | 0  | 0.002571 | 10     | Hs: 377.097 | NOD27     | nucleotide-binding oligomerization domains 27                                                                             |

**Tabela 5: Genes 10 x mais ou somente expressos na medula óssea.**

| Tag         | SC | MO  | pvalor   | Fould | Hs          | Símbolo  | Desc.                                                                                                         |
|-------------|----|-----|----------|-------|-------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CTCCCCCAAA  | 16 | 160 | 1.83E-37 | -10   | Hs: 366     | MGC27165 | hypothetical protein MGC27165                                                                                 |
| CAAACATAACC | 5  | 63  | 1.31E-16 | -12.6 | Hs: 153.261 | ***      | Transcribed sequence with moderate similarity to protein sp:P01871 (H.sapiens) MUC_HUMAN Ig MU chain C region |
| GCTGGGGTCA  | 2  | 25  | 2.9E-07  | -12.5 | Hs: 24.879  | PPAP2C   | phosphatidic acid phosphatase type 2C                                                                         |
| AAACATTAATA | 1  | 11  | 0.001158 | -11   | Hs: 403.989 | ACTG2    | actin, gamma 2, smooth muscle, enteric                                                                        |
| CAAGGGAAAC  | 1  | 28  | 3.82E-09 | -28   | Hs: 270.845 | KIF23    | kinesin family member 23                                                                                      |
| CGTGAAAAAA  | 1  | 15  | 6.34E-05 | -15   | Hs: 47.062  | POLR2I   | polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I, 14.5kDa                                                     |
| GTGCGCTGAG  | 1  | 18  | 6.93E-06 | -18   | Hs: 274.485 | HLA-C    | major histocompatibility complex, class I, C                                                                  |
| TACTTGCAAGA | 1  | 21  | 7.42E-07 | -21   | Hs: 144.904 | NCOR1    | nuclear receptor co-repressor 1                                                                               |
| TAGAAAAATA  | 1  | 17  | 1.45E-05 | -17   | Hs: 406.458 | GPI      | glucose phosphate isomerase                                                                                   |
| ACATTTCCAA  | 0  | 14  | 1.44E-05 | -14   | Hs: 432.132 | G0S2     | putative lymphocyte G0/G1 switch gene                                                                         |
| CTCTGCTTCT  | 0  | 25  | 2.42E-09 | -25   | Hs: 46.295  | EPX      | eosinophil peroxidase                                                                                         |
| TAATTTTTC   | 0  | 10  | 0.000338 | -10   | Hs: 273.321 | GW112    | differentially expressed in hematopoietic lineages                                                            |
| TGGAATAAA   | 0  | 17  | 1.34E-06 | -17   | Hs: 61.255  | FBP2     | fructose-1,6-bisphosphatase 2                                                                                 |

### 3. Validação

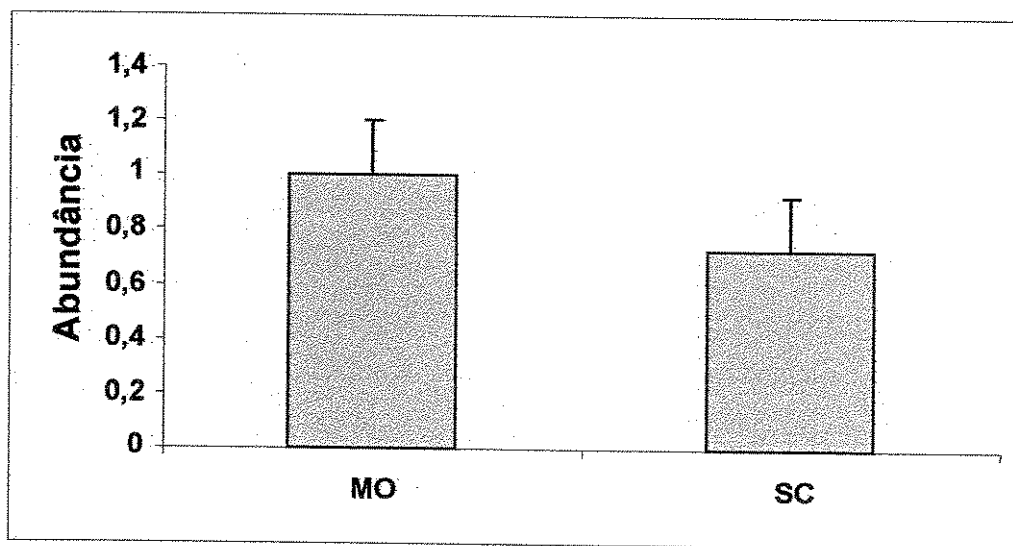
A confirmação dos resultados do SAGE foi realizada através do método de reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativo (qPCR). O qPCR foi realizado com 10 amostras de sangue de cordão e 7 de medula óssea de diferentes doadores. Os genes escolhidos para validar os resultados do SAGE e suas características estão descritos na tabela 1, assim como a relação dos iniciadores utilizados na tabela 2.

Os resultados da validação confirmaram os obtidos no SAGE em 10 dos 11 genes validados, apresentando uma porcentagem de confirmação de 90%. Comparado com publicações anteriores o número de genes escolhido para a validação é adequado (Ng *et al*, 2004; Ekman *et al*, 2003). Apenas o gen MAPK2, que apresentava uma frequência, em sangue de cordão de doze vezes e na medula óssea de duas vezes, com uma abundância de seis, demonstrou no qPCR uma abundância de 1,5 vezes.

Como era esperado, de acordo com a própria ontogenia, o resultado da expressão da alfa globina foi similar no sangue e cordão e na medula, a beta globina foi mais expressa na medula óssea e a gama globina apresentou maior expressão no sangue de cordão. Os genes, F11 receptor, CDC25B, TGFA, SMARCC2 (*Sage map annotation*), SKP1A, NKG7 foram mais expressos em sangue de cordão. O gene S100A8 foi mais expresso na medula óssea. Os resultados da análise da expressão dos genes estão no gráfico 2.

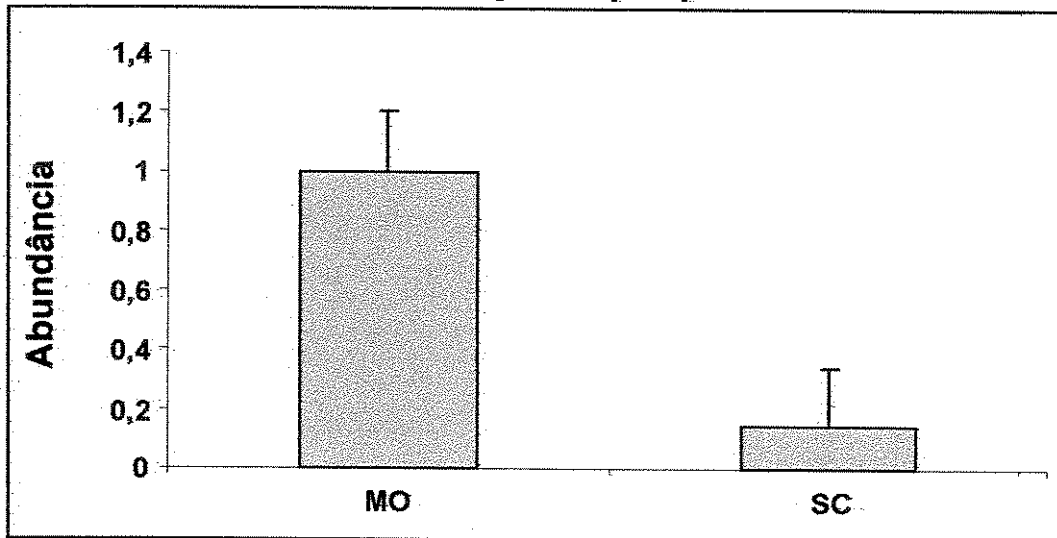
**Gráfico 2: Resultados da validação do SAGE pelo método de Reação em cadeia pela polimerase em tempo real quantitativo (qPCR).**

### 1. Expressão do gene da alfa globina por qPCR



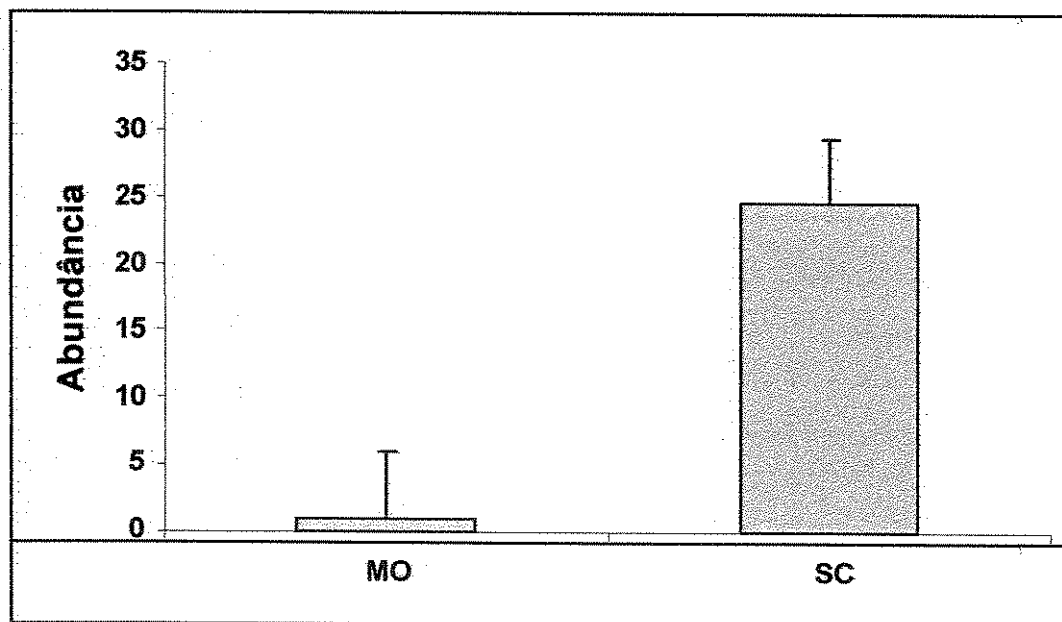
Legenda: SC= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das dez amostras de sangue de cordão, MO= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das sete amostras de medula óssea.

## 2. Expressão do gene da beta globina por qPCR



Legenda: SC=média de  $2\Delta\Delta Ct$  das dez amostras de sangue de cordão; MO=média de  $2\Delta\Delta Ct$  das sete amostras de medula óssea.

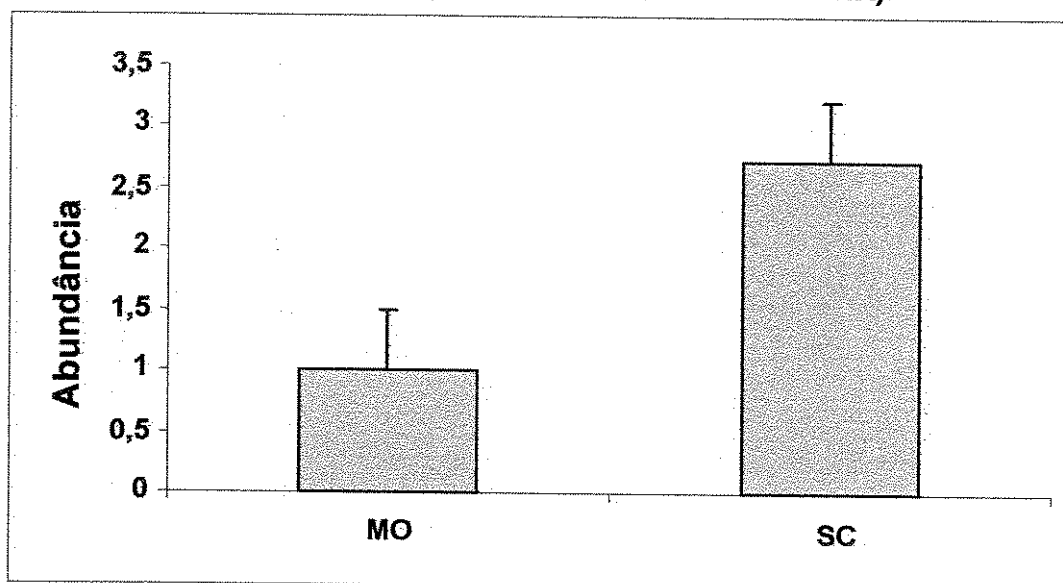
## 3. Expressão do gene da gama globina por qPCR



Legenda: SC= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das dez amostra de sangue de cordão; MO= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das sete amostras de medula óssea.

#### 4. Expressão do gene NKG7 por qPCR.

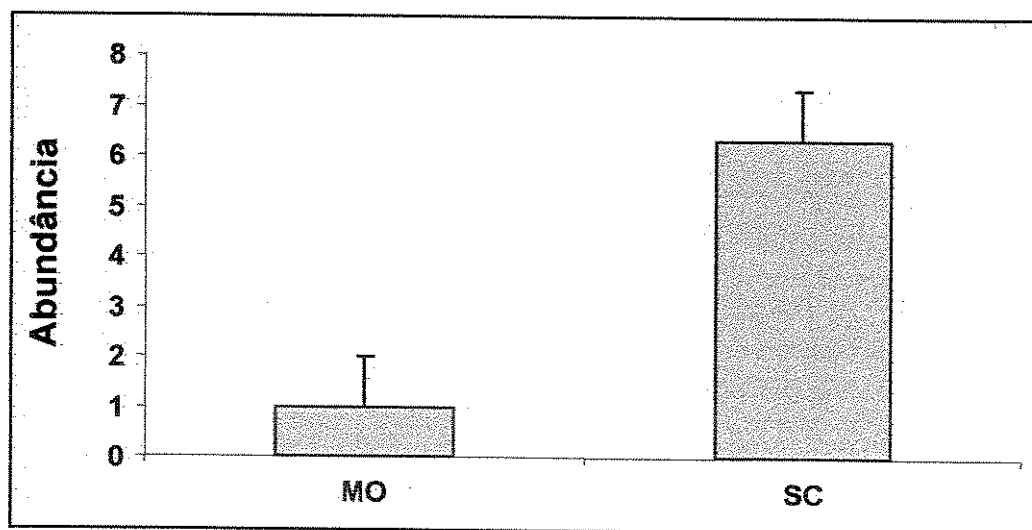
(resposta imune, citotoxicidade linfócitos T e NK)



Legenda: SC= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das dez amostras de sangue de cordão, MO = média de  $2\Delta\Delta Ct$  das sete amostras de medula óssea.

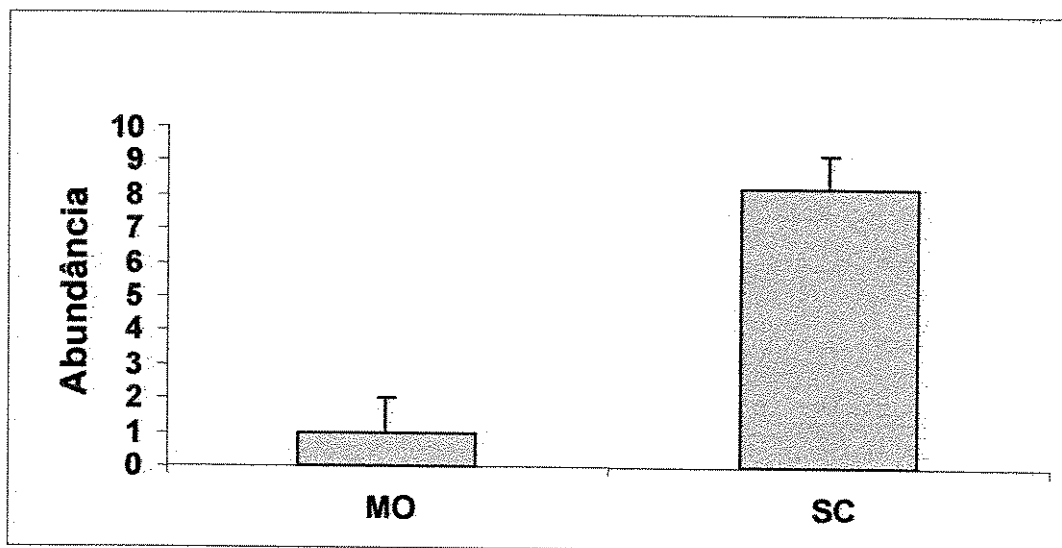
#### 5. Expressão do gene CDC25B por qPCR.

(ciclo celular, entrada em mitose, ativa cdc2)



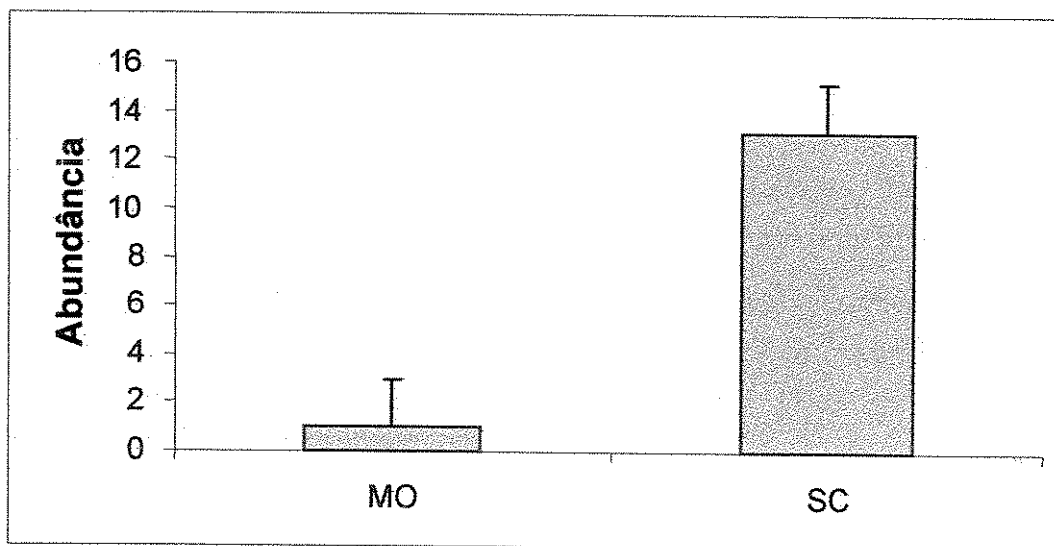
Legenda: SC= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das dez amostras de sangue de cordão, MO= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das sete amostras de medula óssea.

**6. Expressão do gene SMARCC2 por qPCR.**  
(transcrição gênica)



Legenda: SC= média de 2 $\Delta\Delta$ Ct das dez amostras de sangue de cordão, MO= média de 2 $\Delta\Delta$ Ct das sete amostras de medula óssea.

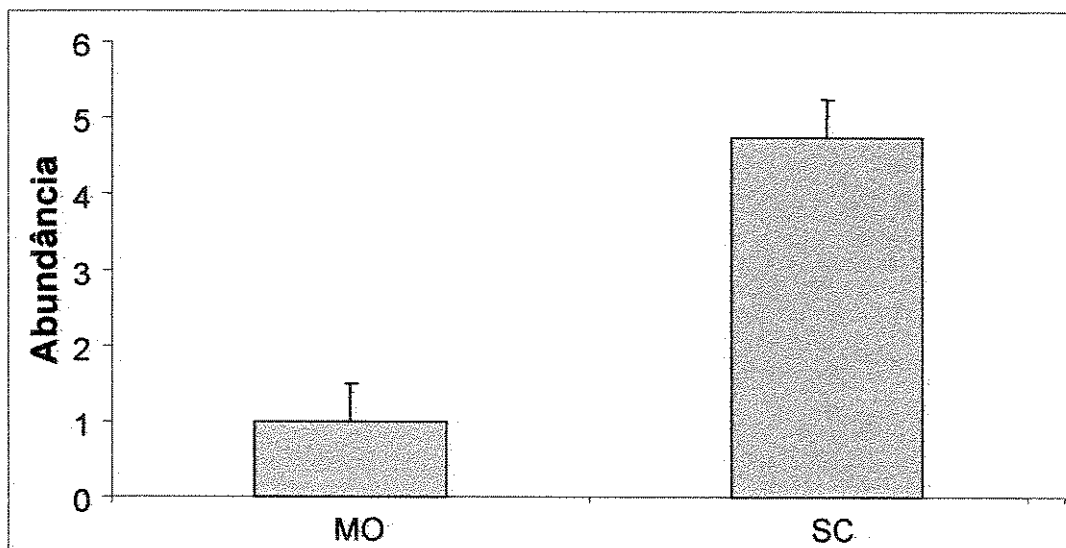
**7. Expressão do gene F11 receptor por qPCR.**  
(Imunoglobulina, adesão celular, LFA-1 migração de leucócitos)



Legenda: SC= média de 2 $\Delta\Delta$ Ct das dez amostras de sangue de cordão, MO= média de 2 $\Delta\Delta$ Ct das sete amostras de medula óssea.

### 8. Expressão do gene SKP1A por qPCR.

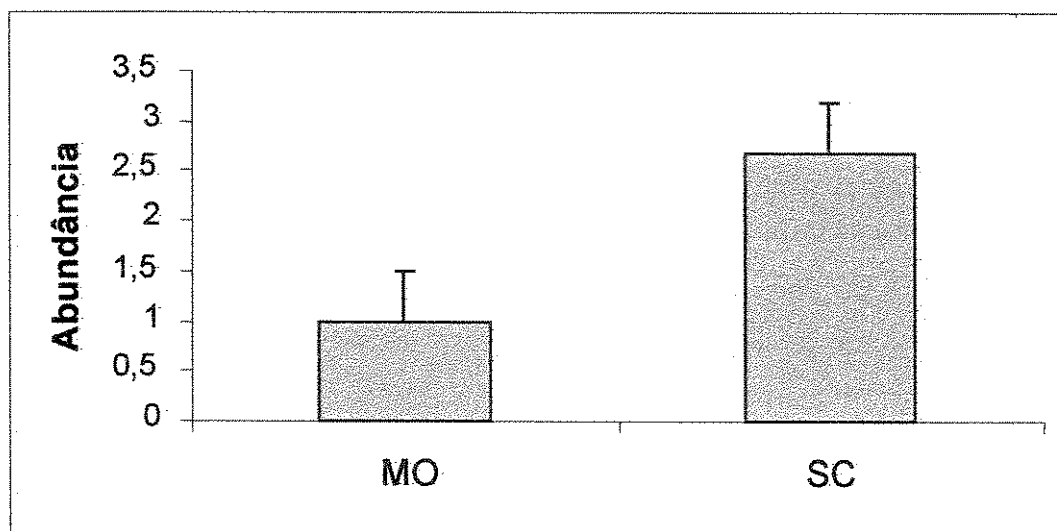
(ciclo celular, regulação proteólise da ubiquitina)



Legenda: SC= média de 2 $\Delta\Delta$ Ct das dez amostras de sangue de cordão, MO= média de 2 $\Delta\Delta$ Ct das sete amostras de medula óssea.

### 9. Expressão do gene TGF $\alpha$ por qPCR.

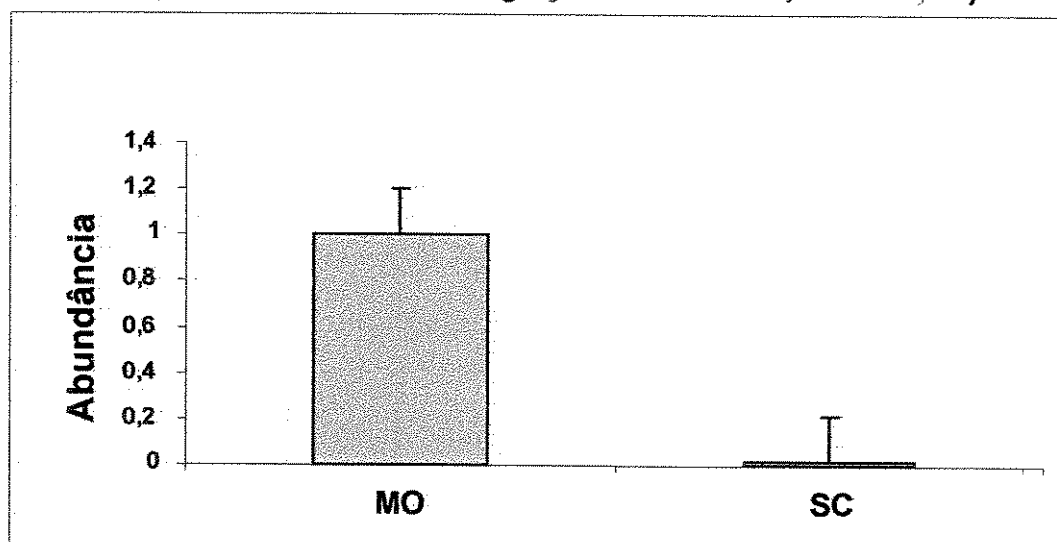
(fosforila EGF-R estimulando resposta mitogênica)



Legenda: SC= média de 2 $\Delta\Delta$ Ct das dez amostras de sangue de cordão, MO= média de 2 $\Delta\Delta$ Ct das sete amostras de medula óssea.

#### 10. Expressão do gene S100A8 por qPCR.

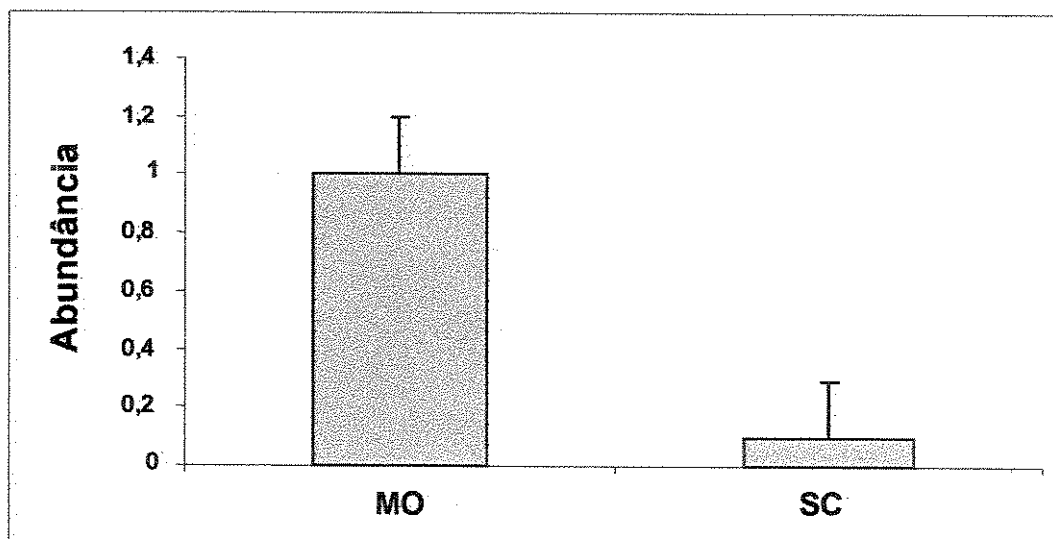
(adesão, celular LFA1- migração de leucócitos, ciclo celular)



Legenda: SC= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das dez amostras de sangue de cordão, MO= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das sete amostras de medula óssea.

#### 11. Expressão do gene MAPK2 por qPCR.

(sinal de transdução para MGF, fosforila de ativa outras MAPkinases,  
↑↑ expressão do receptor opióide mu)



Legenda: SC= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das dez amostra de sangue de cordão, MO= média de  $2\Delta\Delta Ct$  das sete amostras de medula óssea.

#### 4. Ensaios clonogênicos de sangue de cordão de neonatos prematuros e de termo e diferenças no ciclo celular

##### – Ensaios clonogênicos

As culturas de sangue de cordão umbilical de neonatos prematuros (idade gestacional  $\leq 33^{\text{a}}$  semana), em meio semi-líquido de metilcelulose, mostraram número significativamente maior de colônias, no 7º e no 14º dia de leitura, quando comparadas com as de neonatos de termo (idade gestacional  $>$  que 33ª semana até a 42ª semana).

Houve um aparecimento precoce das colônias no sétimo dia de cultura. As características morfológicas das culturas das células dos prematuros, no sétimo dia, eram semelhantes as das culturas de termo no décimo quarto dia. As culturas de prematuros no décimo quarto dia apresentavam grande quantidade de fibroblastos e se assemelharam, em número e morfologias, às de recém nascidos de termo com vinte e um dias de cultura.

**Tabela 6: Ensaios clonogênicos**

| Dia de cultura | RN Prematuros<br>( $\leq 33$ semanas) n= 25 |                    | RN de Termo<br>( $> 33$ semanas) n= 11 |                     |
|----------------|---------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------|---------------------|
|                | 7º                                          | 14º                | 7º                                     | 14º                 |
| CFU/BFU-E/GEMM | 184,32 $\pm$ 40,30                          | 249,53 $\pm$ 82,02 | 19,89 $\pm$ 31,89                      | 266,98 $\pm$ 369,81 |
| CFU-GM         | 169,68 $\pm$ 36,77                          | 204,23 $\pm$ 26,87 | 15,52 $\pm$ 24,75                      | 189,39 $\pm$ 361,33 |

Os resultados estão expressos na forma de média e desvio padrão.

CFU/BFU-E/ GEMM prematuro x termo; 7º  $\rightarrow p < 0,001$  Wilcoxon rank sum

CFU-GM prematuro x termo; 14º  $\rightarrow p = 0,032$  Wilcoxon rank sum

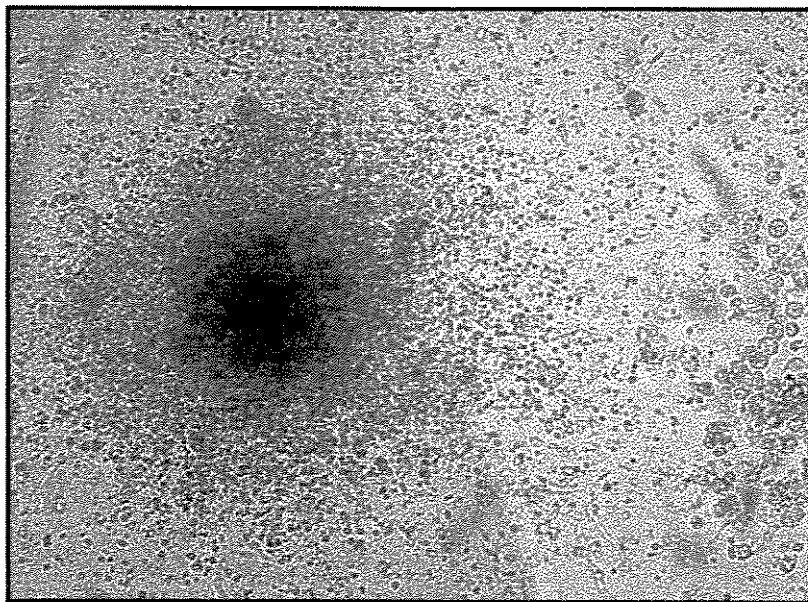
**Tabela 7:** Número de colônias hematopoiéticas obtidas de cultivo de células mononucleadas de sangue de cordão de recém – nascidos **prematturos**.

| Idade gestacional (semanas) | Celularidade<br>Número de células/ml | 7º dia n=25   |        |               | 14º dia n=25 |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------|--------|---------------|--------------|
|                             |                                      | CFU/BFUE/GEMM | CFU-GM | CFU/BFUE/GEMM | CFU GM       |
| 32                          | 3,7x10 <sup>6</sup>                  | 118           | 130    | 193           | 140          |
| 33                          | 4,0x10 <sup>6</sup>                  | 210           | 150    | 240           | 180          |
| 30                          | 6,0x10 <sup>6</sup>                  | 488           | 311    | 513           | 268          |
| 28                          | 5,0x10 <sup>6</sup>                  | 468           | 250    | 649           | 273          |
| 30                          | 2,5x10 <sup>6</sup>                  | 380           | 230    | 429           | 230          |
| 32                          | 3,4x10 <sup>6</sup>                  | 200           | 198    | 246           | 198          |
| 30                          | 4,0x10 <sup>6</sup>                  | 320           | 180    | 543           | 210          |
| 29                          | 5x10 <sup>6</sup>                    | 410           | 290    | 600           | 480          |
| 29                          | 27x10 <sup>6</sup>                   | 460           | 230    | 525           | 280          |
| 32                          | 17x10 <sup>6</sup>                   | 180           | 50     | 222           | 69           |
| 33                          | 2,5x10 <sup>6</sup>                  | 82            | 190    | 219           | 214          |
| 32                          | 2,5x10 <sup>6</sup>                  | 139           | 227    | 261           | 259          |
| 32                          | 2,0x10 <sup>6</sup>                  | 78            | 73     | 97            | 109          |
| 33                          | 3,4x10 <sup>6</sup>                  | 47            | 128    | 71            | 166          |
| 32                          | 2,5x10 <sup>6</sup>                  | 39            | 97     | 52            | 138          |
| 27                          | 25x10 <sup>6</sup>                   | 55            | 135    | 98            | 177          |
| 33                          | 3,0x10 <sup>6</sup>                  | 95            | 150    | 135           | 210          |
| 28                          | 6,0x10 <sup>6</sup>                  | 88            | 97     | 142           | 139          |
| 33                          | 2,3x10 <sup>6</sup>                  | 77            | 107    | 128           | 159          |
| 32                          | 35x10 <sup>6</sup>                   | 159           | 213    | 218           | 277          |
| 30                          | 5,0x10 <sup>6</sup>                  | 213           | 297    | 251           | 339          |
| 33                          | 4,0x10 <sup>6</sup>                  | 137           | 229    | 188           | 257          |
| 27                          | 40x10 <sup>6</sup>                   | 179           | 237    | 228           | 277          |
| 30                          | 45x10 <sup>6</sup>                   | 69            | 98     | 81            | 132          |
| 29                          | 27x10 <sup>6</sup>                   | 61            | 78     | 77            | 102          |

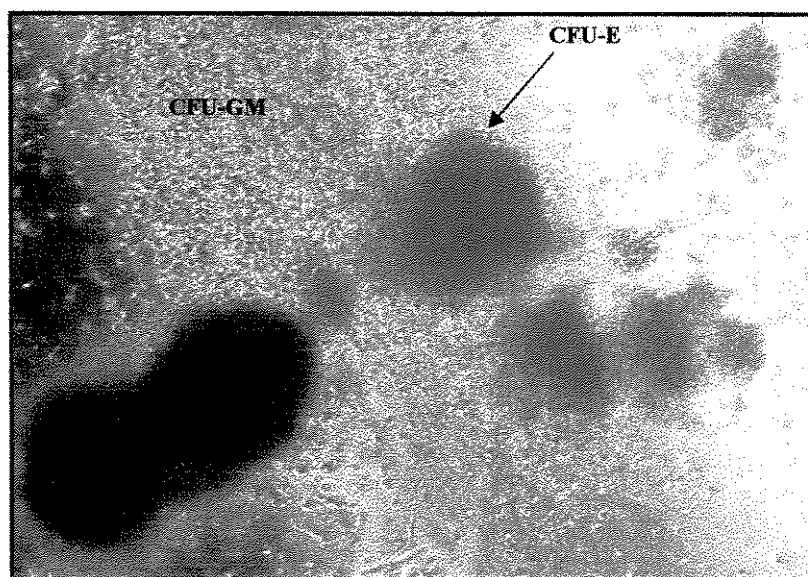
**Tabela 8:** Número de colônias hematopoiéticas obtidas de cultivo de células mononucleadas de recém nascidos de termo.

| Idade gestacional<br>(semanas) | Celularidade<br>Número de<br>células/ml | 7º dia n=11   |        | 14º dia n=11  |        |
|--------------------------------|-----------------------------------------|---------------|--------|---------------|--------|
|                                |                                         | CFU/BFUE/GEMM | CFU-GM | CFU/BFUE/GEMM | CFU-GM |
| 40                             | $4,0 \times 10^6$                       | 5             | 5      | 77            | 29     |
| 40                             | $2,5 \times 10^6$                       | 4             | 4      | 239           | 158    |
| 39                             | $3,0 \times 10^6$                       | 8             | 8      | 163           | 122    |
| 40                             | $2,0 \times 10^6$                       | 6             | 6      | 87            | 61     |
| 40                             | $2,5 \times 10^6$                       | 4             | 4      | 75            | 80     |
| 39                             | $2,0 \times 10^6$                       | 10            | 8      | 233           | 140    |
| 38                             | $4,0 \times 10^6$                       | 20            | 13     | 323           | 140    |
| 40                             | $3,5 \times 10^6$                       | 35            | 20     | 379           | 120    |
| 40                             | $2,7 \times 10^6$                       | 45            | 38     | 391           | 332    |
| 38                             | $4,0 \times 10^6$                       | 50            | 40     | 600           | 540    |

**Figura 1: Cultura de sangue de cordão de neonatos prematuros.**

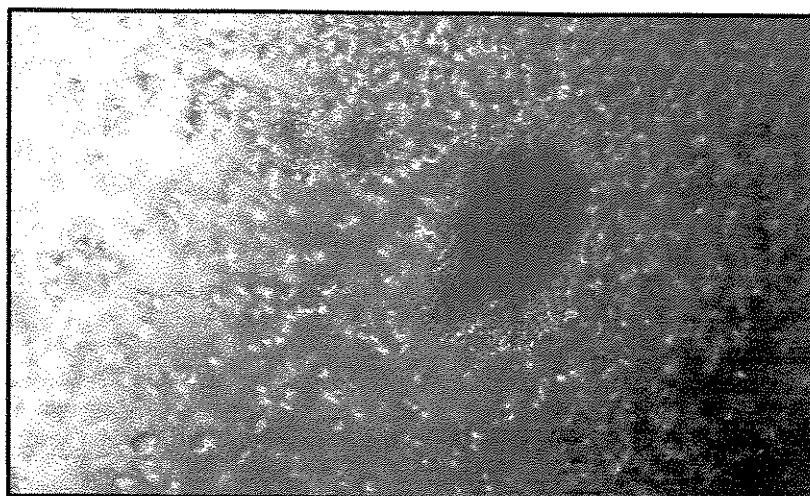


**Figura 1A: Cultura, em meio de metilcelulose, no 70 dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-GM**

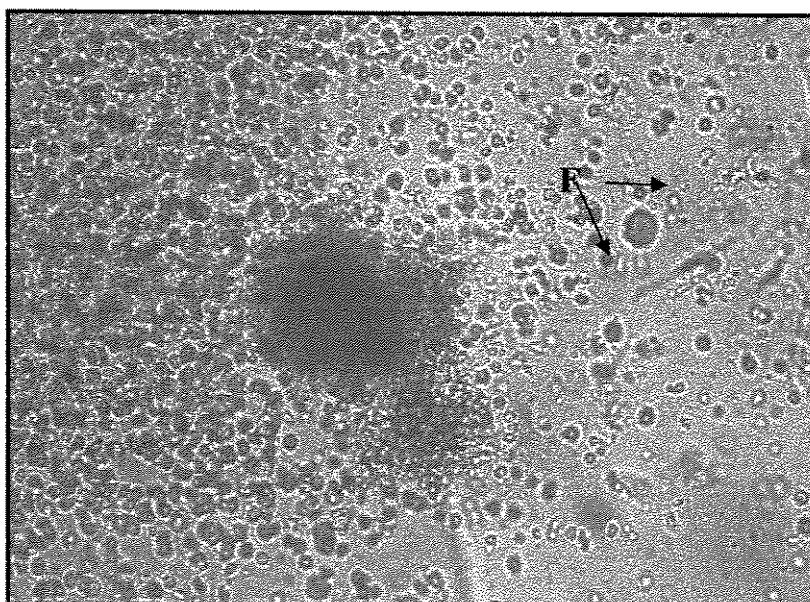


**Figura 1B: Cultura em meio de metilcelulose, no 70 dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-E em diferentes fases de hemoglobinizacão e CFU-GM. Há intensa proliferaçao**

**Figura 1: Cultura de sangue de cordão de neonatos prematuros.**

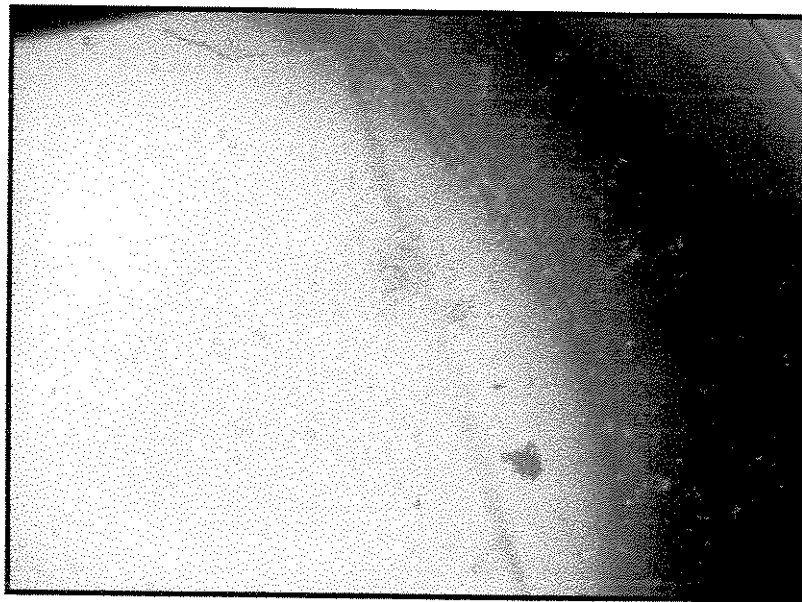


**Figura 1C: Cultura em meio de metilcelulose, no 14º dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-E e intensa proliferação da linhagem granulo-monocítica**

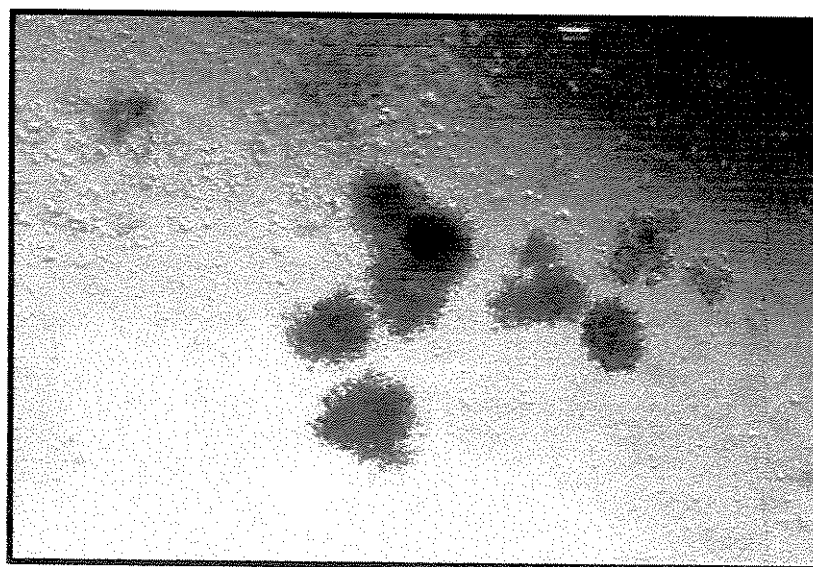


**Figura 1D: Cultura em meio de metilcelulose, no 14º dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-E e intensa proliferação da linhagem granulo-monocítica, notando-se a presença de fibroblastos (F).**

**Figura 2: Cultura de sangue de cordão de neonato de termo.**

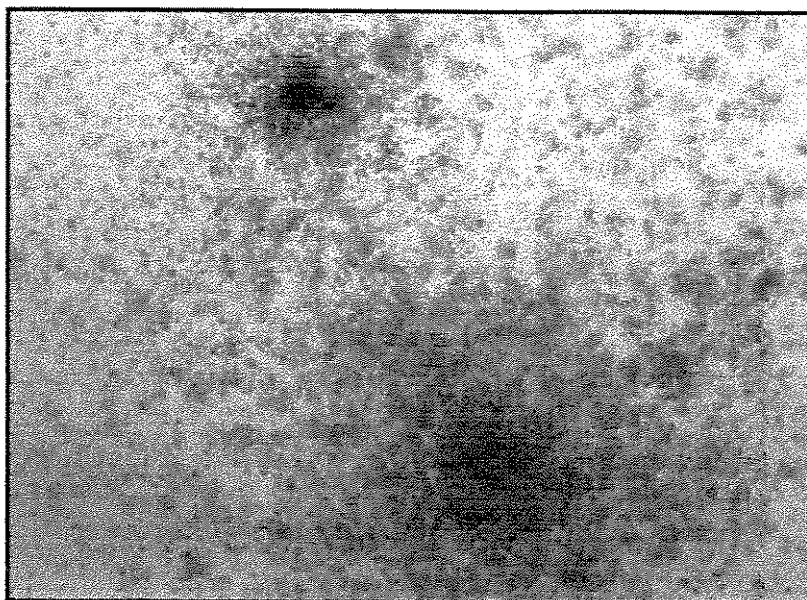


**Figura 2A: Cultura em meio de metilcelulose, no 7<sup>o</sup> dia de cultura, demonstrando colônias de CFU-GM**



**Figura 2B: Cultura, em meio de metilcelulose, no 14<sup>o</sup> dia de cultura, demonstrando colônias de CFU-E em diferentes fases de hemoglobinação e colônia de CFU-GM**

**Figura 2: Cultura de sangue de cordão de neonato de termo.**



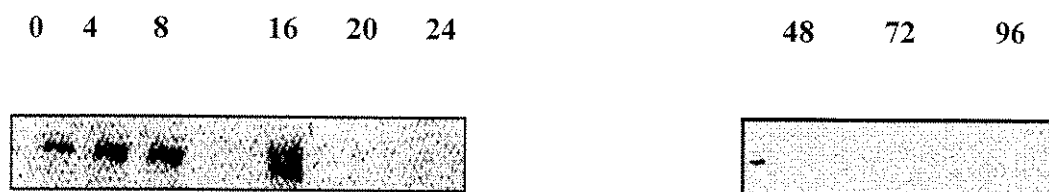
**Figura 2C: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 14º dia de cultura, demonstrando colônias de CFU-GM**

##### **5. Análise da expressão das proteínas de ciclo, p130 e p107 pela técnica de western blotting**

A análise da expressão das proteínas de ciclo celular demonstrou um maior aumento de expressão de p130 a partir de 4 horas, cumulativo, desaparecendo ou diminuindo a partir de 24 horas. A expressão de p 107 ocorreu após as 24 horas de cultura, acumulando até 96 horas. Entretanto as expressões de p130 e p 107 foram maiores nas células de sangue de cordão que nas da medula óssea. Estes resultados sugeriram que as células de sangue de cordão umbilical de recém nascidos prematuros poderiam apresentar uma rápida progressão em ciclo celular.

Figura 3. Resultado da análise da expressão da proteína de ciclo celular p130 nas células mononucleares de sangue de cordão de prematuros e de termo obtida através da técnica de western blotting.

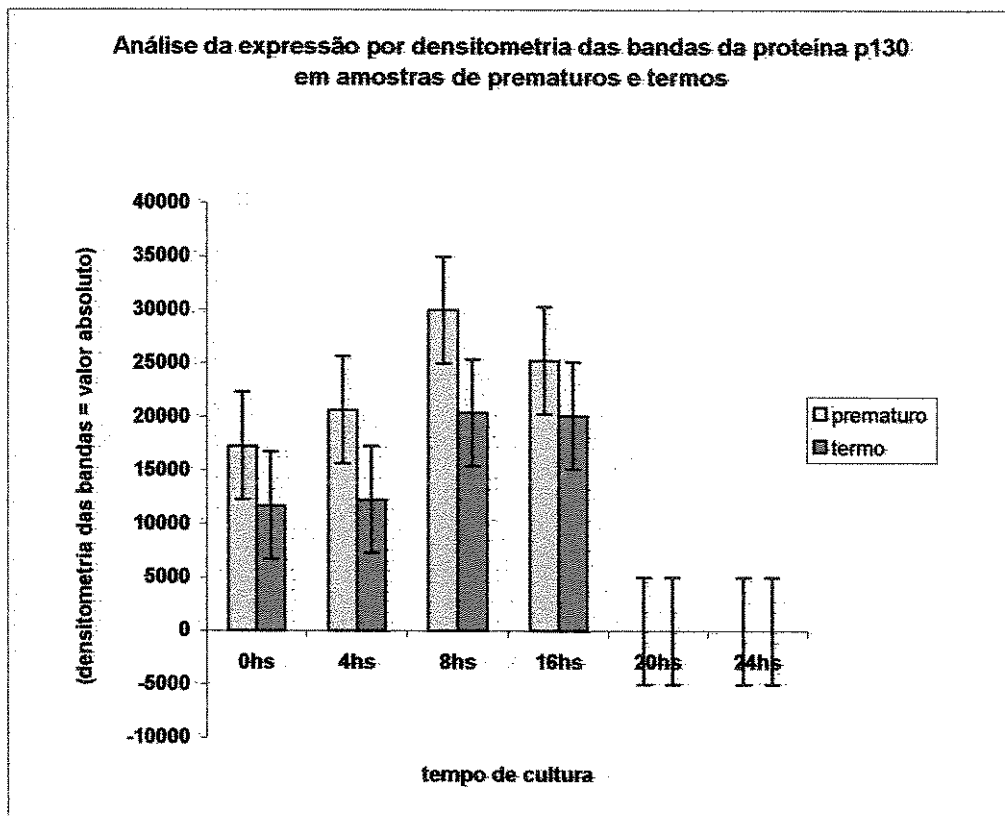
### Prematuros



### Termo



**Gráfico 3: Análise da expressão por densitometria das bandas da proteína p130 das amostras de sangue de cordão de prematuros e de termo.**



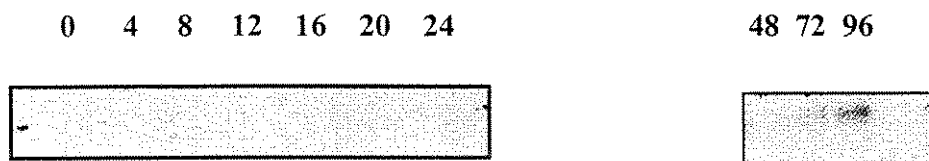
|            |           | Tempo de cultura em horas |       |       |       |      |      |
|------------|-----------|---------------------------|-------|-------|-------|------|------|
| Proteína   | p130      | 0hs                       | 4hs   | 8hs   | 16hs  | 20hs | 24hs |
| abundância | Prematuro | 17310                     | 20638 | 29971 | 25264 | 0    | 0    |
|            | Termo     | 11724                     | 12272 | 20398 | 20102 | 0    | 0    |

Figura 4. Resultado da análise da expressão da proteína de ciclo celular p107 nas células mononucleares de sangue de cordão de prematuros e de termo obtida através da técnica de western blotting.

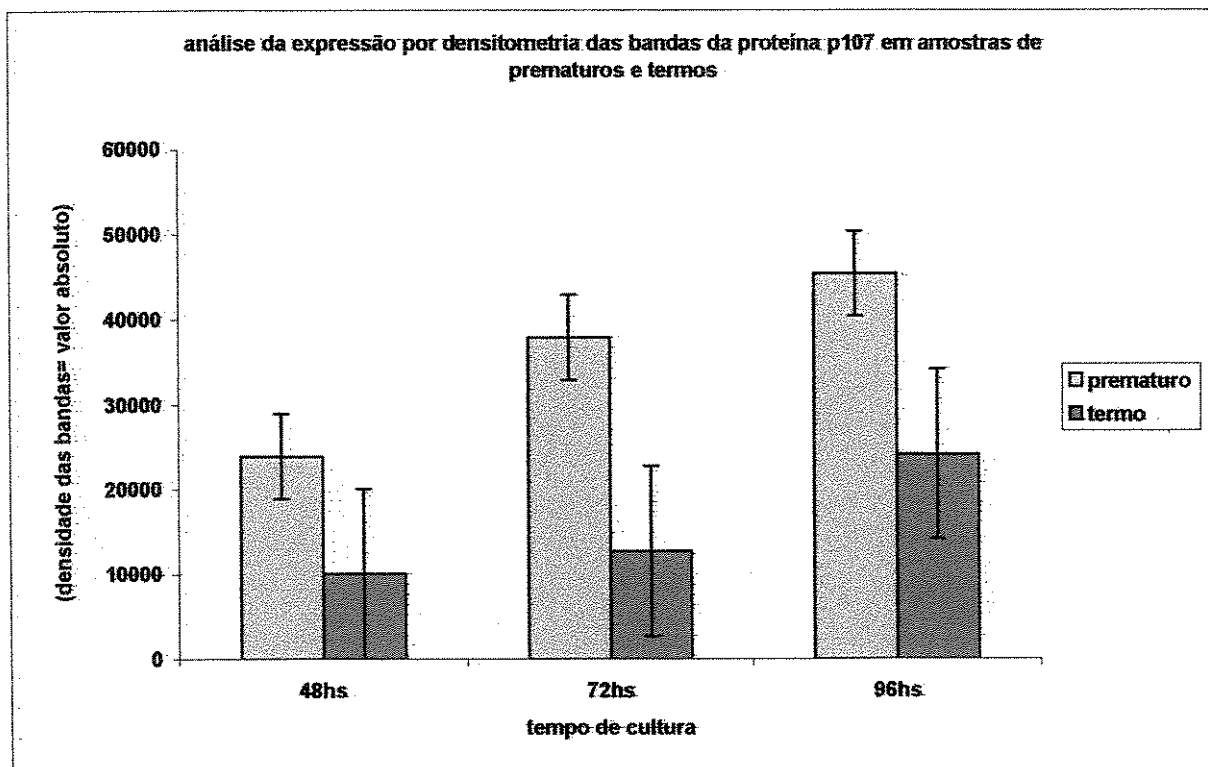
### Prematuros



### Termo



**Gráfico 4: Análise da expressão por densitometria das bandas da proteína p107 das amostras de sangue de cordão de prematuros e de termo.**



|            |           | Tempo de cultura em horas |       |       |
|------------|-----------|---------------------------|-------|-------|
| Proteína   | p107      | 48hs                      | 72hs  | 96hs  |
| abundância | Prematuro | 23910                     | 37868 | 45404 |
|            | Termo     | 10068                     | 12766 | 24148 |

## ***Discussão***

---

A reconstituição da linhagem hematopoiética através de infusão de células tronco da própria linhagem é um procedimento necessário no tratamento de várias doenças hematológicas e não hematológicas. A medula óssea tem sido a principal fonte de obtenção destas células há mais de 40 anos.

Na década de oitenta, o sangue periférico surgiu como outra fonte de obtenção de células tronco, obtidas pós-mobilização com fator estimulante de crescimento de linhagem granulocítica e recentemente, na década de noventa, o sangue de cordão umbilical humano e ou placentário vem sendo também utilizado (Wright-Kanuth *et al*, 2001). As células tronco obtidas destas fontes parecem ter características diferentes, sendo as da medula e de sangue periférico mais diferenciadas que as de sangue de cordão. Quando comparadas com as de medula óssea e sangue periférico, as células de sangue de cordão apresentam alto nível de proliferação, auto-geração, sendo facilmente transfectáveis e quando expandidas, apresentam uma alta expressão do material gênico transfectado (Broxmeyer *et al*, 1992; Kamel-Reid *et al* 1988; Larochelle *et al*, 1995; Lubin *et al*, 1991; Lu *et al*, 1996; McCune *et al*, 1988; Moritz *et al*, 1993; Piacibelo *et al*, 1997; Vomoor *et al*, 1994; Wang, *et al* 1997).

Recentemente, vários artigos foram publicados demonstrando a capacidade das células tronco de linhagem hematopoiética em se diferenciarem em células de outras linhagens como neurônios, músculo cardíaco, hepatócitos entre outros (Alvarez-Dolado *et al* 2003; Camargo *et al*, 2004; Fukuda *et al*, 2003; Kakinuma *et al*, 2003; Nelsome *et al*, 2003; Wang *et al*, 2003; Wagner *et al*, 2004; Willinbring *et al*, 2004). Não há também, na literatura, consenso sobre ciclo celular (Haneline, *et al* 1996; Liang *et al*, 1998; Li *et al*, 2001; Lim *et al*, 1988; Gasparoni *et al* 2000) e capacidade de migração trans-endotelial destas células (Deguchi *et al* 2000; Franssoni *et al*, 2003; Liu *et al*, 2003; Hattori *et al*, 2001 e Zheng *et al*, 2003; Denning-Kendall *et al*, 2003; Glim *et al*, 2000 e Ramirez *et al*, 2000).

A análise da expressão gênica vem sendo utilizada como ferramenta para analisar as diferenças existentes entre as células tronco, dependentes do tipo de fonte de

obtenção. Dentre os métodos utilizados para a análise de expressão, podemos citar a técnica de micro-arranjos e a análise seriada de expressão gênica (SAGE). Em recente estudo (Georgantas *et al*, 2004), a técnica de micro-arranjo foi utilizada para a análise de expressão gênica de sub-populações de células tronco de medula óssea, sangue de cordão e células tronco obtidas de sangue periférico. A confirmação dos resultados foi realizada através da técnica de análise seriada de expressão gênica (SAGE) que detectou 30% a mais de transcriptomas que a técnica de micro-arranjo demonstrando uma melhor eficiência do método. Entretanto, os trabalhos relacionados com expressão gênica de células de linhagem humana (Hashimoto *et al*, 1999; NG *et al*, 2004; Georgantas *et al*, 2004) analisaram uma categoria específica de células, selecionadas através de fenótipos conhecidos, comprometidos com imaturidade (CD34<sup>+</sup>; CD 34<sup>+</sup>/ CD 38<sup>-</sup>/ Lin<sup>-</sup>). A análise da expressão gênica do conjunto de células mononucleares, que na maioria das vezes, é o compartimento infundido nos procedimentos relacionados com transplante e terapia celular, ainda não foi realizada.

O presente estudo visou investigar o perfil da expressão gênica das células mononucleares de sangue de cordão umbilical humano, através da análise seriada de expressão gênica (SAGE), comparando com o perfil das células mononucleares de medula óssea já depositada em bibliotecas de bancos de dados internacionais e realizar estudo funcional, analisando, através da técnica de imunoblotting, as proteínas de ciclo celular, p130 e p107.

A comparação entre as bibliotecas de células mononucleares de sangue de cordão e de medula óssea demonstrou 23.981 genes comuns às duas bibliotecas. Quando estes genes foram analisados através do método estatístico de Audic *et al* Claverie (1997), 556 genes diferencialmente expressos ( $p \leq 0,05$ ) foram detectados. Destes, obtivemos 35 com a expressão dez vezes mais abundante em sangue de cordão que em medula óssea e treze genes com expressão exatamente ao inverso (tabelas 4 e 5). Estes 48 genes possuíam classificação no programa UniGene.

Obtivemos também 13 genes com abundância de expressão  $\geq$  ou  $\leq$  a 10, mas sem classificação no programa UniGene.

A análise funcional foi realizada em duas ontologias; função molecular e função biológica, nos níveis 1, 2, 3 e 5. tendo sido utilizados os programas; Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>) e David (<http://www.david.niaid.nih.gov/david/beta/index/htm>) e mostrou distribuição similar entre as várias categorias nos níveis 1, 2 e 3. O nível 5 apresentou uma maior distribuição de tags em sangue de cordão nas seguintes categorias; resposta immune, ciclo celular, resposta inflamatória, resposta de defesa celular, replicação de DNA, metabolismo de mRNA, via de sinalização do receptor de proteína ativadora de linfócitos com proteína G acoplada, catabolismo de lipídios, regulação positiva da cascata de I-kappa B kinase-NF-kappa B, biossíntese de esteróides, resposta contra patógenos, regulação positiva de sinal de transdução, metabolismo de esteróides (<http://www.hemocentro.unicamp.br/summary>).

Os genes expressos com abundância  $\geq 10$  ou  $\leq 10$  estavam relacionados com ciclo e diferenciação celular, resposta imune e capacidade de migração trans-endotelial. O sangue de cordão apresentou um maior número de genes mais expressos. Talvez, este aumento de expressão, possa explicar a maior capacidade de proliferação, diferenciação e auto-geração do sangue de cordão, quando comparado com a medula óssea.

Os resultados obtidos no SAGE foram confirmados pela reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativo (qPCR) em 10 dos 11 genes escolhidos para validação, apresentando um índice de confirmação de 90%. Entretanto, algumas diferenças de expressão entre os dois métodos foram detectadas, provavelmente devido a diferenças inerentes às técnicas de quantificação de expressão gênica (NY *et al*, 2004; Ekman *et al*, 2003; Walter-Yohrling *et al*, 2003)

Alguns dos genes diferencialmente expressos foram escolhidos para descrição de suas funções.

Dentre os genes mais expressos, o receptor F11 (F11R) tem importante função na adesão celular podendo atuar também como receptor de reovirus, receptor de plaquetas e como ligante para a integrina LFA1, que está envolvida na migração trans endotelial de leucócitos (Sobocka *et al*, 2004, Barton *et al*, 2001, Naik *et al*, 2003; Ostermann *et al*, 2005).

A Linfotóxina beta é uma proteína de membrana tipo II pertencente à família dos fatores de necrose tumoral (TNF), envolvida no desenvolvimento normal da linhagem linfóide e atua como um indutor da resposta inflamatória (Lin *et al*, 2003).

O antígeno CD6 é um receptor celular, expresso em timócitos imaturos e linfócitos maduros T B1a, envolvido na ativação do linfócito T e na sua diferenciação (Gimferrer *et al*, 2004 e Konno *et al*, 2001).

Linfotóxina Beta e antígeno CD6 estão expressos em linfócitos imaturos. Recentemente, alguns estudos foram publicados, onde os autores analisaram a expressão gênica das linhagens linfocítica e monocítica de sangue de cordão umbilical humano, comparando com as de sangue periférico de um indivíduo adulto. Os estudos foram realizados através das técnicas de micro-arranjos, citometria de fluxo e reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativo.

Nestes estudos, foi encontrada maior expressão de transcritos relacionados com células precursoras imaturas, relacionadas à proliferação e diferenciação da linhagem linfóide; presença de marcadores compatíveis com migração do timo em linfócitos T, CD4+ imaturos (*naive*) nas células de sangue de cordão (Lee *et al*, 2004).

Houve redução de expressão de genes relacionados com o fator nuclear de linfócito T ativado (NFAT), que seriam responsáveis pela estimulação positiva de citocinas e importantes na amplificação da resposta alogênica de linfócitos T e na expressão de CTLA-4 (regulador de sinalização de linfócitos T), o que poderia contribuir para uma maior tolerância na resposta alogenênica dos linfócitos de sangue de cordão (Miller *et al*, 2002 e Kaminsky *et al*, 2004).

Foi detectado também, aumento de expressão de enzimas e quimioquinas indutoras de anergia em linfócitos T de sangue de cordão, observado em estudos realizados estimulando monócitos de sangue de cordão umbilical e de sangue periférico com linfopoietina de estroma de timo (Urashima *et al*, 2005).

As alterações de expressão relatadas nos estudos acima citados, assim como a maior expressão de Linfotóxina Beta e antígeno CD6 em sangue de cordão umbilical, detectadas em nosso experimento, poderiam ser relacionadas com maior anergia e maior tolerância em resposta alogênica dos linfócitos T do sangue de cordão umbilical. Este fato contribuiria para a baixa incidência de doença enxerto versus hospedeiro (GVHD) nos transplantes realizados com sangue de cordão umbilical, possibilitando também, a sua utilização em transplante sem uma total compatibilidade ao sistema de histocompatibilidade leucocitária (HLA).

A granulísina é uma proteína presente nos grânulos citotóxicos dos linfócitos T e nos linfócitos NK, (Natural Killer) (Clayberg *et al*, 2003; Ogawa *et al*, 2003; Okada *et al*, 2003; Kaspar *et al*, 2001) Ela induz apoptose em células de mamíferos, danificando a mitocôndria, liberando citocromo c e fatores indutores de apoptose (Medley *et al*, 1996; Zhou *et al*, 2001; Turman *et al*, 1993).

NKG7 é uma proteína de membrana, expressa nos linfócitos T ativados e nos linfócitos NK, estando relacionado com citotoxicidade (Medley *et al*, 1996; Zhou *et al*, 2001; Turman *et al*, 1993).

A granulísina e NKG7 estão relacionados com a capacidade citotóxica de linfócitos T e NK. O sangue de cordão umbilical humano, com relação ao número de linfócitos NK existente, apresenta o mesmo número de linfócitos NK que o do sangue periférico de um indivíduo adulto (Keever *et al*, 1995). A maior expressão de Granulísina e NKG7, no sangue de cordão, poderia estar relacionada com a ocorrência de taxas normais de reação enxerto *versus* leucemia (GVL) nos transplantes realizados com sangue de cordão. Ao contrário da doença enxerto versus hospedeiro (GVHD), O GVL é desejável no transplante.

Em relação aos genes relacionados com ciclo celular e capacidade de migração trans endotelial o SMARCC2 é um membro da família de proteínas SWI/SNF que disponibiliza atividade de helicase e ATPase. Ele é responsável pela regulação e transcrição de alguns genes, alterando a estrutura da cromatina ao redor dos genes (Ringe *et al*, 1998). O CDC25B é membro da família das fosfatases CDC ciclinas que ativa a ciclina quinase cdc2, necessária para que a célula entre em mitose. A cdc2 aumenta a expressão das proteínas de ciclo p107 e pRB (Brezak *et al*, 2004; Dutertre *et al*, 2004). O fator estimulante de transformação de crescimento alfa (TGF alfa) é um polipeptídio que confere às células em cultura, a capacidade para alterar o fenótipo. Ele possui 40% de homologia com o fator de crescimento epidermóide (EGF), competindo com EGF pelo seu receptor de ligação, estimulando sua fosforilação e produzindo resposta mitogênica (Awwad *et al*, 2003, Luetkeke *et al*, 1990). O fator de necrose tumoral 10 (TNF10 ligante) é uma citocina que induz apoptose em células em transformação ou tumorais, mas não destrói células normais, mesmo sendo expressa num nível significativo na maioria dos tecidos (Pan *et al*, 1997; Cristi *et al*, 2004). A quinase de fase S, associada a proteína 1, SKP1A é uma proteína F-box descrita que funciona como substrato de componente de reconhecimento para os complexos de ligação SCF ubiquitina. Ela se liga à ciclina F, a SKP2A e a outras proteínas regulatórias envolvidas em proteólise de ubiquitina através de F-box, Parece colaborar no controle de alguns fatores de transcrição dependentes de beta-catenina e degrada a proteína de ciclo celular p130, envolvida no ciclo celular com progressão para G1 quando hiperfosforilada, induzindo retorno a G0, quando ligada à E2F4 (Bai *et al*, 1996; Schuman *et al*, 2000). A S100A8 é uma proteína de ligação com calcio, membro da família das proteínas S100, envolvida com a regulação de processos celulares como progressão e diferenciação celular, com forte influência sobre migração trans endotelial. Ela estimula L-lecitina que está envolvida em adesão celular e regula também processos inflamatórios, através da migração de neutrófilos para os sítios de inflamação (Kerkhoff *et al*, 1998; Shafer *et al*, 1996; Vogl *et al*, 2004). A MAP2K2 é uma proteína quinase que interfere com o sinal de transdução de fator estimulante de crescimento

mitogênico. Ela fosforila e ativa MAPK1/ERK2 e MAPK2/ERK3 (Ussar *et al*, 2004; Zheng *et al*, 1993).

A maioria dos genes descritos acima se relaciona com migração trans endotelial de leucócitos (*homing*), indução de ciclo celular e diferenciação celular. O aumento de expressão destes genes facilitaria o processo de migração celular, capacidade de proliferação e diferenciação. Estas propriedades, quando relacionadas com células tronco, proporcionariam uma melhor reconstituição da linhagem desejada após um transplante ou a recuperação de um tecido lesado.

Outro ponto onde não há consenso na literatura é sobre a interferência das moléculas de adesão e integrinas facilitando ou dificultando a migração trans endotelial destas células e uma melhor reconstituição da linhagem hematopoiética. Alguns autores (Hattori *et al*, 2001; Ramirez *et al*, 2001; Zheng *et al* 2003) demonstraram que células tronco de sangue de cordão umbilical apresentam um menor nível de expressão de moléculas de adesão CD49e, CD49f, CXCR-4 que as de medula óssea e célula tronco de sangue periférico que poderia contribuir para o retardo na reconstituição da linhagem hematopoiética pós-transplante com sangue de cordão. O aumento na expressão destas moléculas pode ser obtido através de expansão ex-vivo com citocinas (Liu *et al*, 2003), mas alguns autores relataram que este aumento de expressão pode levar a um decréscimo na capacidade de homing (Dening-Kendall *et al*, 2003). Apesar da falta de consenso, estudo clínico (Frassoni *et al*, 2003) comparando crianças transplantadas com medula óssea e sangue de cordão umbilical demonstrou que as células mononucleares da medula óssea das transplantadas com sangue de cordão apresentaram maior capacidade de proliferação quando analisadas em experimentos de cultura de longa duração com células iniciais (LTC-limiting dilution) e avaliação do número de unidades formadoras de colônias (CFU) obtidas em cultura demonstrando assim melhor reconstituição do reservatório medular.

No último ano, dois estudos analisando expressão gênica de sub-populações de células tronco de medula óssea, sangue de cordão umbilical e célula tronco obtida por

mobilização de sangue periférico foram publicados (Ng *et al*, 2004; Georgantas *et al*, 2004). Apesar dos estudos acima citados terem analisados sub-populações específicas de células tronco e dos métodos de análise de expressão também serem diferentes (Ng, CD34<sup>+</sup>, micro-arranjo; Georgantas CD 34<sup>+</sup>/ CD 38<sup>-</sup>/ Lin<sup>-</sup>, micro-arranjo e SAGE; em nosso estudo, células mononucleares totais de sangue de cordão umbilical humano e SAGE), ao compararmos nossos resultados com os obtidos por Ng *et al*, 2004, algumas coincidências foram encontradas. Em ambos os estudos os genes, HSP 70, elastase e CXCR4, foram menos expressos em sangue de cordão do que na medula óssea, (em nosso estudo 3.7; 4.9; 8.6 vezes e no outro estudo: 4.8; 10; 2.7 vezes, respectivamente). Estes dados se encontram *on line* no site <http://www.hemocentro.unicamp.br/sumary>, na tabela onde os 556 genes comuns ao sangue de cordão e medula óssea com  $p \leq 5$  estão relacionados. Assim como em nosso estudo, os genes diferencialmente expressos no estudo de Ng, também se relacionavam com resposta imune, migração trans endotelial e ciclo celular.

Georgantas *et al*, 2004, analisando as células CD 34<sup>+</sup>/ CD 38<sup>-</sup>/ Lin<sup>-</sup>, obtidas de medula óssea normal, sangue de cordão umbilical e célula tronco mobilizada de sangue periférico humanos, identificaram os transcritos mais expressos, comuns às três fontes. A análise foi realizada pela técnica de micro arranjo (Affimetrix gene chip) e a validação dos resultados pelo método de SAGE. O SAGE confirmou os resultados do micro arranjo, mas detectou um maior número de transcritos, 30% a mais. É interessante relatar que os genes mais expressos, no estudo de Georgantas, também se relacionavam com as mesmas funções que os do estudo de Ng e o nosso.

Apesar de termos utilizado uma abundância de 10 vezes na seleção dos genes diferencialmente expressos, o SAGE foi sensível o suficiente para detectarmos 61 genes (tabela com os genes com abundância maior ou igual e menor ou igual a 10 no site <http://www.hemocentro.unicamp.br/sumary>). Em comparação, no estudo de Ng *et al* (2004) foi utilizada uma abundância de 2 a 2,5 vezes, para a seleção dos genes

diferencialmente expressos, tendo sido identificados 51 genes, quando medula óssea e sangue de cordão umbilical foram comparados.

Os ensaios clonogênicos realizados com células mononucleares de sangue de cordão de recém-nascidos prematuros e de termo, em meio semi-sólido de metilcelulose com fatores estimulantes de crescimento, demonstraram, na leitura das placas de cultura realizada no 7º e no 14º dias, maior número de colônias de linhagem eritróide (CFU-E, BFU-E), mistas (GEMM) e de linhagem granulo monocítica (CFU-GM) nas culturas de prematuros que nas de termo.

Estes resultados sugeriram que o sangue de cordão de prematuros, além de um maior número de células tronco (Lu *et al*, 1993), o que é facilmente compreendido pela própria ontogenia da linhagem hematopoiética e o momento de coleta do sangue de cordão, poderiam ter apresentado uma rápida progressão em seu ciclo celular e se diferenciado precocemente. Os experimentos funcionais revelaram que houve uma maior expressão (fosforilação) das proteínas de ciclo p130 e p107 nas células de sangue de cordão umbilical de recém nascidos prematuros que nas de termo. A fosforilação de p130 e p107 é necessária para que ocorra a quebra dos complexos p130, p107 com os membros da família E2F. A liberação de E2F propiciaria a transcrição de fatores E2F dependentes, necessários para que haja a evolução do ciclo celular. Uma maior fosforilação destas proteínas no sangue de cordão umbilical de prematuros, poderia explicar os resultados da cultura, onde ocorreu uma maior proliferação e diferenciação, com o aparecimento de colônias que deveriam aparecer mais tardiamente logo nos primeiros dias de cultura.

Coincidentemente, a análise das células mononucleares de sangue de cordão pela técnica de SAGE, revelou um aumento na frequência de genes relacionados com ciclo celular.

O gene CDC25B, mais expresso em sangue de cordão, é uma fosfatase CDC ciclina, cuja função é a ativação da ciclina quinase cdc2, que por sua vez aumenta a expressão

de p107. A maior expressão de p107 poderia estimular a progressão do processo de ciclo celular e diferenciação.

O gene SKP1A, também mais expresso em sangue de cordão, é responsável pela degradação de p130 hiperfosforilado, fazendo com que haja diminuição do complexo p130/E2F4, liberação de E2F4 e transcrição dos genes relacionados com a progressão do ciclo celular, mediados por E2F1, que estariam inibidos pela presença do complexo p130/E2F4. Estudos funcionais para demonstrar a função destes genes no sangue de prematuro devem ser realizados.

As terapias celulares com células tronco, a descoberta de novas fontes de obtenção destas células com características diferentes que fizeram com que estes procedimentos venham evoluindo de forma significativa, propiciando uma melhor reconstituição, diferenciação para outras linhagens celulares, reconstituição de tecidos lesados e poderá possibilitar, no futuro, formação de novos órgãos. No entanto, pouco se sabe ainda sobre as características destas células assim como do compartimento denominado células mononucleares totais e qual a melhor forma de manipulação para que estes procedimentos possam ser realizados, inclusive no período intra-útero. O advento de novas metodologias que permitem a detecção da expressão gênica destas células propiciou um enorme avanço nesta área, mas a confirmação destes resultados através de estudo funcional se torna imperativo.

## ***Conclusão***

---

**No presente estudo, concluimos que:**

- A análise seriada de expressão gênica demonstrou ser um método poderoso para a detecção de diferenças de expressão gênica em células de sangue de cordão umbilical e medula óssea.
- As células mononucleares de sangue de cordão apresentam maior expressão de alguns genes relacionados com resposta imune, ciclo celular e migração trans endotelial de leucócitos, quando comparadas com as células de medula óssea.
- A partir dos resultados aqui obtidos, será possível a realização de estudos envolvendo os genes diferencialmente expressos, no intuito de elucidarmos as características funcionais que permitem a utilização de sangue de cordão em procedimentos de transplante sem total compatibilidade ao sistema HLA e o uso de duas ou mais bolsas de doadores diferentes, num mesmo paciente.

## ***Referências Bibliográficas***

---

1. Akashi K, He X, Chen J. Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood*. 2003; 101: 383-389.
2. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM. Fusion of bone marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003; 424: 968-973.
3. Audic S, Claverie J-M. The Significance of Digital Gene Expression Profiles. *Genome Res*. 1997; 7: 986-995.
4. Awwad RA, Sergina N, Yang H. The role of transforming growth factor alfa in determining growth factor independence. *Cancer Res*. 2003, 65: 4731-4738.
5. Bacigalupo A, Frassoni F, Van Lint MT. Bone marrow or peripheral blood as source of stem cells for allogeneic transplantation. *Haematologica*. 2002; 87: 4-8.
6. Bai C, Sen P, Hofmann K. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*. 1996; 86: 263-274.
7. Bañez I, Krishnan B, Ansari Q. False aneuploidy in benign tumors with a high lymphocyte content. *Human Pathol*. 1992; 23: 1244-1251.
8. Barton ES, Forest JC, Connolly JL. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*. 2001; 104: 441-451.
9. Brezak MC, Quaranta M, Mondesert O. A novel synthetic inhibitor of CDC25 phosphatases; BN82002. *Cancer Res*. 2004; 64: 3320-3325.
10. Brossard Y, Niflerik J V, Lachaux V D, Huchet J. Collection of placental blood with a view to hematopoietic reconstitution. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1990; 32: 427-9.
11. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 3828-3832.

12. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 4109-4113.
13. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S. Clinical and biological aspects of human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cells. *Bone Marrow Transplantation* 1992; 9: 7-10.
14. Camargo FD, Finegold M, Goodell MA. Hematopoietic myelomonocytic cells are the mayor source of hepatocyte fusion parteners. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1266-1270.
15. Canhoto AJ, Chestukin A, Litovchick I, DeCaprio J A. Phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130 in growth-arrested cells. *Oncogene*, 2000; 19: 5116-5122.
16. Champseix C, Marechal V, Khazaal I, Schwartz O. A cell surface marker gene transferred with a retroviral vector into CD34<sup>+</sup> cord blood cell is expressed by their T-cell progeny in the SCID-hu thymus. *Blood* 1996; 88: 107-113.
17. Chiu RC. Bone marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Fail Rev*. 2003; 8: 247-251.
18. Cheng F, Zou P, Yang H. Induced differentiation of human cord blood mesenchymal stem/progenitor cells into cardiomyocyte-like cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2003; 23: 154-157.
19. Clayberger C, Krensky AM. Granulysin. *Curr Opin Immunol*. 2003, 15: 560-565.
20. Classom M, Dyson N. p107 and p130: Versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res*. 2001; 264: 135-147.
21. Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation—how, when and for whom? *Blood Rev*. 2004; 18:167-179.

22. Crista SA, Elzey BD, Ludwig AT. Expression of apoptosis TNF-related apoptosis-inducing ligand in megacaryocytes and platelets. *Exp Hematol.* 2004; 32: 1073-1081.
23. Dale JH., Moghrabi A., Wagner E. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 33: 605-611.
24. Deguchi T, Komada Y. Homing-associated cell adhesion molecule (H-CAM/CD44) on human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Lymphoma.* 2000; 40:25-37.
25. DeRisi JL, Lyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on genome scale. *Science.* 1997; 278: 680-686.
26. Denning-Kendall P, Singha S, Bradley B. Cytokine expansion culture of cord blood CD34 cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem Cells.* 2003; 21:61-70.
27. D'hautcourt J, Spyrtos F, Chassevent A. Quality control study by the French cytometry association on flow cytometric DNA content and S-phase fraction (%). *Cytometry.* 1996; 26: 32-39. Erratum in: *Cytometry* 1996; 26: 183.
28. Dutertre S, Cazales M, Quaranta M. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci.* 2004; 117: 2523-2531.
29. Erdo FC, Buhle J, Blunk M. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003; 23: 780-785.
30. Ekman DR, Lorenz WW, Przybyla AE. SAGE analysis of transcriptome responses in Arabidopsis roots exposed to 2,4,6-Trinitrotoluene. *Plant Physiol.* 2003; 133: 1397-1406.

31. Evasikov AV, Solter D. Comment Comments on "Stemness" transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells and "a molecular signature". Science (Wash. DC). 2003; 302: 393; author reply 393.
32. Fortunel NO, Otu HH, NG HH. Comments on "Stemness" transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells and "a molecular signature". Science (Wash. DC) 2003; 302: 393; author reply 393.
33. Fukuda S, Pelus LM. Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem cells and progenitors cells before cell cycle entry. Cell Cycle. 2002; 1: 322-326.
34. Fukuda K. Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. Hum Cell. 2003; 16:83-94.
35. Furukawa Y. Cell Cycle Control Genes and Hematopoietic Cell Differentiation. Leuk Lymphoma. 2000; 43: 225-231.
36. Garriga J, Limon A, Mayol X, Rane SG. Differential regulation of the retinoblastoma family of proteins during cell proliferation and differentiation. Biochem J. 1998; 333: 645-54.
37. Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini MA, Bonfichi M. Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitors cells during gestation. Pediatr Res. 2000; 47: 825-9.
38. Gaubatz S, Lindeman GJ, Ishida S, Jaoki L. E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. Mol Cell. 2000; 6: 729-35.
39. Georgantas RW 3rd, Tanadve V, Malehorn M. Microarray and Serial Analysis of Gene expression analyses identify known and novel transcripts overexpressed in hematopoietic stem cells. Cancer Res. 2004; 64: 4434-4441.

40. Gimferrer I, Calvo M, Mittelbrunn M. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J Immunol.* 2004, 173: 2262-2270.
41. Glim H., Oh IH, Eaves CJ. Human hematopoietic stem cells stimulate to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G (2)/M transit and do not reenter G (0). *Blood.* 2000; 96: 4185-4193.
42. Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Clin Ex Hematol.* 2001; 5: 87-99.
43. Gluckman E, Current knowledge about the properties of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 1994; 14: 185.
44. Gluckman E, Devergié A, Bourdeau-Esprou H, Thierry D. Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking. *Bone Marrow Transplantation* 1992; 9: 114-117.
45. Gluckman E, Devergié A, Bourdeau-Esprou H, Thierry D. Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1990; 32: 423-425.
46. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F. Outcome of Cord Blood Transplantation from Related and Unrelated Donors. *N Eng J Med.* 1997; 337: 373- 381.
47. Gluckman E., Rocha V. Cord Blood Transplant; strategy of alternative donor search. *Springer Semin. Immunopathol.* 2004; 26: 143-154.
48. Hamalainen H, Zhou H, Chou W. Distinct gene expression profiles of human type I and type 2 T helper cells. *Genome Biol.* 2001; 2: research0022.
49. Haneline L S, Marshall K P, Wade Clapp D. The Highest Concentration of Primitive Hematopoietic Progenitor Cells in Cord Blood Is Found In Extremely Premature Infants. *Pediatric Research.* 1996; 39: 820 - 825.

50. Hao Q-L, Thiermann FT, Peterson D, Smogorzewska E M. Extended Long-Term Culture Reveals a Highly Quiescent and Primitive Human Hematopoietic Progenitor Population. *Blood*. 1996; 9: 3306-3313.
51. Harris D T, LoCascio J, Besencon F J. Analysis of alloreactive capacity of human cord blood: implications for graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation*. 1994; 14: 545-553.
52. Harris D T, Schumacher M J, LoCascio J, Besencon F J. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89: 10006-10010.
53. Harris D T, Schumacher M J, LoCascio J, Booth A. Immunoreactivity of umbilical cord blood and postpartum maternal peripheral blood with regard to HLA-haploidentical transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 1994; 14:63-68.
54. Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derivate dendritic cells. *Blood*. 1999; 94: 845-853.
55. Hattori Y, Kato H., Nitta M. Decrease of L-selectin expression on human CD34+ cells on freezing-thawing and rapid recovery with short-term incubation. *Exp Hematol*. 2001; 29:114-122.
56. Hipp J, Atala A. Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. *J Exp Clin Assist Reprod*. 2004; 1: 3.
57. Hirao A, Kawano Y, Takaue Y, Suzue T. Engraftment potential of peripheral and cord blood stem cells evaluated by a long-term culture system. *Experimental Hematology*. 1994; 22: 521-526.
58. Hoechedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med*. 2003; 349: 275-286.

59. Hogan C J, Shpall E J, McNulty G, McNiece I. Engraftment and Development of Human CD34+ - Enriched Cells From Umbilical Cord Blood in NOD/LtSz-scid/scid Mice. *Blood*. 1997; 90: 85-96.
60. Hows J M, Bradley B A, Marsh J C W, Luft T. Growth of human umbilical cord blood in longterm haemopoietic cultures. *The Lancet*. 1992; 340: 73-76.
61. Ivanova NB, Dimos J, Schaniel C. A stem cell molecular signature. *Science* (Wash. DC). 2002; 298: 601-604.
62. Jaenisch R. The Science and ethics of nuclear transportation. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2787-2791.
63. Jacobson DA., Hewlett B., Ranalli M. Outcomes of unrelated cord blood transplants and allogeneic-related hematopoietic stem cell transplants in children with high-risk acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2004; 34: 901-907.
64. Jiang H, Karnezis NA, Tao M, Guida PM. p RB and p107 have distinct effects when expressed in p RB-deficient tumor cell physiologically relevant levels. *Oncogene*. 2000; 19:3878-87.
65. Jourdan M. Ferrero-Poüs M. Spyrtos F. Flow cytometric S-phase fraction measurement in breast carcinoma: Influence of software and histogram resolution. *Cytometry*. 2002; 48:66-70.
66. Kamel-Reid S, Dick JE Engraft of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science*. 1988; 242: 1702-1709.
67. Kaminsky BA, Kadereit S, Miller RE. Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD 4+T lymphocytes during primary stimulation. *Blood*. 2003; 102: 4608-4617.
68. Kaspar AA, Okada S, Kumar J. A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. *J Immunol*. 2001; 167: 350-356.

69. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells*. 2003; 21: 217-227.
70. Keever CA, Abu-Hajir M, Graf W, McFadden P. Characterization of alloreactivity and anti-leukemia reactivity of cord blood mononuclear cells. *Bone Marrow Transplantation*. 1995; 15: 407-419.
71. Kerkhoff C, Klempt M, Sorj C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 ( S100A9). *Biochim Biophys*.1998; 1448: 200-211.
72. Kogler G, Sensken S, Airey JA. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*. 2004; 200: 123-135.
73. Konno A, Ahn JS, Kitamura H. Tissue distribution of CD6 and CD6 Ligand in cattle: expression of the CD6 ligand (CD166) in the autonomic nervous system of cattle and human. *J Leuco Biol*. 2001; 69: 944-950.
74. Kubbies M. Flow cytometric DNA –histogram analysis: Non-Stoichiometric fluorochrome binding and pseudoaneuploidy. *J Pathol*. 167:413-419.
75. Lanza RP, Cibelli JB, West MD. The ethical reasons for stem cell research. *Science*. 2001; 292: 1299.
76. Lanzerdorf SE, Boyd CA, Wright DL. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cells lines. *Fertil Steril*. 2001; 76: 132-137.
77. Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science*. 1992; 255: 1137-1141.
78. Larochelle A, Vormoor J, Lapidot T, Sher G. Engraftment of immune-deficient mice with primitive hematopoietic cells from B-thalassemia and sickle cell

- anemia patients: implications for evaluating human gene therapy protocols. *Human Molecular Genetics*. 1995; 4: 163-172.
79. Lash AL, Tolstoshev CM, Wagner L. SAGEmap: A Public Gene Expression Resource. *Genoma Research*. 2000; 10: 1051-1060.
80. Lee MS, Hanspers K, Barker CS. Gene expresson profiles during CD4+ T cell differentiation. *Int Immuno*. 2004; 16: 1109-1124.
81. Li K, Yau FW, Fok TF, Li CK. Haematopoietic stem and progenitor cells in human tem and preterm neonatal blood. *Vox Sang* 2001, 80: 162-9.
82. Liang D C, Ma SW, Lin-Chu M, Lan C C. Granulocyte/ Macrophage Colony-Forming Units from Cord Blood of Premature and Full-Term Neonates: Its Role in Ontogeny of Human Hemopoiesis. *Pediatric Research*. 1988; 24: 701 - 702.
83. Lim FT, Scherjon AS, van Beckhoven JM, Brand A. Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Am J Obstet, Gynecol*. 2000; 183: 1144-1152.
84. Lin X, Ma X, Rodriguez M. Membrane lymphotoxin is required for resistance to Theiler' s virus infection. *Int Immunol*. 2003; 15: 955-962.
85. Liu B., Liao C., Chen J. Significances of increasing adhesion of cord blood hematopoietic cells and a new method: platelet microparticles. *Am J Hemathol*. 2003; 74:216-217.
86. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-delta delta Ct method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.
87. Lu L, Xiao M, Schen RN, Grigsby S. Enrichment, responssiveness of single primitive CD34+++ human umbilical cord blood hematopoietic progenitors characterization and with high proliferative and replating potential. *Blood*. 1993; 81: 41-48.

88. Lubin 1, Faktorowich Y, Lapidot T, Gan Y. Engraftment and development of humant and B cells in mice after bone marrow transplantation. *Science*. 1991; 252:1137
89. Lucotti C. Malabarba L., Rosti V. Cell cycle distribution of cord blood-derived haematopoietic progenitor cells and their recruitment into the S-phase of the cell cycle. *British J. Haematol*. 2000; 108: 621-628.
90. Luetkeke NC, Lee DC. Transforming growth factor alfa: expression, regulation and biological action of its integral membrane precursor. *Semin Cancer Biol*. 1990; 1: 265-275.
91. Luther-Wyrsh A, Costello E, Thali M, Buetti. Satable transduction with lentiviral vectors and amplification of immature hematopoietic progenitors from cord blood of preterm human fetuses. *Hum. Gene Ther*. 2001; 12:377-389.
92. Ma X, Husain T, Peng H. Developmente of a murine hematopoietic progenitor complementary DNA microarray using a subtracted complementary DNA library. *Blood*. 2002; 100: 833-844.
93. Margulies EH., Innis JW. eSage: managing and analyzing data generated with Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *Bioinformatics APPLICATIONS NOTE*. 2000; 16: 650-651.
94. Mayol X, Garriga J, Graña X. G1 cyclin/CDK-independent phosphorylation and accumulation of 130 during the transition withE2F4. *Oncogene*. 1996; 13: 237-246.
95. Mayol X, Garriga J, Graña X. Cell Cycle-dependent phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130. *Oncogene*, 1995; 11: 801-808.
96. Medley QG, Kedersha N, O'Brien S. Characterization of CMP-17 a granule membrane protein thay moves to the plasma membrane of natural killer cells following target cell recognition. *Proc natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 685-689.

97. Meijerink J, Mandigers C, Locht van de L. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative Real-Time PCR. *JMD*. 2001; 3: 55-61.
98. Meister B, Totsch M, Mayr A, Widschwendter M. Identification of CD 34+ cord blood cells and their subpopulations in preterm and term neonates using three-color flow cytometry. *Biol Neonate*. 1994; 66: 272-9.
99. Miller RE, Fayer JD, Mohammad SF. Reduced CTLA-4 protein and messenger RNA expression in umbilical cord blood T lymphocytes. *Exp Hematol*. 2002; 30: 738-744.
100. McCune J M, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD. The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*. 1988; 241: 1632-1639.
101. Milosevits J, Pocsik E, Schimidt B, Rem6nyi P. Immunophenotypic and functional characteristics of haematopoietic cells from human cord blood. *Scand J Immunol*. 1995; 42: 493-500.
102. Moritz T, Keller D C, Williams D A. Human cord blood cells as targets for gene transfer; Potential use in genetic therapies of severe combined immunodeficiency disease. *Journal of Experimental Medicine*. 1993; 178: 529-536.
103. Naik MU, Vuppalandhi D, Naik UP. Essential role of junctional adhesion molecule-1 in basic fibroblast growth factor-induced endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 2165-2171.
104. Newsome PH; Johannessen I; Boyle S. human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocyte in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroent*. 2003; 124: 1891-1990.

105. Ng YY, VAN Kessel B, Lokhorst HM. Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *J Leukoc Biol.* 2002; 75: 314-323.
106. Ogawa M, Fraser S, Fujimoto T, Endoh M. Origin of hematopoietic progenitors during embryogenesis. 2001; 20: 21-44.
107. Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K, Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 1925-1933.
108. Okada S, Li Q, Whitin JC. Intracellular mediators of granulysin-induced cell death. *J Immunol.* 2003; 175: 2556-2562.
109. Ostermann G, Fraemhs L, Baltus, T. Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflame on atherosclerotic endothelium:inhibition by soluble JAM-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 729-735.
110. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science.* 1997; 276: 11-113.
111. Park IK, He Y, Lin F. Differential gene expression, profiling of adult murine hematopoietic stem cells. *Blood.* 2002; 99: 488-498.
112. Pfaffi M. a new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic acid research.* 2001; 2002-2007.
113. Piacibelo W, Sanavio F, Severino A, Bergandi D. Extensive Amplification and Self-Renewal of Human Primitive Hematopoietic Stem Cells From Cord Blood. *Blood.* 1997; 89: 2644-2653.
114. Pierelli L, Scambia G, Bonanno G. CD 34+/CD 105+ cells are enriched in primitive circulating progenitors residing in the G0 phase of the cell cycle and contain all bone marrow and cord blood CD34+/CD38 low/- precursors. *Br J Haematol.* 2000; 108: 630-620.

115. Phillips RL, Ernst RE., Brunk B. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science*. 2000; 288: 1634-1640.
116. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 207: 86-90.
117. Rabian-Berzog C, Lesage S, Gluckman E. Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood. *Bone Marrow Transplantation* 1992; 9: 64-67.
118. Ramalho-Santos M, Yoon S, Marsuzaki Y. "Stemness" transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science (Wash. DC)*. 2002; 298: 597-600.
119. Ramirez M., Segovia JC., Benet I. Ex vivo expansion of cord blood (UCB) CD34+ cells alters the expression and function of alpha 4beta1 and alpha 5 beta1 integrins. *Br J Hematol*. 2001; 115: 213-221.
120. Ring HZ, Vameghi-Meyers V, Wang W. Five SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin (SMARC) genes are dispersed in the human genome. *Genomics*. 1998; 51: 140-143.
121. Rozenfeld-Granot G, Toren A, Amariglio N. MAP kinase activation by mu opioid receptor in cord blood CD 34+ CD 38- cells. *Exp Hematol*. 2002; 80: 437-480.
122. Shafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*. 1996; 21; 134-140.
123. Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the SKP1-SKP2 complexes. *Nature*. 2000; 408: 381-386.
124. Smith EJ, Leone G, DrGregori J. The accumulation of an E2F4-p130 transcriptional repressor distinguishes a G 0 cell state from a G 1 cell state. *Molecular and Cell Biology*. 1996; 6: 6965-6976.
125. Socié G, Gluckman E, Carosella E, Brossard Y. Search for maternal cells in human umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of two mini satellite sequences. *Blood*. 1994; 83: 340-344.

126. Steidl U, Kronenwerr R, Rohr UP. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood*. 2002; 99: 2037-2044.
127. Sobocka MB, Sobocki T, Banerjee P. Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation. *Blood*. 2000; 95: 2600-2609.
128. Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet*. 2000; 1: 199-207.
129. Suntherland D R, Keating A, Nayar R, Anania S. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Experimental Hematology*. 1994; 22: 1003-1010.
130. Takahashi-Suzuki, I, Kitagawa M, Saijo M. The interactions of E2F4 with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of p RB and p 107 by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene*. 1995; 10: 1691-1698.
131. Thangue NBL, Thimmappaya B, Rigby PWJ. The embryonal carcinoma stem cell Ela-like activity involves a differentiation-regulated transcription factor *Nucleic Acid Reserch*. 1990; 18: 2929-2938.
132. Traycoff C Ma, Abboud M R, Laver J, Brandt J. Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 1994; 22: 215-222.
133. Traycoff C Mb, Abboud M R, Laver J. Rapid exit from G 0 /G 1 Phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD3 + cells an enhanced ex vivo expansion potential. *Exp Hematol*. 1994; 22: 1264-1272.
134. Tersikh AV, Easterday MC, Li L. From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programe. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 7934-7939.

135. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS. Embryonic stem cell lines deived from blastocysts. Science. 1998; 282: 1145-1147.
136. Tsunoda Y, Kato Y. Recents pprogress and problems in animal cloning. Differentiation. 2002; 69: 158-161.
137. Turman MA, Yabe T, McsSherry C. Characterization of a novel gene(NKG7) on human chromosome 19, that is expressed in natural killer cells and T cells. Hum Immumol. 36: 34-40.1993
138. Turner C W, Luzins J, Hutcheson C - A modified harvest technique for cord blood hematopoietic stem cells. Bone Marrow Transplantation. 1992; 10: 89-91.
139. Tuteja R, Tuteja N. Serial Analysis of Gene Expression: Applications in Human Studies. J Biomed Biotechnol. 2004, 2004: 113-120.
140. Urashima M, Sakuma M, Teramoto S. Gene expression profiles of peripheral and cord blood mononuclear cells altered by thymic stromal lymphopietin. Pediatr Res. 2005; 57: 563-569.
141. Ussar S, Voss T. MEK1 and MEK2 different regulators of the G1/S transition. J Biol Chem. 2004; 279: 43861-43869.
142. Velculescu V.E., Zhang L, Vogelstein B. Serial analysis of gene expression. Science. 1995; 270: 484-487.
143. Vogel G. Stem cells. "Stemness" genes still elusive. ". Science (Wash. DC). 2003; 302: 371.
144. Vogl T, Ludwig S, Goebele M. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. Blood. 2004; 104: 4260-4268.
145. Volgestein B, Alberts B, Shine K. Genetics. Please don' t call it cloning! Science. 2002; 295: 1237.

146. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood*. 1994; 83: 2489- 2497.
147. Wagner W, Ansorge A, Wirkner U. Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. *Blood*. 2004; 104: 675-86.
148. Wagner AJ, Weissman, IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004; 116:639-648.
149. Wang J C Y, Doedens M, Dick J E. Primitive Human Hematopoietic Cells Are Enriched in Cord Blood Compared With Adult Bone Marrow or Mobilized Peripheral Blood as Measured by the Quantitative In Vivo SCID-Repopulating Cell Assay. *Blood*. 1997; 89: 3919- 3924.
150. Wang, X. Cell fusion is the principal source of bone marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003; 422: 897-901.
151. Willenbring H, Bailey AS, Foster M. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nature Medicine*. 2004; 10: 744-748.
152. Williams C D, Linch D C, Watts M J. Characterization of cell cycle status and E2F4 complexes in mobilized CD34 + cells before and after cytokine stimulation. *Blood*. 1997; 90: 194-203.
153. Wodicka L, Dong H, Mittman M. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotech*. 1997; 15: 1359-1367.
154. Wright-Kanuth MS, Smith LA. Hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Lab Sci*. 2001; 14: 112-117.
155. Yamaguchi B M, Ikebuchi K, Hirayama F. Different Adhesive Characteristics and VLA-4 Expression of CD34+ Progenitors in G0/G1 Versus S+G2/M Phases of the Cell Cycle. *Blood*. 1998; 92: 842-848.

156. Zheng Y, Watanabe N, Nagamura-Inoue T. Ex vivo manipulation of cord blood of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells with recombinant human stem cell factor can up-regulate levels of homing-essential molecules to increase their trans migratory potential. *Exp Hematol.* 2003; 31:1237-1246.
157. Zhong JF, Zhao Y, Sutton S. Gene expression profile of murine long-term reconstituting vs x short-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 2448-53.
158. Zhou G, Chen J, Lee S. The pattern of gene expression in CD 34(+) stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 13966-13971.
159. Zhou L, Li X, Curch RL. The mouse lens fiber-cell intrinsic membrane protein MP19 gene (Lim2) and granule membrane protein GMP-17 gene (NKG7): Isolation and sequence analysis of two neighboring genes. *Mol Vis.* 2001; 7: 79-88.
160. Zheng CF, Guan KL. Cloning and characterization, of two distinct human extra cellular signal-regulated linase activated kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem.* 1993, 268; 11435-11439.