

**Estudo da proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoéticas provenientes de sangue de cordão umbilical na presença e ausência de mitógenos**

**Ana Carolina Souza Ramos de Carvalho**

**Estudo da proliferação e diferenciação de células-  
tronco hematopoéticas provenientes de sangue de  
cordão umbilical na presença e ausência de  
mitógenos**

**Ana Carolina Souza Ramos de Carvalho**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto  
Butantan/IPT, para a obtenção do Título  
de Doutor em Biotecnologia.**

**Área de concentração: Biotecnologia**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho**

**São Paulo**

**2008**

**Ao meu filho Rodrigo, que desde já traz  
alegrias e esperanças, confiança e força, paz  
e harmonia, principalmente em meu coração.**

**Você é o AMOR da minha vida.**

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho, pela orientação, comprometimento e principalmente por acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Oswaldo Keith Okamoto, por sempre duvidar de mim e desta maneira sempre me empurrar para frente.

À Luciana Cavalheiro Marti pelo apoio e amizade, além da realização dos experimentos de citometria de fluxo.

À Tatiana Thais Sibov por toda a ajuda e amizade dentro e fora do laboratório.

À Patrícia Severino, Andréa, Daniela, Daiane, Danielle, Lorena, Marta, Sara e todos aqueles que passaram um dia pelo laboratório e pela equipe de células-tronco.

À toda equipe do banco de sangue e do centro obstétrico pelo material fornecido.

Ao Fernando Lojudice, departamento de Bioquímica do IQ-USP, pelo apoio incondicional.

Aos meus sobrinhos David e André por terem colaborado desde cedo com a pesquisa científica.

E principalmente à todas as mães que doaram os cordões umbilicais dos seus filhos, acreditando no desenvolvimento de pesquisas científicas. E que trouxeram grandes emoções durante o nascimento de seus filhos.

À Pimentinha, pelo companheirismo, diversão e carinho.

À Claudia, pelo caderninho amarelo e momentos de intensa sabedoria.

Aos amigos e amigas que apesar de não entenderem o que faço, são os maiores apoiadores e admiradores. Entre eles, Carol, André, Roberto, Andrezinho, Heavy, Drigues, Pri, Ri Maluf e Márcia.

E principalmente a minha mãe e meu pai, e toda a família ao redor, por terem acreditado em mim e no meu trabalho.

“ You may not have much, but what you got you have a lot.”

anônimo

“One of the critical differences between you and a machine is that a machine is never required to function until after it is built. Every animal has to function as it builds itself.”

Scott F. Gilbert

## Resumo

de Carvalho ACSR. Estudo da proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoéticas provenientes de sangue de cordão umbilical na presença e ausência de mitógenos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Células-tronco hematopoéticas (CTH) de sangue de cordão umbilical (SCU) possuem grande potencial em terapia celular. Mesmo sendo bem caracterizadas quanto às suas propriedades funcionais e fenotípicas, a regulação da auto-renovação de CTH e os genes envolvidos são pouco conhecidos. Investigou-se através da curva de crescimento, ensaio clonogênico e citometria de fluxo, a expansão e diferenciação de CTH cultivadas sem e com suplementação dos mitógenos estradiol e LiCl. A expressão da subunidade da telomerase teve aumento significativo em todas as condições, bem como a expressão de Nanog e Oct4 relacionados a pluripotência e auto-renovação. Observou-se também a expressão de Nanog, Oct4, Sox2 e FoxD3 em células CD133, células CD3 de sangue periférico e células de colônias hematopoéticas. Concluiu-se que o meio sem suplementação já é suficiente na expansão de CTH, mantendo suas características, relacionadas à proliferação, auto-renovação e pluripotência celular.

Palavras-chave: Células-tronco; Cordão umbilical; Estradiol; Cloreto de lítio; Expressão gênica e Proliferação celular.

## Abstract

de Carvalho ACSR. Proliferation and differentiation study of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood in the presence and absence of mitogens [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Hematopoietic stem cells (HSC) from umbilical cord blood (UCB) have a great potential for hematopoietic reconstitution. Although these stem cells have been well characterized by their functional and fenotipics properties, self-renewal regulation and genes involved are still unknown. Analyses of cell growth, clonogenic assay and flow cytometry revealed the expansion and differentiation of HSC grown in medium with or without supplementation of the mitogens estradiol and LiCl. Expression of the subunit of telomerase increased in all treatments. As well as the expression of Nanog and Oct4, related to plutipotency and self-renewal. Nanog, Oct4, Sox2 and FoxD3 expression was also high in CD133 cells, in CD3 cells from peripheral blood and in clonogenic assay derived cells. Conclusion: medium without the suplementation is sufficient for expansion of HSC, keeping their characteristics, realted to proliferation, self-renewal and pluripotency.

Key words: Stem cells; Cord blood; Estradiol; Lithium chlorite; Gene expression and Cell proliferation.



## Lista de Figuras

Figura 1. Representação ilustrativa da hematopoese, fonte: Department of Health and Human Services.	<b>21</b>
Figura 2. Representação ilustrativa da síntese de DNA telomérico, fonte: Alberts, 2002b.	<b>32</b>
Figura 3. Representação ilustrativa da formação de T-loop e D-loop, fonte: De Lange <i>et al.</i> , 2005.	<b>32</b>
Figura 4. Esquema do telossomo, fonte: Colgin e Reddel, 2004.	<b>34</b>
Figura 5. Células CD34+ em cultivo após 1 semana (A) e 2 semanas (B). Aumento de 100x.	<b>46</b>
Figura 6. Curvas de crescimento de CTH na condição basal (CB) e suplementadas com diferentes concentrações de E2 e LiCl.	<b>47</b>
Figura 7. Ensaio clonogênico de células CD34+ em meio específico Methocult, após 14 dias de cultivo. Em aumento de 100x observa-se 'A' - BFU-E e 'B' - CFU-GEMM. Em aumento de 200x observa-se 'C' - CFU-GM e 'D' - CFU-M.	<b>48</b>
Figura 8. Número de células-tronco/progenitoras funcionais em 2mL, analisado por ensaio clonogênico após 8 e 25 dias em CB, CB+E2 e CB+LiCl em relação ao dia de inoculação.	<b>49</b>
Figura 9. Número de unidades formadoras de colônias formadas nas condições experimentais após 8 dias (A) e 25 dias (B) de tratamento com 10nM E2, 1mM LiCl e CB.	<b>50</b>
Figura 10. Gráfico em ponto (Dot-plot), seleção das células por tamanho e granulidade. As células selecionadas se encontram dentro de P1.	<b>51</b>
Figura 11. Gráfico em ponto (Dot-plot), no qual se visualiza o controle isotópico (IgG1 PE-A e APC) e a seleção das células marcadas com CD45.	<b>52</b>
Figura 12. Gráfico em ponto (Dot-plot), no qual se visualiza o controle isotópico (IgG1 FITC e APC) e a análise dos marcadores CD34+ (Q1-2), CD133+ (Q4-2) e duplo marcação (Q2-2).	<b>53</b>

Figura 13. Número de células CD133+/CD34+, CD133+ e CD34+ em CB e tratadas com E2 ou LiCl após 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) em relação ao dia de inoculação, por citometria de fluxo.	<b>54</b>
Figura 14. Número de células CD45+, CD33+ e CD16/56 em CB e tratadas com E2 ou LiCl após 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) em relação ao dia de inoculação, por citometria de fluxo.	<b>55</b>
Figura 15. Número de células CD14+ e CD3+ em CB e tratadas com E2 ou LiCl após 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) em relação ao dia de inoculação, por citometria de fluxo.	<b>56</b>
Figura 16. Número de células CXCR4 e CD11a em CB e tratadas com E2 ou LiCl após 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) em relação ao dia de inoculação, por citometria de fluxo.	<b>57</b>
Figura 17. Gráfico em ponto (Dot-plot), no qual se a análise dos marcadores CD11a, CD133 e duplo marcação. Sendo A, 7 dias; B, 14 dias e C 21 dias de cultivo.	<b>58</b>
Figura 18. Expressão relativa de genes relacionados codificantes ao telossomo e enzimas teloméricas após cultivo em CB, CB + 10nM E2 e CB + 1mM LiCl, em relação ao dia de inoculação. Sendo A, 7 e B 14 dias de cultivo.	<b>60</b>
Figura 19. Expressão relativa dos genes relacionados pluripotência nos tratamentos com 10nM E2 e 1mM LiCl e em CB, após 1 semana (A) e 2 semanas (B) e relação ao dia de inoculação.	<b>61</b>
Figura 20. Expressão relativa dos genes de marcadores de superfície hematopoéticos em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e CADC.	<b>63</b>
Figura 21. Expressão relativa da subunidade da enzima telomerase, TERT, em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e CADC.	<b>64</b>
Figura 22. Expressão relativa de CXCR4 em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e CADC.	<b>65</b>
Figura 23. Expressão relativa de Nanog e Oct4 em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e CADC.	<b>66</b>

Figura 24. Expressão relativa de Sox2 e FoxD3 em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e CADC.	<b>67</b>
--	-----------

### Lista de Siglas e Abreviaturas

APC	- Aloficocianina
BSA	- Albumina do soro bovino
BSCUP	- Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
BFU-E	- Unidade formadora de blastos para eritrócito
CADC	- Células derivadas de ensaio clonogênico
CPDA-1	- Citrato, fosfato, dextrose, adenina - 1
CB	- Condição basal
CD	- <i>Cluster of differentiation</i>
CD3	- Antígeno de superfície de célula T
CD11a	- Antígeno de superfície de adesão, integrina
CD14	- Antígeno de superfície da linhagem monocítica
CD15	- Antígeno de superfície de célula mielóide
CD16/56	- Antígeno de superfície de <i>natural killer</i> (NK)
CD33	- Antígeno de superfície de célula progenitora mielóide
CD34	- Antígeno de superfície de célula progenitora hematopoética
CD45	- Antígeno de superfície de leucócito
CD133	- Antígeno de superfície de célula progenitora hematopoética
cDNA	- DNA complementar
CFU-GEMM	- Unidade formadora de colônia para granulócito, eritrócito, macrófago e megacariócito
CFU-GM	- Unidade formadora de colônia para granulócito e macrófago
CFU-M	- Unidade formadora de colônia para macrófago
c-Kit	- Receptor do fator de crescimento de células-tronco
c-Myc	- Oncogene Myc
CMV	- Citomegalovírus
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
CTA	- Célula-tronco adulta
CTE	- Célula-tronco embrionária
CTH	- Célula-tronco hematopoética
CXCR4	- Receptor para SDF1
DECH	- Doença do enxerto contra hospedeiro
D-loop	- Dobramento do telômero ao DNA
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
E2	- 17 $\beta$ -estradiol
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ER $\alpha$	- Receptor de estrógeno alfa
ER $\beta$	- Receptor de estrógeno beta
FACS	- Classificador de células por ativação de fluorescência
FcR	- Receptor da porção Fc

FIt-3	- Tirosina quinase de célula-tronco
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
FoxD3	- <i>Forkhead Box D3</i>
GAPDH	- Gliceroaldeido-3-fosfato desidrogenase
G-CSF	- Fator de crescimento de colônia granulocitaria
GSK-3 $\beta$	- 3 $\beta$ – quinase – glicogênio sintase ( <i>glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i> )
HIAE	- Hospital Israelita Albert Einstein
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HLA	- Antígeno leucocitário humano
HLA-DP	- Antígeno leucocitário humano DP
HLA-DQ	- Antígeno leucocitário humano DQ
HLA-DR	- Antígeno leucocitário humano DR
IL-3	- Interleucina 3
IL-6	- Interleucina 6
Inca	- Instituto Nacional de Câncer
LEF	- Fator de aumento de ligação linfocitária
LiCl	- Cloreto de lítio
MHC	- Complex maior de histocompatibilidade
MO	- Medula óssea
MSC	- Célula-tronco mesenquimal
Nanog	- Fator de transcrição Nanog
NK	- <i>Natural killer</i>
OCT4	- Fator de transcrição Oct4
PBS	- Solução tampão fosfato
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PE	- Ficoeritrina
PE-Cy7	- Ficoeritrina ligada com cianina 7
POT1	- Proteção dos telômeros1
RNA	- Ácido ribonucleico
RNAm	- RNA mensageiro
RPMI	- Meio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SCF	- Fator de célula-tronco
SCU	- Sangue de cordão umbilical
SDF1	- Fator 1 derivado de célula estromal
Sox2	- Fator de transcrição Sox2
SP	- Sangue Periférico
TCF	- Fator de célula T
TERT	- Subunidade catalítica da transcriptase reversa da enzima telomerase
T-loop	- Dobramento do telômero a ele próprio
TMO	- Transplante de medula óssea
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa
TNKS	- Enzima tankyrase 1

TNKS2	- Enzima tankyrase 2
TR	- RNA componente da telomerase
TRF1	- Fator de ligação repetitiva telomérica 1
TRF2	- Fator de ligação repetitiva telomérica 2
WNT	- Gene <i>Wingless-type MMTV</i>

## Sumário

<b>1 Introdução</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Células-tronco: propriedades</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Células-tronco hematopoéticas</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1 Sangue de cordão umbilical</b>	<b>23</b>
<b>1.3 Fatores envolvidos na proliferação celular</b>	<b>26</b>
<b>1.3.1 Efeitos mitogênicos de estrógeno</b>	<b>27</b>
<b>1.3.2 Efeitos mitogênicos do cloreto de lítio</b>	<b>29</b>
<b>1.3.3 Telômeros e proliferação celular</b>	<b>31</b>
<b>2 Justificativa e relevância</b>	<b>36</b>
<b>3 Objetivos</b>	<b>37</b>
<b>4 Materiais e Métodos</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Coleta e isolamento de células-tronco hematopoéticas provenientes de sangue de cordão umbilical (SCU)</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Estudo de proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoéticas de SCU</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Análise por citometria de fluxo de células-tronco hematopoéticas de SCU</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Análise em diferentes condições de cultivo da expressão gênica relacionada à manutenção dos telômeros e pluripotência, pela técnica de PCR quantitativo em Tempo Real</b>	<b>42</b>
<b>4.5 Estudo detalhado de pluripotência, caracterização e migração celular de células CD133+ de SCU, através da análise da expressão gênica, utilizando a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real</b>	<b>44</b>

<b>5 Resultados</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Proliferação de células-tronco hematopoéticas de SCU</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Análise por citometria de fluxo de células-tronco hematopoéticas de SCU, tratadas com E2, LiCl e CB</b>	<b>51</b>
<b>5.3 Análise de genes envolvidos na manutenção dos telômeros e pluripotência, após cultivo em CB, CB+E2 e CB+LiCl</b>	<b>59</b>
<b>5.4 Estudo detalhado de pluripotência, caracterização e migração celular de células CD133+ de SCU, através da análise da expressão gênica, utilizando a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real</b>	<b>62</b>
<b>6 Discussão</b>	<b>68</b>
<b>7 Conclusão</b>	<b>73</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>74</b>
<b>Anexos</b>	<b>84</b>



## 1 Introdução

### 1.1 Células-tronco: propriedades

Células-tronco (CT) são células indiferenciadas que através de estímulos específicos podem originar células diferenciadas, de vários tipos celulares de diversos tecidos. As células-tronco têm como principal característica a capacidade de se auto-renovar, ou seja, de dar origem a células idênticas a elas mesmas (NIH, 2002). Essas células também se distinguem pela sua capacidade proliferativa e expressão de marcadores específicos que serão discutidos neste trabalho.

Durante o desenvolvimento embrionário essas células estão presentes no epiblasto, também conhecido como massa celular interna, durante o estágio de blastocisto. Esta fase corresponde ao quinto dia pós-fecundação, onde ainda não ocorreu a implantação no útero (Gilbert, 2003a). Estas células são chamadas células-tronco embrionárias (CTE) e foram isoladas pela primeira vez em 1998. CTE são capazes de originar células das três camadas germinativas; endoderme, mesoderme e ectoderme, assim sendo denominadas pluripotentes (Seydoux *et al.*, 2006). Essas células já foram descritas como capazes de originar células do trofoblasto, mediante estímulo (Xu *et al.*, 2002). Durante o desenvolvimento embrionário, o trofoblasto é que irá gerar estruturas extra-embrionárias, tais como placenta, cordão umbilical e saco amniótico (Gilbert, 2003b).

As CTE mantêm o seu estado de pluripotência através da expressão de fatores de transcrição essenciais tais como, Oct4 e Nanog. Esses fatores são capazes de ativar genes relacionados à auto-renovação e reprimir genes que levam a diferenciação celular (Sun *et al.*, 2006), estando à expressão diretamente relacionada à células pluripotentes. A expressão destes genes é reprimida durante a diferenciação celular (Avery *et al.*, 2006).

Estas propriedades têm instigado pesquisas sobre o uso de CTE em estudos de terapia celular, como fonte de células sadias para reparo tecidual. Mas a aplicação terapêutica das CTE ainda enfrenta grandes obstáculos.

Como a questão de biossegurança na utilização destas células, já que as CTE têm propensão a formar teratomas, o que foi verificado em transplantes experimentais (Reubinoff *et al.*, 2000). Esses tumores podem ser formados de diversos tipos celulares, já que são derivados de células embrionárias. Podendo conter estruturas complexas; como rins com seus corpúsculos, túbulos e vasos. Além de folículos capilares, gânglios neurais, musculatura esquelética e células primitivas. (Przyborski, 2005).

Outro problema crítico está na esfera ética e religiosa, onde questões sobre a manipulação de embriões humanos têm sido levantadas, tais como; quando é iniciada a vida humana, direitos humanos sobre a própria vida, fins lucrativos através de venda de embriões, entre outros (Vaticano). Essa questão moral do uso de CTE fez com que países como os Estados Unidos da América suspendesse investimentos financeiros federais para grupos de pesquisa que trabalham com este tipo celular. Além de gerar polêmica e controvérsias perante a população.

Há ainda o problema de rejeição imunológica, quando se trata de transplante de células não autólogas (Drukker *et al.*, 2004). O processo de rejeição por transplante de órgãos é causado pelo sistema imunológico. As principais moléculas envolvidas nesse processo são os antígenos do complexo de histocompatibilidade maior (MHC). Sendo essas divididas em duas grandes classes, MHC de classe I e MHC de classe II, os quais são traduzidos pelos genes de antígenos de histocompatibilidade leucocitários humanos (HLA). Os genes de HLA possuem diferentes alelos, sendo HLA-A, B e C os principais de MHC-I, e HLA-DR, DQ e DP de MHC-II. A compatibilidade destes genes, ou de uma parte deles, entre doador e receptor, é essencial para não haver rejeição do órgão doado pelo sistema imunológico do receptor (Sharp *et al.*, 2000). Moléculas do MHC têm expressão reduzida em células-tronco embrionárias, mas aumentam sua expressão depois destas células se diferenciarem (Swijnenburg *et al.*, 2005), desta forma, limitando as aplicações terapêuticas de CTE.

As CTE cultivadas por longo período demonstraram instabilidade genômica, com alterações genéticas e epigenéticas (Maitra *et al.*, 2005). Essas alterações

podem ser geradas por diferentes eventos, tais como mutações e perdas de heterozigosidade, o que poderia limitar suas aplicações terapêuticas (Larson *et al.*, 2006).

Atualmente, estudos com CTE têm-se limitado à pesquisa básica, na identificação de mecanismos envolvidos na proliferação e diferenciação de células-tronco. Já as células-tronco adultas (CTA) possuem aplicações clínicas bem fundamentadas. E estudos sobre suas características têm sido ampliados.

As células-tronco adultas (CTA) estão presentes em pequenas quantidades em diversos tecidos maduros, onde estão quiescentes, ou seja, não estão em processo de divisão celular. CTA são ativadas durante o processo de reposição celular de tecidos que sofrem traumas, doenças e degeneração. Desta forma sendo responsáveis por manter a homeostase biológica do organismo, ou seja, conservando a integridade dos tecidos em que se encontram (Horwitz, 2003).

As CTA já foram encontrados em vários tipos de tecidos, tais como hematopoético, muscular, nervoso e trato gastrintestinal. Originando células progenitoras e precursoras dos diversos tipos celulares encontrados nos tecidos de origem. As CTA e suas células progenitoras são morfologicamente semelhantes, o que dificulta sua identificação. Portanto marcadores de superfície específicos têm sido identificados a fim de melhorar a caracterização das células-tronco adultas (Gzyz *et al.*, 2003; Wognum *et al.*, 2003).

As características de CTA são semelhantes às de CTE, pois são capazes de se auto-renovar e de dar origem a células diferenciadas de tecidos específicos. Mas sua capacidade proliferativa e de diferenciação é limitada, tornando sua aplicação restrita. Por esta razão, CTA é conhecida como multipotente, não sendo capaz de se diferenciar em qualquer tipo de célula que se encontra no organismo.

## 1.2 Células-tronco hematopoéticas

A célula-tronco hematopoética (CTH) é a mais bem caracterizada entre as células-tronco adultas, sendo conhecida há mais de 50 anos. O primeiro transplante bem sucedido de CTH de medula óssea (MO), em humanos, foi realizado em 1959 pela equipe liderada por Thomas E.D. O transplante foi realizado no Hospital Mary Imogene Basset, entre gêmeos idênticos, demonstrando que as células do doador eram capazes de re-popular a MO do receptor e produzir células sanguíneas (Thomas *et al.*, 1959). Deste então o transplante de medula óssea (TMO) é considerado como um dos maiores avanços em tratamentos contra o câncer e outras doenças sanguíneas.

Em termos clínicos, CTH são utilizadas no tratamento de leucemias, linfomas, anemia aplástica e doenças hereditárias do sangue, tais como talassemia e anemia falciforme, por meio de transplantes de medula óssea autólogos ou alogênicos (Locatelli *et al.*, 2003).

As CTH são capazes de se diferenciar em todos os tipos de células sanguíneas, sendo responsáveis pela manutenção e proteção do organismo. Este processo é conhecido como hematopoese, onde *haima* significa sangue e *poiesis* fazer. A hematopoese se inicia nas CTH, que originam a células progenitoras e a novas células-tronco hematopoéticas, pelo sistema de auto-renovação.

Existem dois tipos principais de células progenitoras no sistema hematopoético, as células progenitoras mielóides e as células progenitoras linfóides. Cada uma destas células irá originar tipos específicos de células precursoras. Sendo que, as mielóides originam principalmente as células precursoras para as linhagens mielóide, eritróide, megacariocítica e monocítica. Enquanto as linfóides originam principalmente as células precursoras de linfócitos (Figura 1).

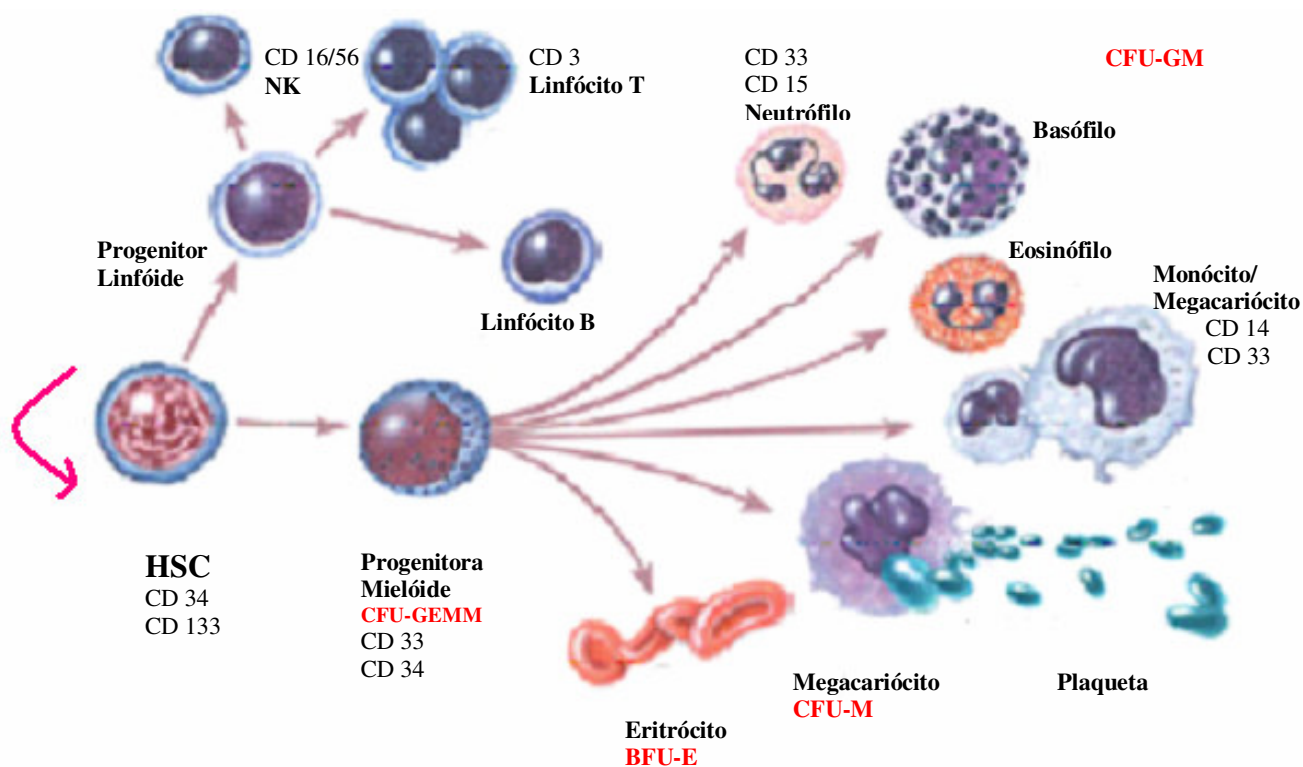


Figura 1. Representação ilustrativa da hematopoese, fonte: Department of Health and Human Services.

Cada tipo celular expressa um marcador de superfície específico, que são conhecidos como CD, *cluster designation* ou *cluster of differentiation*. Essa denominação foi inicialmente padronizada a fim de caracterizar os diversos anticorpos monoclonais contra antígenos específicos leucocitários. Mas hoje em dia, essa denominação, também é utilizada na caracterização de diversos tipos celulares (Alberts, 2002d). Como as CTH são morfologicamente semelhantes aos linfócitos e a população hematopoética é muito heterogênea, a utilização de marcadores de superfície é essencial no isolamento e caracterização deste tipo celular (Baum *et al.*, 1992). A expressão de CD34 e/ou CD133 na superfície das células permite a identificação de CTH de MO, sangue periférico (SP), sangue de cordão umbilical (SCU) e fígado fetal.

Estudos comparativos demonstram que o marcador CD133 é expresso em células mais primitivas que células CD34+, e ainda é hipo-expresso durante o processo de diferenciação celular (Engelhardt *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007). Sendo a expressão de CD133 presente na grande maioria das células CD34+, mas também na população mais primitiva de células CD34- (Gallancher *et al.*, 2000; Handgretinger *et al.*, 2003), desta forma podendo originar tanto células hematopoéticas como outros tipos celulares, tais como células progenitoras endoteliais (Ruzicka *et al.*, 2004).

### 1.2.1 Sangue de Cordão Umbilical

Em 1988, a equipe da Dra Eliane Gluckman realizou o primeiro transplante de SCU em um paciente com anemia Fanconi. Devido ao grande sucesso do uso de CTH de SCU, houve a necessidade de se estabelecer um banco de sangue de cordão umbilical. Desta forma em 1993, foi criado o primeiro banco de SCU, pelo doutor Pablo Rubistein. Desde então vários bancos têm sido criados por todo o mundo e o SCU já é rotineiramente coletado, armazenado e transplantado. Até o momento já foram transplantados mais de 10 mil pacientes utilizando SCU no mundo inteiro (Smythe *et al.*, 2007). É estimado que haja mais de 250.000 unidades de SCU armazenadas em todo o mundo, para uso público (Barker, 2007).

Em 2001 o Instituto Nacional do Câncer (Inca) estabeleceu o Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) facilitando a obtenção e disponibilidade de SCU para os pacientes que necessitam de TMO. Os registros internacionais de doadores de SCU, com grande representação de caucasianos, não refletem a composição genética da população brasileira. Além disso, o custo da busca e obtenção de células nesses registros é muito alto (US\$ 40.000/transplante).

Com base nos dados mencionados anteriormente, em 2004 o Ministério da Saúde estabeleceu uma rede de bancos públicos de sangue de cordão umbilical, o BrasilCord, que engloba o Inca, o Hospital Israelita Albert Einstein e os hemocentros de Ribeirão Preto, Universidade Federal do Paraná e Unicamp. O funcionamento desta rede além de facilitar a obtenção de SCU, baixou os custos de TMO e proporcionou a melhoria de estudos e pesquisas nesta área.

As CTH de SCU possuem muitas vantagens em relação a CTH de MO, tais como menor risco de doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), quando os linfócitos T maduros originados da medula óssea transplantada reagem contra o corpo do receptor. Desta forma levando a uma rejeição severa, podendo resultar na morte do indivíduo (Riddell e Appelbaum, 2007). A imaturidade do sistema

imunológico das CTH de SCU faz com que as células T e NK tenham funções reduzidas, levando a um menor risco de DECH.

Em transplante de MO há necessidades de compatibilidade entre doador e receptor em pelo menos 6 genes do sistema HLA, que irão determinar a aceitação ou rejeição do transplante. Desta forma 50% dos pacientes que necessitam de transplante de MO não encontram doadores compatíveis (Gluckman e Rocha, 2006). Já em transplantes de SCU não há necessidade de compatibilidade completa do sistema HLA (Chao *et al.*, 2004), permitindo uma compatibilidade parcial de 5/6 e até 4/6 genes compatíveis, com menor risco de rejeição (Devine *et al.*, 2003).

O SCU é um material habitualmente descartado, sendo a sua coleta feita após o parto e secção do cordão, não havendo risco nem para a mãe nem para o neonato. É facilmente armazenado e criopreservado, possui reduzido risco de transmissão de infecções, tais como citomegalovírus (CMV) e HIV (Rocha *et al.*, 2000). Além disso, a tipagem de HLA é realizada logo após a coleta. Desta forma todos esses fatores garantem a disponibilidade para transplante imediato, não havendo a necessidade da longa procura por doadores como acontece com MO.

A utilização de SCU é limitada, devido ao baixo volume obtido deste material e conseqüentemente menor número de células linfo-mononucleares quando comparado à medula óssea. Em geral, o número de células é em torno de  $120 \times 10^7$ , sendo quantidade necessária para realização de TMO de 2,5 – 5,0  $\times 10^7$  células por kg de peso do receptor. Desta forma, o transplante de SCU restringe-se a pacientes em torno de 50kg (Schoemans *et al.*, 2006).

A fim de contornar esse limite celular, diversas estratégias têm sido feitas, tais como a utilização de dois cordões distintos (Majhail *et al.*, 2006), combinação de SCU com MO ou sangue periférico mobilizado (SP) (Brunstein *et al.*, 2007).

Experimentos *ex vivo* também têm sido realizados com a finalidade de expandir as CTH, através da utilização de diferentes coquetéis de citocinas, tais como IL-6, G-CSF, eritropoetina, trombopoetina, entre outros (Chivu *et al.*, 2004; Piacibello *et al.*, 1997).



Estudos adicionais são necessários para se desenvolver técnicas de cultivo e diferenciação celular que permitam aprimorar a expansão e sobrevivência de CTH *in vitro*, tornando a aplicação terapêutica destas células mais viável e abrangente.

### 1.3 Fatores envolvidos na proliferação de celular

Nos processos de proliferação celular, fatores de crescimento e citocinas são liberados pelas próprias células em divisão, estimulando a expansão e crescimento celular. Mas muitas vezes esses fatores não são suficientes, havendo a necessidade de sinais extracelulares, conhecidos como mitógenos (Alberts, 2002a). Esses fatores não estimulam somente a proliferação, mas também afetam a diferenciação, migração e sobrevivência celular (Okayama e Kawakami, 2006).

Fatores mitogênicos têm sido identificados, caracterizados e utilizados em culturas celulares diversas. Permitindo o cultivo e expansão de células com finalidade experimental e terapêutica. Dentre os mitógenos mais conhecidos encontra-se o hormônio 17- $\beta$ -estradiol (Kim *et al.*, 2005) que está envolvido no crescimento celular logo a partir do desenvolvimento embrionário e por toda a vida adulta de um indivíduo. O cloreto de lítio também é conhecido pela sua função mitogênica principalmente em células nervosas (Sjoholm *et al.*, 1992).

Durante a proliferação celular é de grande importância manter a estabilidade cromossômica, mantendo as células fidedignas à sua origem. Desta forma a manutenção dos telômeros é de grande importância durante a proliferação celular, já que seqüências teloméricas são perdidas ao longo de sucessivas replicações do DNA, levando ao comprometimento da integridade cromossômica e morte celular (Yui e Landsdorp, 1998). Células com alto grau proliferativo são capazes de manter a estabilidade dos telômeros e por conseqüência a sobrevivência celular, o que não acontece em células diferenciadas, as quais possuem capacidade proliferativa reduzida (Lou e Chen, 2006). O conhecimento dos mecanismos envolvidos na manutenção dos telômeros é fundamental para o melhor entendimento de proliferação e diferenciação celular.

### 1.3.1 Efeitos mitogênicos de estrógenos

Estrógenos (E2) são hormônios esteróides, sendo caracterizados como lipofílicos, portanto facilmente difundidos pela membrana celular. Sua ação em tecidos depende de receptores específicos, que por sua vez são intracelulares. Uma vez ativados, os receptores ER $\alpha$  e/ou ER $\beta$  induzem uma série de reações que causam efeitos mitogênicos em diversos tipos celulares (Herynk e Fuqua, 2007). Este mitógeno também atua na neovascularização, induzindo a proliferação e migração de células endoteliais (Losordo, *et al.*, 2001). E2 é um hormônio regulador do crescimento, da diferenciação e da função de diversos tecidos, como o sistema reprodutor feminino e masculino, sistema cardiovascular e esquelético (Hall *et al.*, 2001).

Durante o desenvolvimento embrionário, o estrógeno está envolvido na proliferação e maturação das células dos órgãos reprodutores femininos e masculinos. Nos organismos adultos este hormônio exerce um papel fundamental na fertilidade masculina e feminina (Gilbert, 2003c).

Seu efeito mitogênico é conhecido no epitélio mamário, alterando a expressão de genes envolvidos no ciclo celular, desta forma tendo um importante papel na tumorigênese (Moggs *et al.*, 2005). Essa ação proliferativa também ocorre no câncer de ovário (Seeger *et al.*, 2005).

No sistema nervoso central, E2 promove a sobrevivência celular, previne lesão nos axônios e dendritos, além de promover a plasticidade sináptica (Garcia-Segura, 2001).

Em monoblastos, o tratamento com estrógeno impede a ocorrência de apoptose provocada pela ação do TNF $\alpha$  (Vegeto *et al.*, 1999).

A deficiência deste hormônio causa diferenciação de células-tronco e progenitoras hematopoéticas da medula óssea em linfócitos T e osteoblastos (Masuzawa *et al.*, 1994; Jilka *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 2000), além de aumentar a população de megacariócitos e eritrócitos (Perry *et al.*, 2000). Já foi identificada a presença de receptores de estrógeno em diferentes células hematopoéticas (Maret *et al.*, 2003).

Alguns estudos mostram que a ação dos estrógenos possui a capacidade de aumentar a expressão de RNAm da subunidade TERT da telomerase em hepatócitos, células progenitoras endoteliais e células tumorais, levando à proliferação celular ilimitada (Kyo *et al.*, 1999; Bouchal *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004; Imanishi *et al.*, 2005).

Os efeitos de estrógenos na proliferação e sobrevivência celular tornam este hormônio um alvo promissor para o estudo da expansão de células-tronco potencializando sua aplicação terapêutica.

### 1.3.2 Efeitos mitogênicos do cloreto de lítio

Cloreto de lítio (LiCl) é uma droga usada clinicamente no tratamento de distúrbios psiquiátricos, como transtorno bipolar tipo 1, sendo caracterizado como antidepressivo, regulador de humor e antimaníaco (Williams *et al.*, 2004).

A partir de 1950, ficou conhecido o efeito mitogênico de LiCl em células hematopoéticas (Radomski *et al.*, 1950). Desde então este sal têm sido aplicado na terapia de distúrbios hematopoéticos, já que este mitógeno aumentou a produção de unidades formadoras de colônias e células progenitoras hematopoéticas (McGrath *et al.*, 1987).

Em pacientes tratados com LiCl foi observado um aumento de células CD34+ circulantes (Ballin *et al.*, 1998). Este mitógeno também pode ser usado no tratamento de leucopenia crônica em pacientes que passaram por quimioterapia ou radioterapia (Hager *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007).

Células mesenquimais da medula óssea também tiveram expansão na presença de LiCl (Neth *et al.*, 2006), assim como células endoteliais da veia do cordão umbilical (Cheng *et al.*, 2003).

O efeito mitogênico do LiCl, deve-se a sua ação sobre a via de sinalização da WNT, que consiste basicamente na ativação da proteína *Dishevelled*, a qual inibe a ação de GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ), que leva ao acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma e núcleo (Rao *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2006).

No núcleo celular, a  $\beta$ -catenina interage com fatores de transcrição da família LEF/TCF (*lymphocyte enhancer binding factor/T cell factor*) (Yamamoto *et al.*, 1998; Fagotto *et al.*, 1999), ativando a expressão de genes alvos, tais como Notch1 e HoxB4, os quais estão relacionados à auto-renovação de células-tronco (Povelones e Nusse, 2002; Kleber e Sommer, 2004; Reya *et al.*, 2003; Valenta *et al.*, 2003).

A via de sinalização da WNT exerce um importante papel na carcinogênese e embriogênese. Moléculas envolvidas nesta via têm sido estudadas como potenciais alvos no diagnóstico e tratamento de câncer, assim como na regeneração de tecidos (Das, 2000; Derksen *et al.*, 2004). Além disso, estudos

recentes revelam que a proteína Wnt é capaz de estimular diretamente a multiplicação de células-tronco hematopoéticas *in vitro* (Brandon *et al.*, 2000; Willert *et al.*, 2002; Murdoch *et al.*, 2003), além de ser responsável pelo processo de auto-renovação de CTH normais e tumorais (Zhao *et al.*, 2007).

Por essas razões, é importante estudar o efeito do LiCl na proliferação de células tronco hematopoéticas.

### 1.3.3 Telômeros e proliferação celular

A maioria das células adultas é substituída constantemente. A capacidade proliferativa de células normais e malignas está intimamente associada à manutenção da extensão dos seus cromossomos (Sharpless *et al.*, 2004). Os telômeros correspondem à porção terminal dos cromossomos, onde se forma um braço na região 3', conhecido como *G-overhang*, fazendo essa região ser maior que a 5'. Os telômeros são constituídos de uma seqüência de DNA não codificante (TTAGGG) repetida em *tandem*, que protege os cromossomos contra degradação (Ulaner *et al.*, 1998).

Seqüências teloméricas são perdidas ao longo das sucessivas replicações de DNA. O encurtamento dos telômeros causa instabilidade cromossômica, disfunção celular, limitação de proliferação e apoptose, estando associado ao processo de envelhecimento (Misiti *et al.*, 2000; Saldanha *et al.*, 2003). Desta forma, a manutenção dos telômeros está intimamente relacionada ao potencial proliferativo da célula (Ahmed e Tollefsbol, 2003).

A telomerase, uma transcriptase reversa, é capaz de reconhecer a porção 3' final dos cromossomos e alongar os telômeros, sintetizando uma nova seqüência de DNA telomérico. A telomerase é um complexo ribonucléico composto principalmente de RNA molde (TR), que é complementar ao DNA telomérico e a subunidade catalítica da telomerase (TERT), que são responsáveis pela extensão dos telômeros (Alberts, 2002b).

Apenas os componentes TERT e TR são suficientes para garantir a atividade da enzima telomerase (Nakayama *et al.*, 1998; Armstrong *et al.*, 2000).

A DNA polimerase é responsável pela síntese da fita complementar do DNA, usando o DNA telomérico recém formado como molde. Na Figura 2 é mostrado esse mecanismo de reparo.

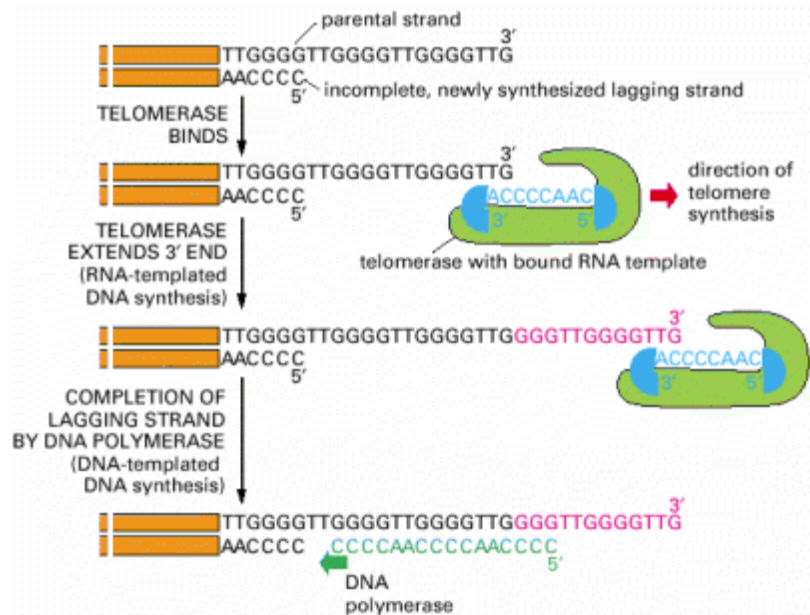


Figura 2. Representação ilustrativa da síntese de DNA telomérico, fonte: Alberts, 2002b.

Os telômeros se dobras e formam uma estrutura conhecida como *T-loop*, esse arranjo deve-se a invasão da extremidade 3' na região dupla de DNA telomérico. Após esse curvamento a porção 3' é novamente dobrada com o DNA telomérico adjacente formando o *D-loop*, Figura 3. Esses arranjos servem como primeira linha de proteção dos telômeros (Lee *et al.*, 2005).

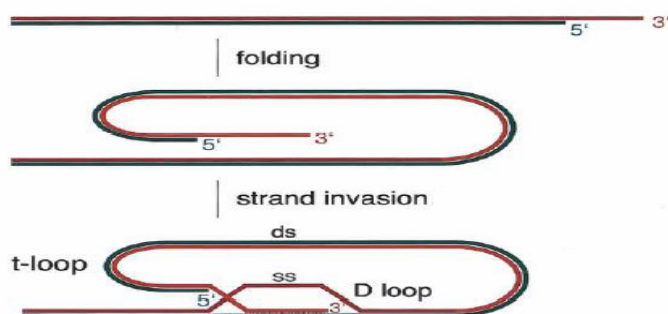


Figura 3. Representação ilustrativa da formação de *T-loop* e *D-loop*, fonte: de Lange *et al.*, 2005.



O complexo telomérico, também conhecido como telossomo (Liu *et al.*, 2004) é formado por várias proteínas associadas, tais como POT1, TRF1 e TRF2, que estão envolvidas na estabilidade e proteção das terminações teloméricas (Nakayama *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1997; Murasawa *et al.*, 2002; Colgin e Reddel, 2004).

A interação dos componentes do telossomo é demonstrada na Figura 4, onde pode-se observar que TRF1 e TRF2 estão diretamente ligados ao DNA telomérico dupla fita, formando uma barreira para a interação da telomerase com o telômero.

TRF1 é responsável pela regulação do telômero, controlando indiretamente o acesso da telomerase ao DNA telomérico. Este também é responsável por dobrar, curvar e parear o DNA telomérico (de Lange, 2005).

POT1, também conhecido como “protetor do telômero”, está diretamente ligado à porção do telômero rica em nucleotídeo G, desta forma protegendo diretamente a porção terminal dos cromossomos (Baumann, 2006). TRF1 interage com POT1, regulando o acesso da telomerase à porção 3' do telômero (Zhou e Lu, 2001; Lin e Blackburn, 2004).

Já TRF2 é essencial para a formação e estabilização de *T-loop*, fundamental na conformação do telômero, protegendo-o de degradação (Griffith *et al.*, 1999; Stansel *et al.*, 2001).

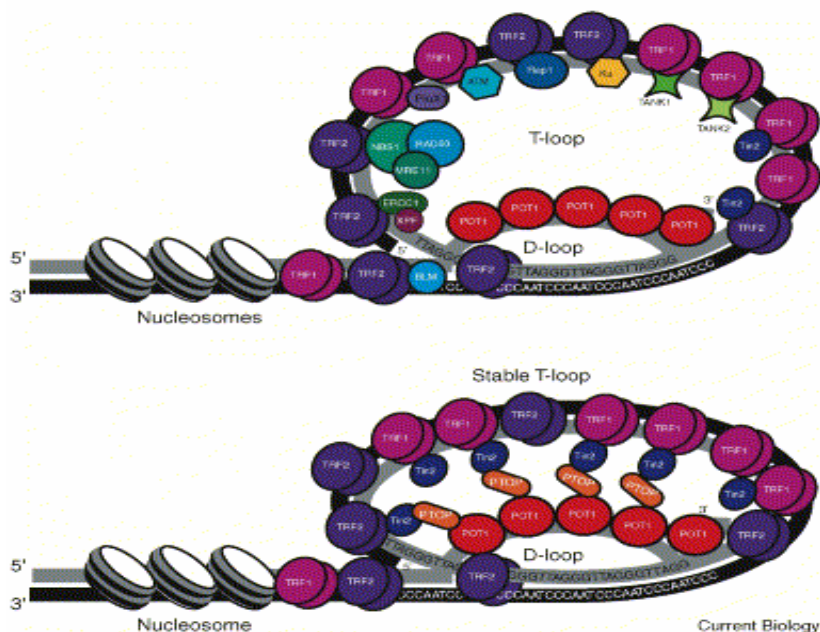


Figura 4. Esquema do telossomo, fonte: Colgin e Reddel, 2004.

Além da telomerase existem outras duas enzimas relacionadas à manutenção dos telômeros. Essas enzimas são Tankyrase 1 (TNKS1) e seu homólogo, Tankyrase 2 (TNKS2), que são capazes de se ligarem a TRF1, inibindo sua ligação ao telômero, facilitando sua interação com a telomerase e promovendo o prolongamento destes (Smith e de Lange, 2000; Ye e de Lange, 2004; Chiang *et al.*, 2006). Na ausência de TERT não é observada a atividade de TNKS1 (Cook *et al.*, 2002).

Alto nível de telomerase pode levar a proliferação ilimitada das células, causando o desenvolvimento de doenças como o câncer (Sharma *et al.*, 1995; Allsopp *et al.*, 2001; Nanni *et al.*, 2002).

A maioria das células somáticas adultas não possui atividade da telomerase, sofrendo instabilidade cromossômica até perderem por completo a capacidade replicativa. Por outro lado, cerca de 85-95% das células tumorais, capazes de proliferar ilimitadamente, expressam atividade da telomerase (Yi *et al.*, 2001; Gelmini *et al.*, 2004; Sidorova *et al.*, 2006). Desta maneira é de grande

interesse o entendimento da regulação da atividade destas enzimas como possíveis alvos terapêuticos.

A atividade da enzima telomerase pode ser detectada em baixos níveis em células-tronco hematopoéticas (Vaziri *et al.*, 1994; Engelhardt *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 2008). A enzima é induzida durante a estimulação da proliferação destas células por citocinas, porém é inibida durante a diferenciação celular, indicando que a manutenção dos telômeros é imprescindível à expansão de células-tronco (Notaro *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 2004).

O aumento da atividade da enzima telomerase em células hematopoéticas também está relacionado a patologias sanguíneas, como leucemias (Drummond *et al.*, 2007; Schüller *et al.*, 2007).

## 2 Justificativa e Relevância

Considerando as aplicações de CTH de SCU, neste trabalho investigou-se, *in vitro*, a ação de E2 e LiCl na expansão e diferenciação destas células. O conhecimento dos mecanismos de regulação da auto-renovação, proliferação e diferenciação de células-tronco é fundamental na otimização de metodologias para fins terapêuticos.

A manutenção dos telômeros é de extrema importância a fim de se manter uma célula em constante proliferação. A regulação do telossomo e das enzimas teloméricas foram analisadas, gerando conhecimentos fundamentais neste tipo celular.

Este estudo pretende fornecer subsídios para utilização mais eficiente do potencial terapêutico de células-tronco no tratamento de lesões, doenças degenerativas e tumores.

O projeto foi realizado no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE) e no Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), onde há infraestrutura adequada para a obtenção, isolamento e cultivo de células-tronco hematopoéticas de SCU.

Este é um dos projetos integrantes do programa de pesquisa *Scripta (Stem Cell Resource Initiative for Potential Therapeutic Applications)*, apoiado pela Fapesp e Banco Itaú, que visa o desenvolvimento de conhecimentos científicos para exploração do potencial terapêutico das células-tronco provenientes do sangue de cordão umbilical. Trata-se de uma iniciativa do Centro de Pesquisa Experimental do IIEPAE em conjunto com os Departamentos de Hemoterapia e Perinatologia do HIAE.

### 3 Objetivos

O objetivo do projeto é avaliar os efeitos de diferentes condições de expansão *in vitro* de CTH de SCU, utilizando meios de cultura com e sem agentes mitogênicos.

Constituem objetivos específicos:

- 1- Expandir células-tronco hematopoéticas de SCU em meio suplementado com citocinas, meio suplementado com citocinas e E2 e meio suplementado com citocinas e LiCL observando seus efeitos sobre a proliferação e diferenciação celular;
- 2- Analisar a expressão de genes relacionados à manutenção dos telômeros, migração celular e pluripotência.

## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Coleta e isolamento de células-tronco hematopoéticas provenientes de sangue de cordão umbilical (SCU)**

A coleta de sangue de cordão umbilical foi realizada no Centro Obstétrico do Hospital Israelita Albert Einstein, de gestações a termo e mediante o consentimento informado da mãe (Anexo 1). A coleta foi realizada de forma estéril através da punção da veia do cordão umbilical, no momento do parto e após a secção do cordão.

Foram utilizadas bolsas de sangue de volume máximo de 250 mL, contendo 25 mL de anticoagulante (CPDA-1). O volume de sangue coletado variou entre 70 – 120 mL. Foi retirada uma amostra de 80 µL do sangue para contagem de células iniciais. O sangue foi então diluído na proporção 1:2 em meio de cultura RPMI (Gibco) e as células linfomononucleares foram separadas por gradiente de densidade Ficoll-Paque (Amersham – GE Healthcare) na proporção 1:3. Após centrifugação a 400 g por 35 minutos, a fração de células linfomononucleares foi isolada cuidadosamente com auxílio de pipeta de 10 mL e lavadas em RPMI.

Em seguida realizou-se o protocolo de separação por cromatografia de afinidade MiniMACS microbeads (Miltenyi Biotech), a fim de se isolar apenas as células CD34+ ou CD133+. As células foram filtradas em filtro de 30 µm de nylon e o número destas foi determinado por contagem das células em contador automático (Coulter). Em seguida, as células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos e ressuspensas na proporção de 300 µl para cada  $10^8$  células em solução PBS contendo 2 mM EDTA e 0,5% BSA (solução 1) Para cada  $10^8$  células foi adicionado 100 µl bloqueador FcR e 100 µl anticorpos CD34+ ou CD133+ acoplados à micro-esferas magnéticas. Após incubação de 30 minutos a 6°C, as células marcadas foram centrifugadas e ressuspensas em solução 1. Em seguida estas foram submetidas à coluna de cromatografia, isolando-se apenas as células CD34+ ou CD133+.

## 4.2 Estudos de proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoéticas de SCU

As células isoladas por cromatografia de afinidade foram cultivadas em placas com 6 poços de 9,6 cm<sup>2</sup> de área de crescimento, com densidade inicial de  $0,5 \times 10^5$  células/mL, em 2 mL de meio de cultura e mantidas em estufa à 37° C e 5% CO<sub>2</sub>.

Para os ensaios de curva de crescimento, ensaios clonogênicos, citometria de fluxo e análise de expressão molecular, as células foram submetidas a diferentes condições de cultivo, conforme descrito a seguir.

- Condição basal (CB) - meio de cultura Stem Pro (Gibco), suplementado com citocinas e fatores de crescimento específicos (*500pg/mL de Flt-3 Ligand, 500pg/mL de Stem Cell Factor (SCF), 70 pg/mL de Interleukin-3 (IL-3) e 70 pg/mL de Interleukin-6 (IL-6)*) (Stem Cell Technology, Vancouver).
- Tratamento com 17β-estradiol - Meio CB suplementado com 10nM ou 100nM de 17β-estradiol (E2) (Sigma).
- Tratamento com Cloreto de lítio – Meio CB suplementado com 1mM ou 5mM de Cloreto de lítio (LiCl) (Sigma).

A troca do meio de cultura foi realizada a cada 3 dias, sendo trocados 50% do meio de cultura através de centrifugação. O crescimento celular foi monitorado sob microscópio óptico e o número de células viáveis foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante azul de tripan 0,5%.

Os ensaios clonogênicos foram realizados para verificar a quantidade de células-tronco/progenitoras funcionais nas diferentes condições experimentais, no momento da inoculação e após os dias 8 e 25, os quais foram escolhidos baseados na curva de crescimento. Foram inoculadas  $5 \times 10^3$  células para cada 1mL de meio Methocult GF H4434 (Stem Cell Technologies) e incubadas à 37° C por duas semanas. Após esse período as colônias foram contadas e especificadas como: BFU-E (eritrócitos), CFU-GM (granulócitos e macrófagos), CFU-M (macrófagos) e CFU-GEMM (granulócitos, eritrócitos, macrófagos e

megacariócitos). Para esses estudos foram utilizadas 11 amostras de SCU distintos, tratados separadamente.



### **4.3 Análise por citometria de fluxo de células-tronco hematopoéticas de SCU**

Para esses estudos foram utilizadas 5 amostras de SCU distintos. Submetidos as diferentes condições de cultivo, descritas anteriormente. Após seleção e cultivo de células CD34+, foi realizada a contagem destas utilizando câmara de Neubauer e caracterização fenotípica das populações celulares através de citometria de fluxo (FACS ARIA). Os ensaios foram realizados no dia da inoculação e nos dias 7, 14 e 21. Foram adquiridos 30.000 eventos por tubo, o que equivale a aproximadamente 30.000 células por tubo analisado.

A técnica de citometria de fluxo foi realizada utilizando os anticorpos monoclonais fluorescentes; CD14 (FITC), CD3 (PE-Cy7), CD34 (PE) (BD Biosciences e BD Pharmingen), CD133 (APC) (MylteyBiotec), CD45 (Cy5.5), CD33+ (PE-Cy7), CD16/56 (PE), CXCR4 (PE) e CD11a (PE). As análises foram realizadas selecionando as células por tamanho e granulosidade, seguidas pela demarcação somente das células CD45+, as quais foram utilizadas nas análises subsequentes. Para análise foram utilizados os seguintes softwares FACSDIVA e FlowJo.

#### **4.4 Análise em diferentes condições de cultivo da expressão gênica relacionada à manutenção dos telômeros e pluripotência, pela técnica de PCR quantitativo em Tempo Real**

Para esses estudos foram utilizadas 6 amostras de SCU distintos. As células CD133+ isoladas foram inoculadas em diferentes condições de cultivo, conforme descrito anteriormente.

Após 1 semana e 2 semanas de tratamento as células CD133+ foram isoladas utilizando MiniMACS microbeads (Miltenyi Biotech), como descrito anteriormente.

O RNA das células CD133+ foi extraído no dia de inoculação e das células selecionadas após 1 e 2 semanas de tratamento. Para a extração do RNA foi utilizado o RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo instruções do fabricante e quantificado em espectrofotômetro à 260 nm. A qualidade do RNA foi verificada através corrida eletroforética em gel de agarose 1.2% corado com brometo de etídio (10 mg/mL).

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de 0.5 ug de RNA total e o procedimento foi feito conforme especificações do kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen).

A expressão de genes foi analisada através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando o Kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante com a utilização de pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene.

A reação de qRT-PCR foi feita em duplicata nas seguintes condições;

1° Estágio: 95° C, 15 minutos.

2° Estágio: 94° C, 15 segundos.

Temperatura anelamento, 25 segundos.

72° C, 30 segundos.

Foram feitos 45 ciclos do 2° Estágio

As amostras foram diluídas na proporção 1:10. Cada gene foi analisado em duplicada. O gene GAPDH foi utilizado como gene de referência, a fim de normalizar a expressão do gene de interesse.

Neste estudo foi analisada a expressão gênica relacionada ao:

- Telossomo: POT1, TRF1 e TRF2.
- Enzimas teloméricas: TERT, TNKS1 e TNKS2.
- Pluripotência: Nanog, OCT4.

As seqüências e temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho encontram-se em Anexo 2.

#### **4.5 Estudo detalhado de pluripotência, caracterização e migração celular de células CD133+ de SCU, através da análise da expressão gênica, utilizando a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real**

Para esses estudos foram utilizadas 26 amostras de SCU distintos. As células CD133+ foram isoladas do SCU e o RNA foi imediatamente extraído.

As células isoladas também foram inoculadas em meio específico para diferenciação hematopoética (Methocult). Após 2 semanas de cultivo e diferenciação, as colônias então foram ressuspendidas, lavadas em PBS e o RNA foi extraído. Sendo estas denominadas CADC (clonogenic assay derived cells).

Foram utilizados como controle negativo, 4 amostras distintas de sangue periférico (SP). Onde foram selecionadas as células CD3 e CD14, utilizando MiniMACS microbeads (Miltenyi Biotech) e o RNA foi extraído.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de 0.5ug de RNA total e o procedimento foi feito conforme especificações do kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen).

A expressão de genes foi analisada através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando o Kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante com a utilização de pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene.

A reação de qRT-PCR foi feita em duplicata nas seguintes condições;

1° Estágio: 95° C, 15 minutos.

2° Estágio: 94° C, 15 segundos.

Temperatura anelamento, 25 segundos.

72° C, 30 segundos.

Foram feitos 45 ciclos do 2° Estágio

As amostras foram diluídas na proporção 1:10. Cada gene foi analisado em duplicata. O gene GAPDH foi utilizado como gene de referência, a fim de normalizar a expressão do gene de interesse. O RNA de células mesenquimais (MSC) de SCU foi utilizado como referência nos cálculos da expressão relativa dos genes analisados.

Neste estudo foi analisada a expressão gênica relacionada ao:

- Pluripotência: TERT, Nanog, OCT4, Sox2 e FoxD3.
- Marcadores hematopoéticos: CD14, CD34, CD45 e CD133.
- Migração celular: CXCR4 e SDF1.

As seqüências e temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho encontram-se em Anexo 2.

## 5 Resultados

### 5.1 Proliferação de células-tronco hematopóéticas de SCU

Após isolar as células CD34+ da porção linfomononuclear de SCU fresco. Essas células-tronco hematopóéticas foram cultivadas em condição basal (CB), CB suplementada de 10 nM e 100 nM de E2 e CB suplementada 1 mM e 5 mM de LiCl.

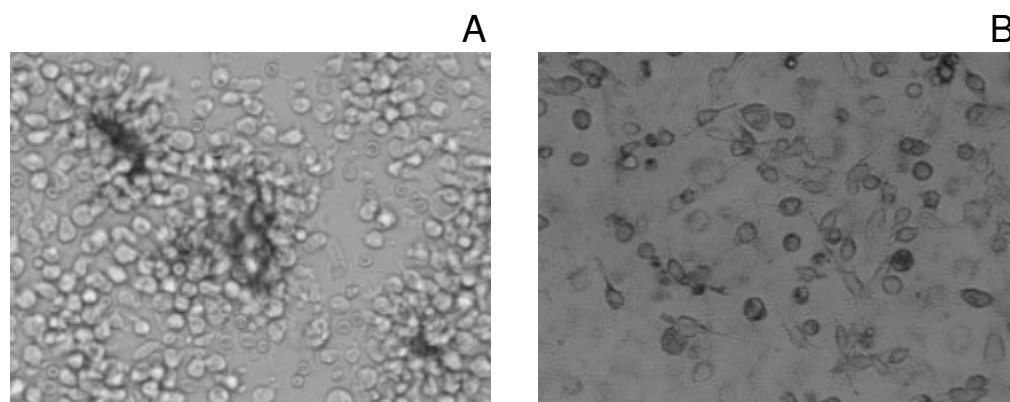


Figura 5. Células CD34+ em cultivo após 1 semana (A) e 2 semanas (B). Aumento de 100x.

Até a primeira semana de cultivo as células são muito pequenas, possuem morfologia homogênea e com tendência a se aglomerarem, conforme observado na Figura 5A. Já na Figura 5B, a partir da 2 semana de cultivo, observa-se uma mudança na morfologia celular, as células começam a ficar mais heterogêneas, algumas mais ovaladas e outras mais cilíndricas, além da diferença de tamanho entre elas. Não foi observada diferença morfológica entre as diferentes condições de cultivo.

Conforme analisado na Figura 6, em todas as condições observou-se o aumento do número de células ao longo dos intervalos de tempo, sendo mais evidenciado nas condições suplementadas com 10 nM de E2, 100 nM de E2 e 1 mM de LiCl. Observa-se também, por volta do 15° dia de cultivo que as células diminuem a intensidade de proliferação nas condições CB e CB suplementado com 5 mM de LiCl.

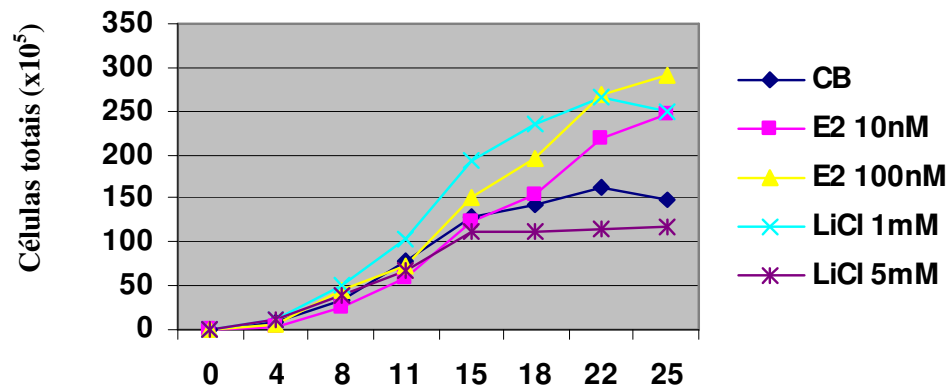


Figura 6. Curvas de crescimento de CTH na condição basal (CB) e suplementadas com diferentes concentrações de E2 e LiCl.

As células também foram cultivadas em meio de cultura na ausência de citocinas e de fatores de crescimento, porém na presença de E2 ou LiCl, mas em nenhum dos casos foi observado crescimento celular.

Ensaio clonogênico foram realizados para verificar a quantidade de progenitoras funcionais nas diferentes condições experimentais. Na Figura 7 podemos observar as unidades formadoras de colônia de células eritrocitárias (BFU-E), colônia mista (CFU-GEMM), de progenitores de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) e de progenitores de macrófagos (CFU-M).

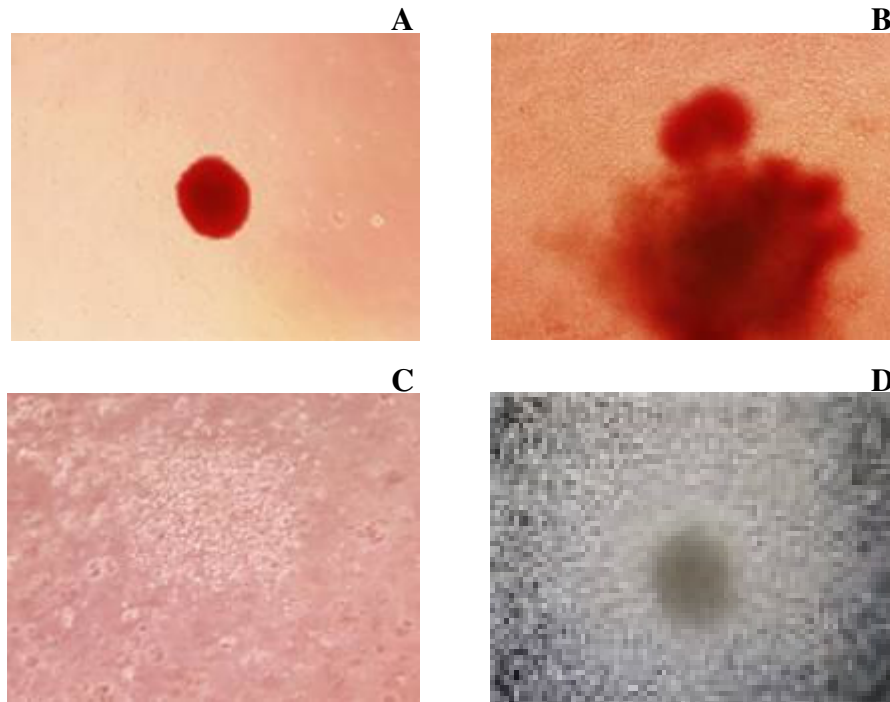


Figura 7. Ensaio clonogênico de células CD34+ em meio específico Methocult, após 14 dias de cultivo. Em aumento de 100x observa-se 'A' - BFU-E e 'B' - CFU-GEMM. Em aumento de 200x observa-se 'C' - CFU-M e 'D' - CFU-GM.

Após as colônias terem sido contabilizadas, o número de células progenitoras foi calculado através da fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de céls. progenitoras} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ colônias específicas}}{\text{n}^{\circ} \text{ de células iniciais}}$$

Sendo que o valor das células iniciais é sempre igual a  $5 \times 10^3$ , já que este é o número de células inoculadas no meio Methocult, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Através destes cálculos podemos observar maior aumento no número de células progenitoras após 25 dias de cultivo nos diferentes tratamentos, sendo



mais evidentes nas concentrações 10 nM E2 e 1 mM LiCl (Figura 8). Desta forma estes tratamentos nestas devidas concentrações, juntamente com CB, foram escolhidos para a realização dos próximos experimentos. Já que além de terem aumentado o número de células progenitoras, também foram capazes de aumentar o número de células totais (Figura 6).

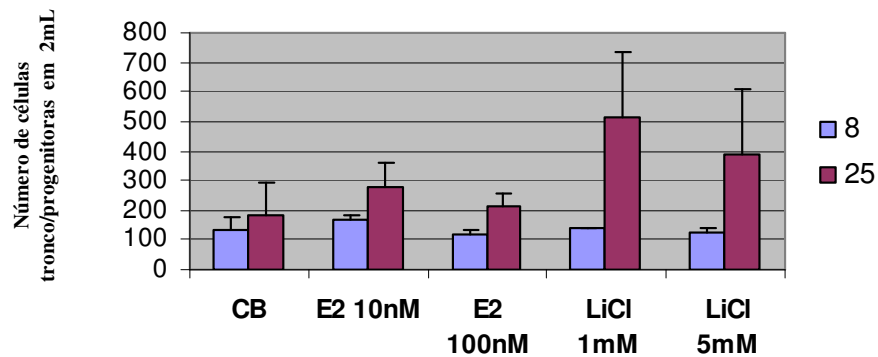


Figura 8. Número de células progenitoras funcionais em 2 mL, analisado por ensaio clonogênico após 8 e 25 dias em CB, CB+E2 e CB+LiCl em relação ao dia de inoculação.

Após 8 dias de cultura não foi observada diferença significativa entre as condições, quando analisado o número de colônias hematopoéticas específicas (Figura 9A). Mas após 25 dias, o tratamento com LiCl foi capaz de gerar maior aumento no número de colônias hematopoéticas, sendo o maior aumento observado nas colônias do tipo BFU-E. O número de colônias formadas após o tratamento com E2 resultou em um leve aumento nas colônias do tipo CFU-M e CFU-GM (Figura 9B).

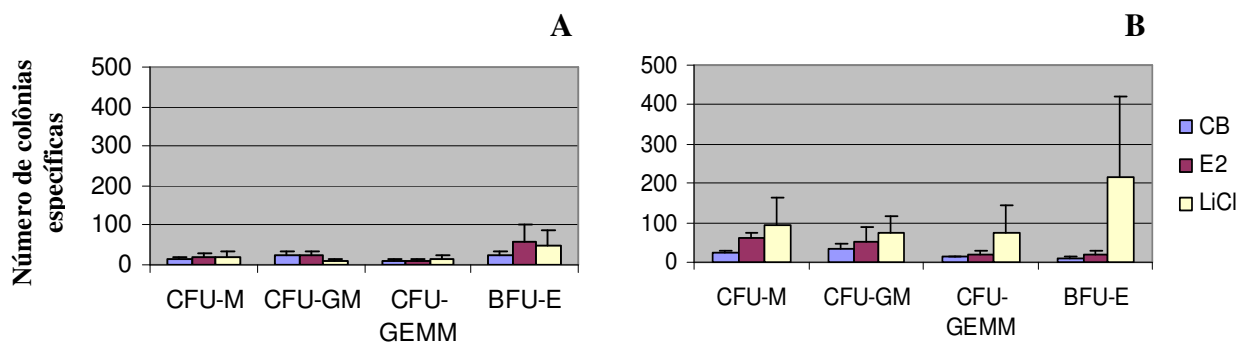


Figura 9. Número de colônias hematopoéticas específicas nas condições experimentais após 8 dias (A) e 25 dias (B) de tratamento com 10 nM E2, 1 mM LiCl e CB.

## 5.2 Análise por citometria de fluxo de células-tronco hematopoéticas de SCU, tratadas com E2, LiCl e CB

Após a seleção de CTH de SCU, estas foram submetidas à análise de marcadores de superfície específicos por citometria de fluxo.

Com a utilização dos softwares FACSDIVA e FlowJo, primeiro isolou-se as células por tamanho e granulosidade, como observado na Figura 10. Desta forma somente as células delimitadas em P1 foram analisadas.

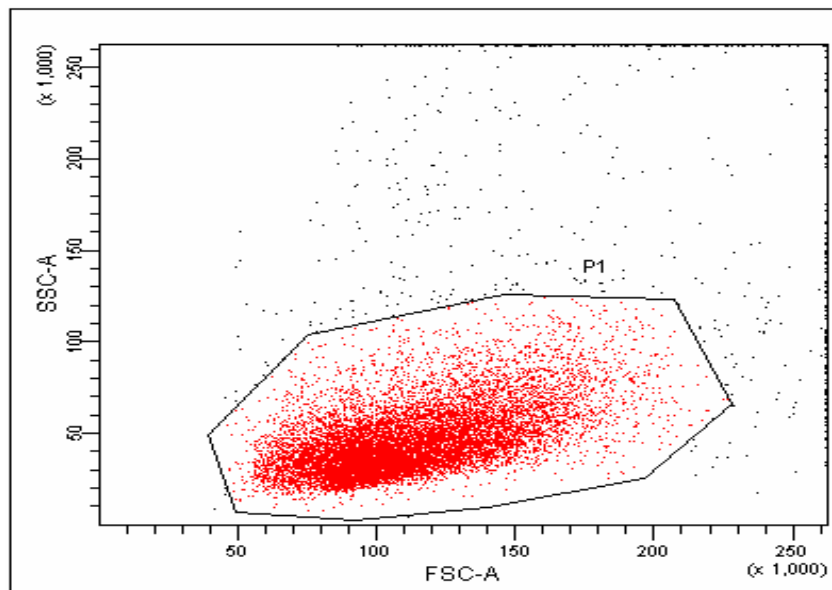


Figura 10. Gráfico em ponto (Dot-plot), seleção das células por tamanho e granulosidade. As células selecionadas se encontram dentro de P1.

Após a seleção das células em P1, foram selecionadas somente as células CD45+ para análise. Conforme observado na Figura 11, 85,58% das células expressavam o marcador de superfície CD45.

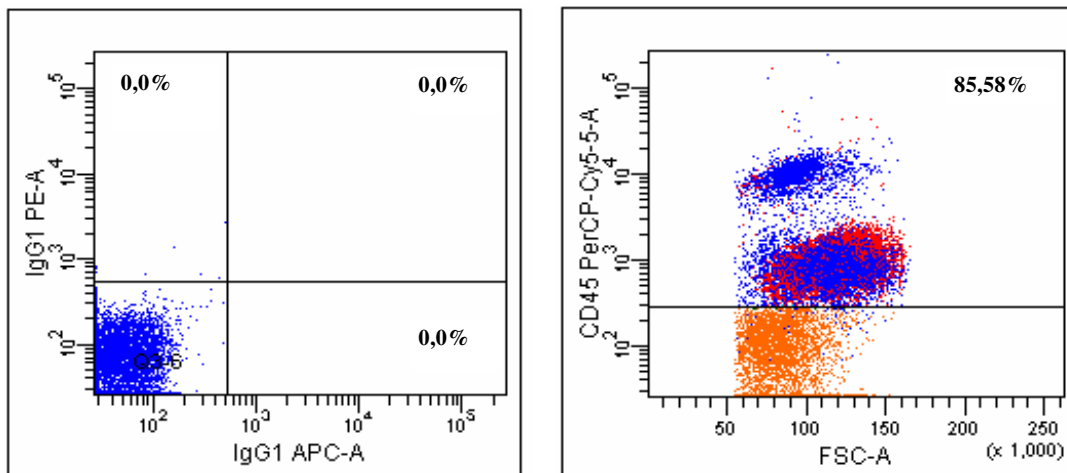


Figura 11. Gráfico em ponto (Dot-plot), no qual se visualiza o controle isotípico (IgG1 PE-A e APC) e a seleção das células marcadas com CD45.

A seguir as células CD45+ selecionadas foram analisadas para a expressão dos marcadores CD34 e CD133. Observou-se a dupla expressão dos marcadores de superfície celular CD34 e CD133, em 62,3% das células analisadas (Figura 12). Conforme descrito na literatura as células CD133+ pertencem a uma categoria mais primitiva de CTH. Devido a este fato, a partir deste experimento começou-se a isolar as células CD133 da porção linfomononucleares de SCU, utilizando *microbeads* conforme descrito em Materiais e Métodos.

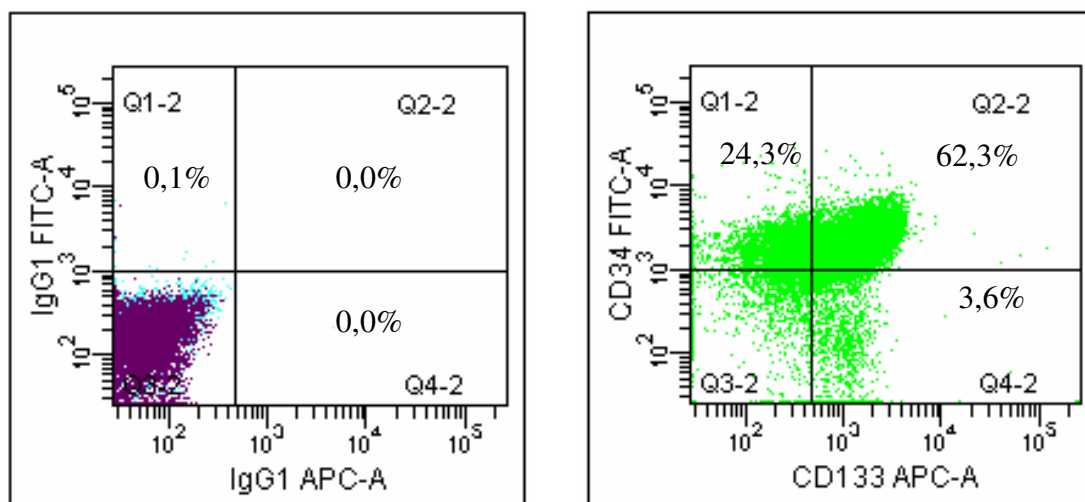


Figura 12. Gráfico em ponto (Dot-plot), no qual se visualiza o controle isotípico (IgG1 FITC e APC) e a análise dos marcadores CD34+ (Q1-2), CD133+ (Q4-2) e dupla marcação (Q2-2).

Após 7, 14 e 21 dias as células em cultura foram novamente analisadas por citometria de fluxo. Na Figura 13, onde gráficos mostram a expressão dos marcadores de células-tronco hematopoéticas, observa-se aumento no número de células CD133+.

Esse aumento foi mais evidenciado após 7 e 14 dias de cultivo, em todas as condições, em relação ao dia de inoculação, Figura 13A e 13B. Após 21 dias de cultivo há um declínio no número de células CD133+ em todas as condições (Figura 13C). O aumento de expressão do marcador CD34 e da dupla marcação CD133/CD34 não foi evidenciado ao longo dos intervalos de tempo nas análises por citometria de fluxo.

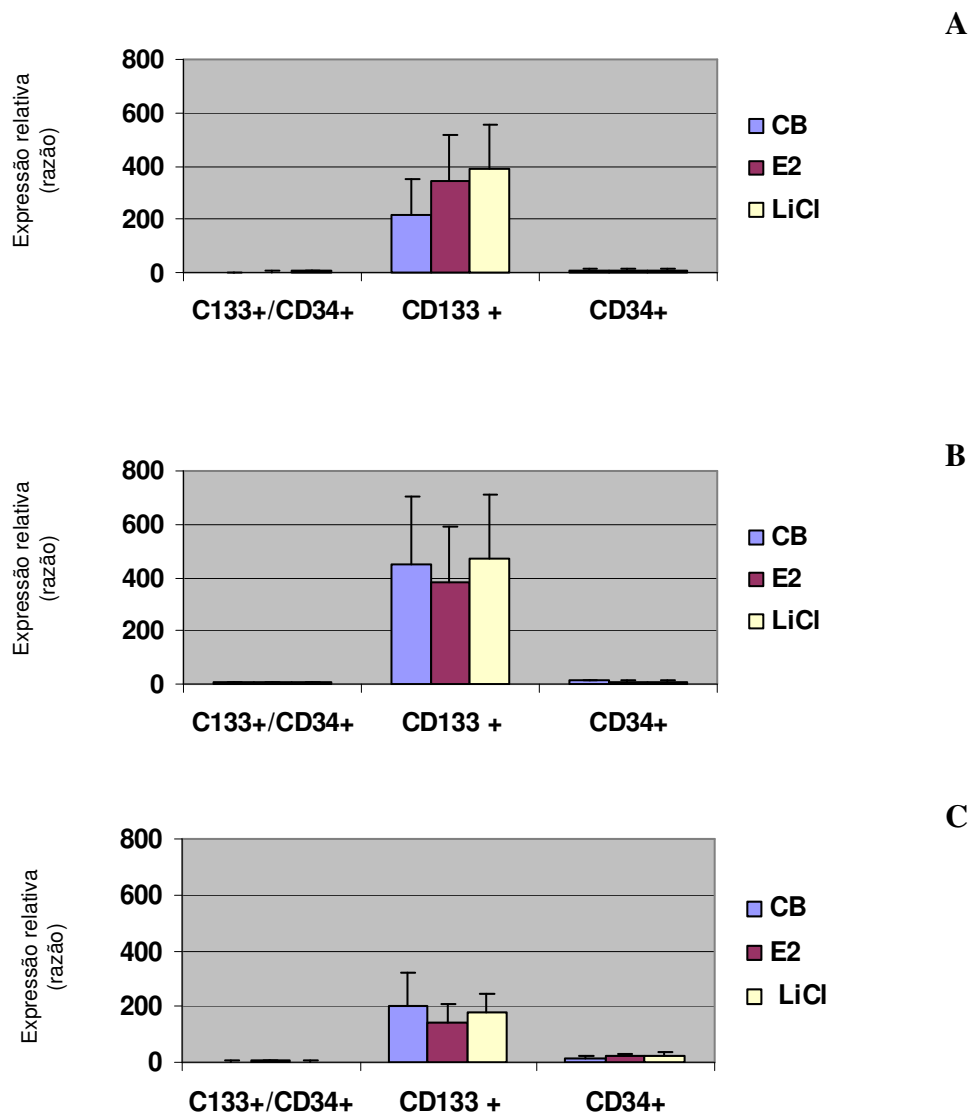


Figura 13. Número de células CD133+/CD34+, CD133+ e CD34+ em CB e tratadas com E2 ou LiCl após 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) em relação ao dia de inoculação, por citometria de fluxo.

Quando analisados os marcadores de células hematopoéticas, pode-se observar aumento no número total de células leucocitárias (CD45) e de células de linhagem mielóide (CD33) a partir do dia 7 de cultivo, em todas as condições, em relação ao dia de inoculação (Figura 14A e 14B). As células NK (CD16/56) só apresentaram aumento significativo na terceira semana de cultivo, Figura 14C. Esses resultados demonstram diferenciação celular espontânea após 14 dias de cultivo, em todas as condições.

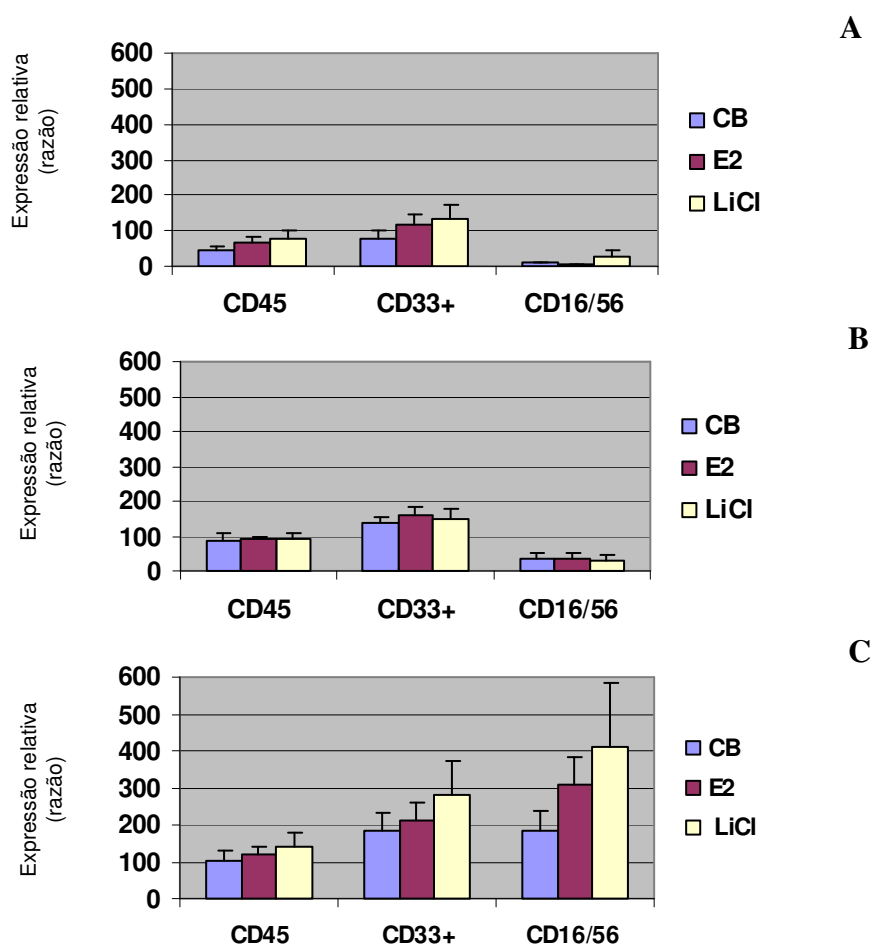


Figura 14. Número de células CD45+, CD33+ e CD16/56 em CB e tratadas com E2 ou LiCl após 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) em relação ao dia de inoculação, por citometria de fluxo.

Em concordância com os dados anteriores, após 3 semanas de cultivo observou-se também aumento de células monocíticas (CD14) e linfocíticas (CD3) em todas as condições, Figura 15.

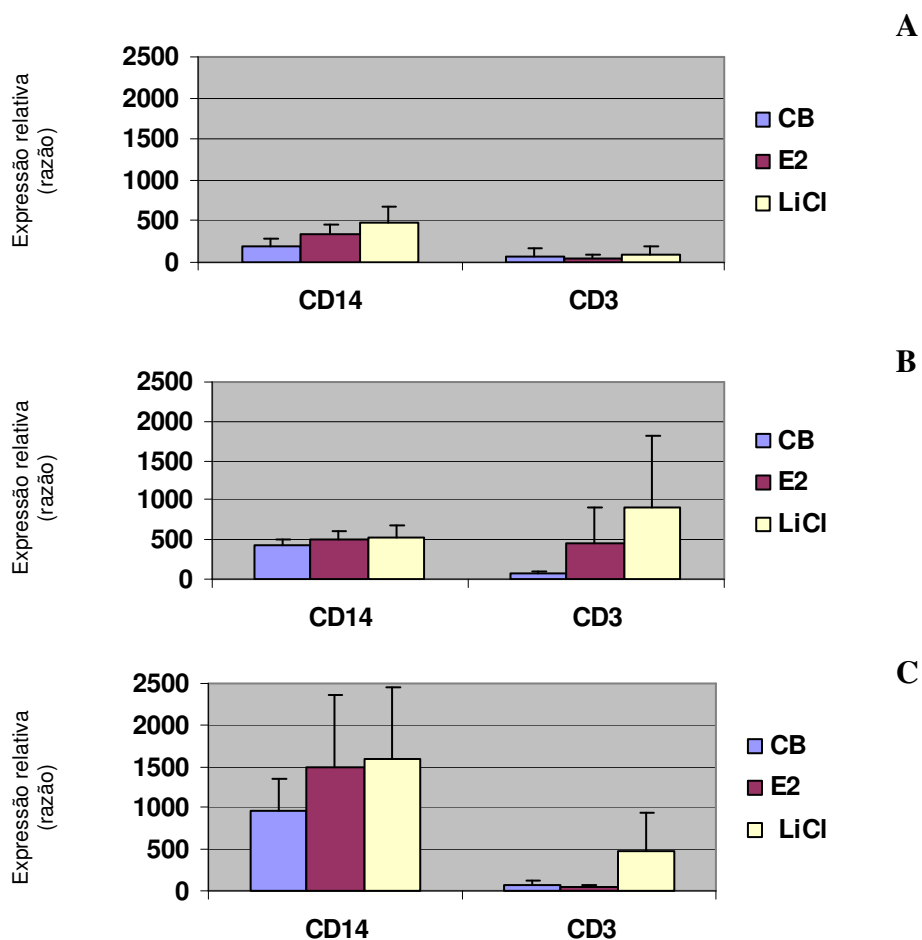


Figura 15. Número de células CD14+ e CD3+ em CB e tratadas com E2 ou LiCl após 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) em relação ao dia de inoculação, por citometria de fluxo.



Quando analisada a expressão de marcadores relacionados à migração celular (CXCR4) e adesão celular (CD11a), observou-se aumento do número de células que expressam CD11a ao longo das 3 semanas de cultivo. Enquanto não houve variação da expressão de CXCR4, em todas as diferentes condições (Figura 16).

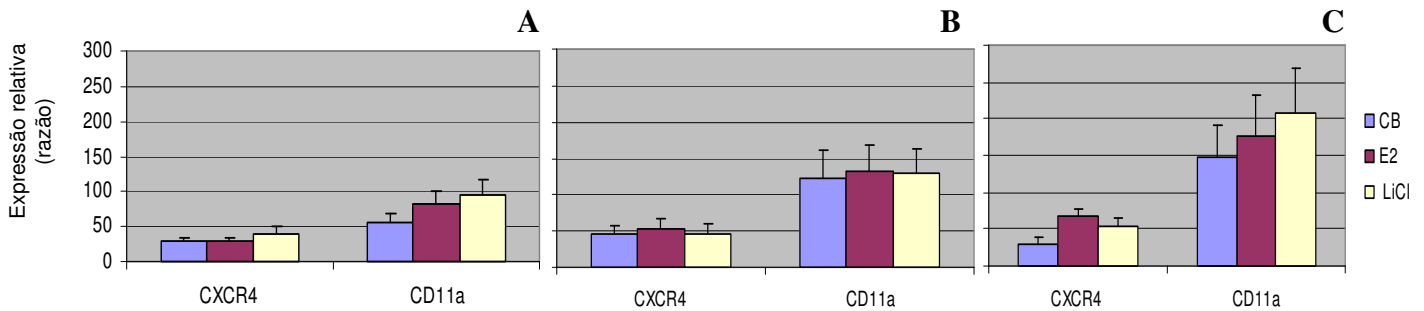


Figura 16. Número de células CXCR4 e CD11a em CB e tratadas com E2 ou LiCl após 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) em relação ao dia de inoculação, por citometria de fluxo.

Como podemos observar na Figura 17, houve aumento de células com dupla marcação para CD133 e CD11a, após 14 dias de cultivo. As expressões destes marcadores significam aumento no número de CTH com capacidade de *homing* celular. Este resultado é importante no processo de migração celular durante o transplante de medula óssea. Este aumento pode-se ser observado em todas as condições de cultivo.

Entretanto após 21 dias de cultivo ocorre diminuição da expressão desta dupla marcação, sugerindo que após este período não é ideal para o sucesso de transplante hematopoético.

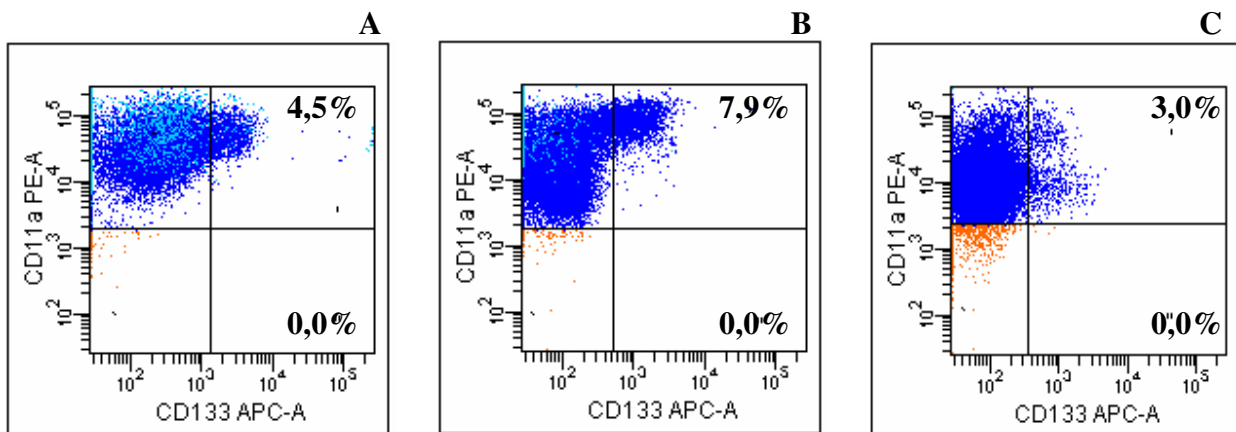


Figura 17. Gráfico em ponto (Dot-plot), no qual se analisa a expressão dos marcadores CD11a, CD133. Sendo A, 7 dias; B, 14 dias e C 21 dias de cultivo.

### 5.3 Análise de expressão de genes envolvidos na manutenção dos telômeros e pluripotência, após cultivo em CB, CB+E2 e CB+LiCl

Após a extração de RNA, síntese de cDNA e reação de qRT-PCR, conforme descritas em Materiais e Métodos, foram feitas as análises de expressão dos genes. As análises de expressão dos genes de interesse foram feitas seguindo o protocolo do Kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN) e Livak e Schmitgen, 2001. Todas as expressões de genes analisados em todas as condições foram normalizadas pela expressão respectiva do gene *housekeeping*, GAPDH. Desta maneira foi utilizada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , sendo a potência na base de  $(-\Delta\Delta C_T)$ . E  $-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{Ta} - \Delta C_{Tb})$ , onde “ $C_{Ta}$ ” é o valor de Ct da amostra de interesse e “ $C_{Tb}$ ” é o valor da amostra no dia da inoculação, dia 0, do cordão relacionado.

Quando analisadas as expressões dos genes envolvidos na manutenção dos telômeros, observa-se aumento considerável somente na expressão do gene TERT em todas as condições, após 7 dias de cultivo, Figura 18A. O aumento na expressão de TERT comprova a atividade da enzima telomerase nas células estudadas. A atividade da telomerase sugere prolongamento dos telômeros, gerando estabilidade cromossômica e proliferação celular.

Porém após 14 dias há uma diminuição na expressão de TERT em todas as condições (Figura 18B). Conforme observado nos resultados anteriores é exatamente neste período (após 7 dias) que começa a diferenciação celular, correlacionando a diminuição de expressão de TERT com a diferenciação celular.

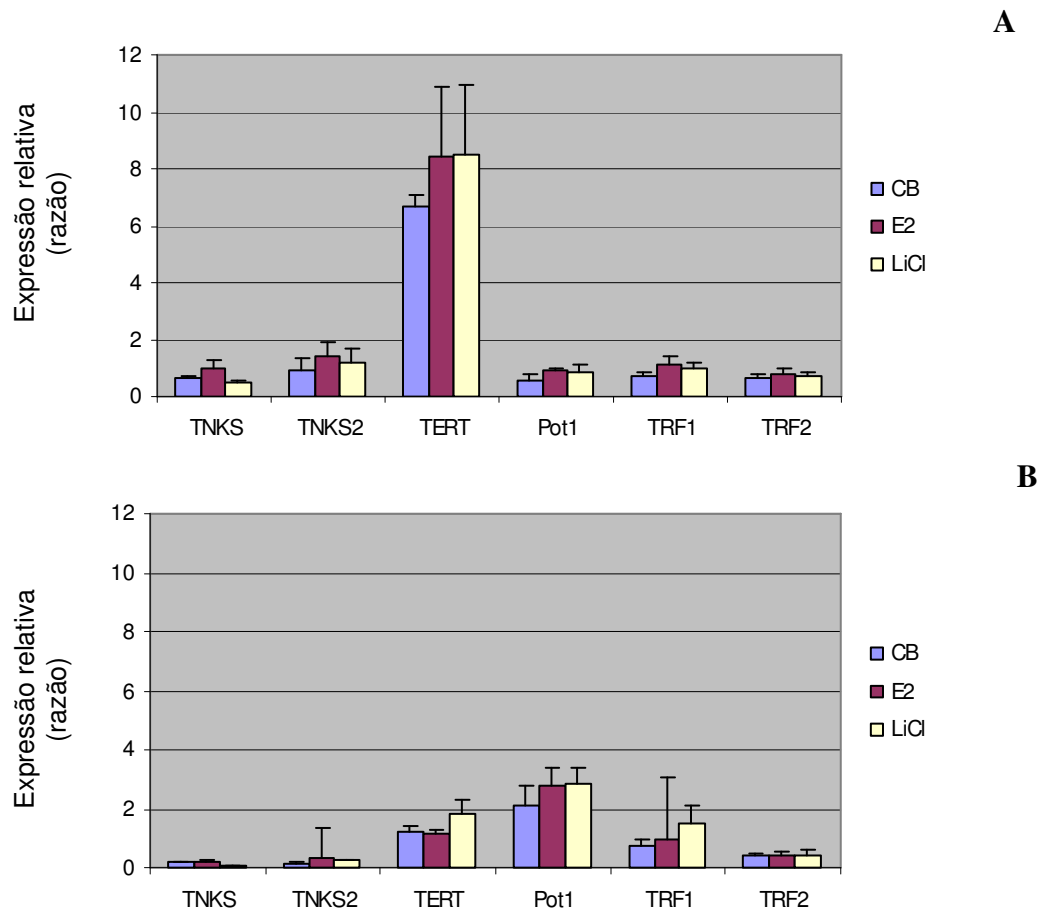


Figura 18. Expressão relativa de genes relacionados ao telossomo e enzimas teloméricas após cultivo em CB, CB + 10 nM E2 e CB + 1 mM LiCl, em relação ao dia de inoculação. Sendo A, 7 e B 14 dias de cultivo.

Foram observadas as expressões dos genes de pluripotência, Nanog e Oct4 nas CTH em todas as condições de cultivo ao longo de 14 dias (Figura 19). De acordo com a literatura, o fator de transcrição Nanog é conhecido por ser um marcador de auto-renovação de células tronco (Silva *et al.*, 2006; Carlin *et al.*, 2006), enquanto Oct4 está presente nas células tronco indiferenciadas e com alto grau de capacidade proliferativa (Loh *et al.*, 2006; Tondreau *et al.*, 2005).

Desta maneira podemos inferir que nossos resultados sugerem grande potencial proliferativo e de auto-renovação de CTH de SCU.

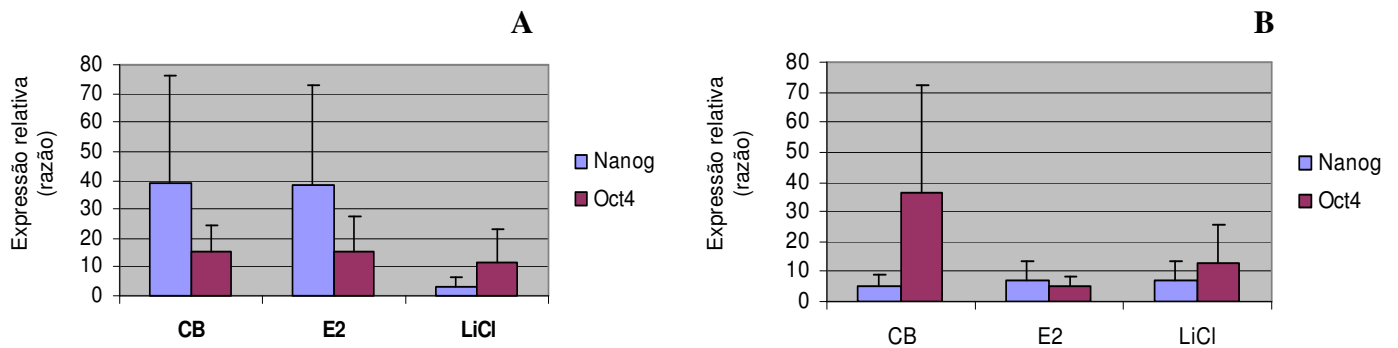


Figura 19. Expressão relativa dos genes relacionados pluripotência nos tratamentos com 10nM E2 e 1mM LiCl e em CB, após 1 semana (A) e 2 semanas (B) e relação ao dia de inoculação.

#### 5.4 Estudo detalhado de pluripotência, caracterização e migração celular de células CD133+ de SCU, através da análise da expressão de genes, utilizando a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real

Logo após a seleção de células CD133+ de SCU por *microbeads*, essas células foram lisadas e o RNA foi extraído, conforme descrito anteriormente.

Células CADC, CD3 e CD14 isoladas de SP e MSC de SCU também foram lisadas e o RNA extraído.

Após a síntese de cDNA de todas as amostras de RNA, esses foram submetidos à reação de qRT-PCR, a fim de se analisar os genes de interesse.

As análises dos genes de interesse foram feitas seguindo o protocolo do Kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN) e Livak e Schmitgen, 2001. Todas as expressões de genes analisados em todas as condições foram normalizadas pela sua expressão respectiva do gene *housekeeping*, GAPDH. . Desta maneira foi utilizada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , sendo a potência na base de  $(-\Delta\Delta C_T)$ . E  $-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{Ta} - \Delta C_{Tb})$ , onde “ $C_{Ta}$ ” é o valor de Ct da amostra de interesse e “ $C_{Tb}$ ” é o valor da amostra utilizada como analisadora, neste caso a MSC. A expressão relativa dos genes analisados será sempre em relação às células mesequimais de SCU. Desta forma MSC será sempre de valor = 1.

Quando analisados os marcadores de superfície específicos para linhagem hematopoética, observou-se expressão de CD133 somente nas células-tronco hematopoéticas de SCU, comprovando-se a ausência de expressão desta molécula em células diferenciadas.

O marcador de linhagem monocítica CD14 pode ser observado tanto nas células de sangue periférico como nas CADC. A expressão de CD45, como esperado, foi observado em todos os tipos celulares, com exceção das MSC de SCU (Figura 20). As células CD133+ foram os únicos tipos celulares que expressaram o marcador CD34, resultado não demonstrado.

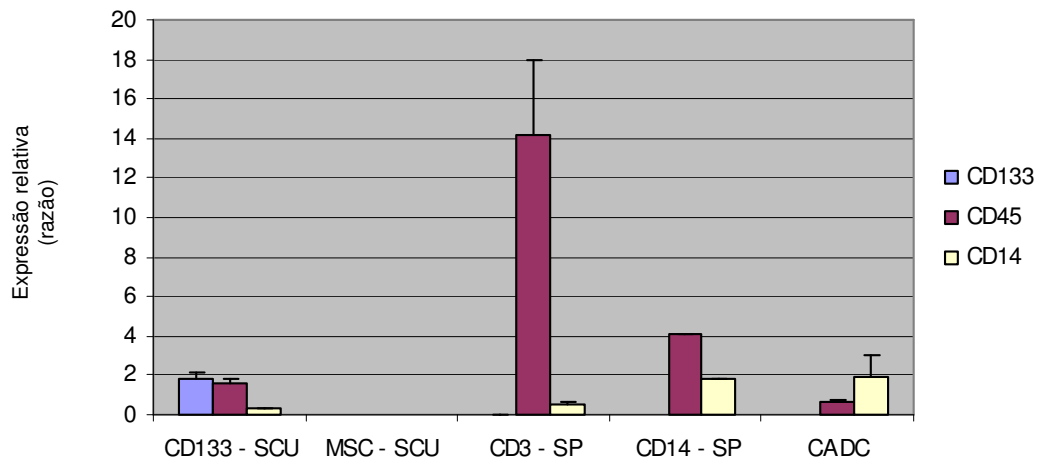


Figura 20. Expressão relativa dos genes de marcadores de superfície hematopoéticos em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e CADC.

A expressão de TERT é exclusivamente aumentada em células com potencial proliferativo e de auto-renovação. Quando analisada a expressão desta subunidade da enzima telomerase, observamos aumento significativo na sua expressão em células CD133 de SCU. As células CD3 e CD14 de sangue periférico também expressam TERT, sugerindo que estas células possuem potencial de auto-renovação e proliferação (Luckey *et al.*, 2006). Tanto as células mesenquimais de SCU quanto as CADC não expressaram TERT, sugerindo baixo potencial proliferativo nestes tipos celulares (Figura 21).

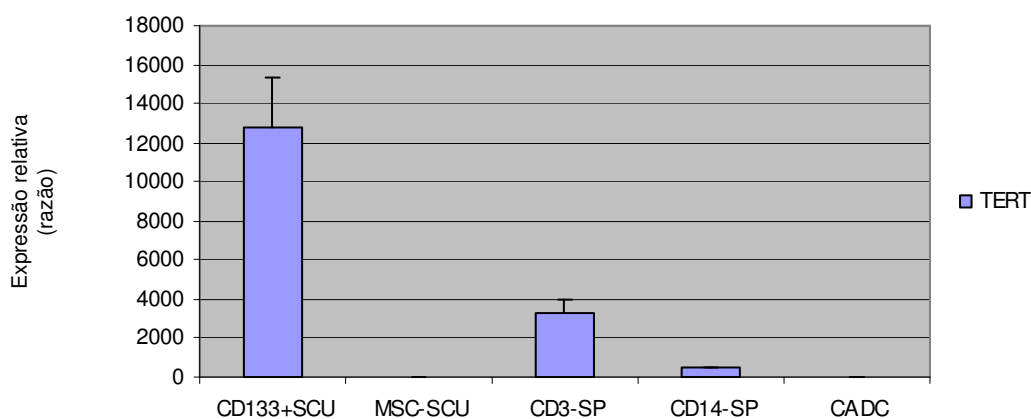


Figura 21. Expressão relativa da subunidade da enzima telomerase, TERT, em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e ainda em CADC.

Quando analisados os genes relacionados à migração e *homing* celular, observou-se aumento significativo na expressão de SDF-1 somente nos linfócitos (CD3+) de sangue periférico (resultado não demonstrado). Entretanto, quando analisada a expressão de seu receptor, CXCR4, observou-se aumento nas células CD133+ de SCU, CD3+ de SP e CADC, sendo maior nos linfócitos de sangue periférico (CD3+), Figura 22.

CXCR4 é o receptor de membrana para SDF1 (Grunewald *et al.*, 2006). A molécula SDF1 é responsável pela mobilização de células-tronco através da liberação de SCF, permitindo assim a transferência de CTH de seu estado de quiescência para o nicho proliferativo, além de favorecer a migração dessas células (Hattori *et al.*, 2001; Heissig *et al.*, 2002).



Portanto, através destes resultados sugere-se grande capacidade de *homing* celular em linfócitos de sangue periférico, provavelmente devido a sua função de migrar dentro do organismo, a fim de se defendê-lo.

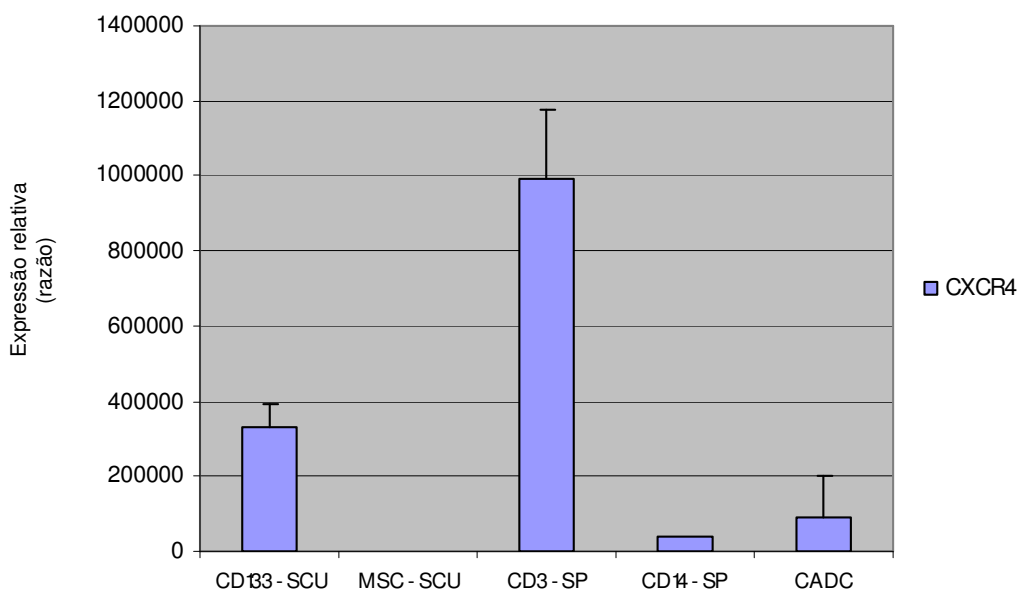


Figura 22. Expressão relativa de CXCR4 em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e CADC.

Os fatores de transcrição Oct4 e Nanog são altamente expressos em células CD133+ de SCU, logo após a coleta do sangue de cordão umbilical (Figura 23). As células CD3+ de sangue periférico também expressam esses fatores de transcrição relacionados com a pluripotência e auto-renovação celular, sugerindo mais uma vez o potencial de proliferação e auto-renovação deste tipo celular.

As células progenitoras hematopoéticas cultivadas em Methocult (CADC), também expressam Nanog e Oct4, mesmo após terem sofrido diferenciação celular. Sugerindo que essas células sejam pluripotentes, porém sem capacidade proliferativa, uma vez que não expressam TERT

Não foram observadas as expressões destes genes em MSC de SCU, nem em CD14+ de SP.

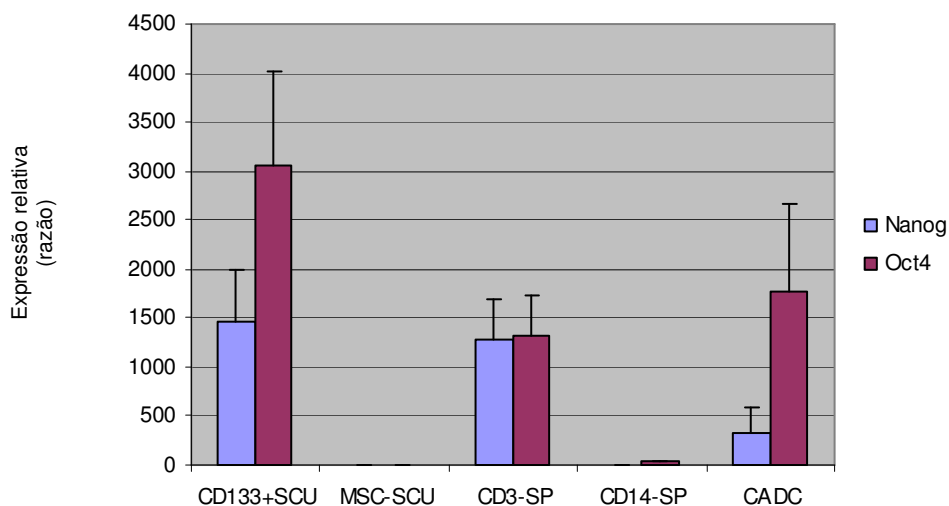


Figura 23. Expressão relativa de Nanog e Oct4 em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e CADC.

Quando analisadas a expressão dos fatores de transcrição, Sox2 e FoxD3, que trabalham em conjunto com Oct4 e Nanog, observou-se aumento de expressão destes nas mesmas populações celulares, citadas na Figura 23. Sabe-se que Oct4, Sox2 e FoxD3 são capazes de manter o estado de pluripotência, mesmo na ausência de Nanog (Takahashi e Yamanaka, 2006). Oct4 em grandes concentrações é capaz de reprimir a expressão de Nanog, mas a expressão de FoxD3 regula expressão de Nanog, quando este é reprimido por Oct4 (Pan e Thomson, 2007). Desta forma esses 4 fatores de transcrição orquestram o estado de pluripotência e auto-renovação celular.

Como observado na Figura 24, CD133+ de SCU, CD3+ de SP e CADC expressam os fatores de transcrição Sox2 e FoxD3. Mantendo o potencial de pluripotência e auto-renovação destes tipos celulares. O que não foi observado nas células MSC e nem CD14+ de sangue periférico.

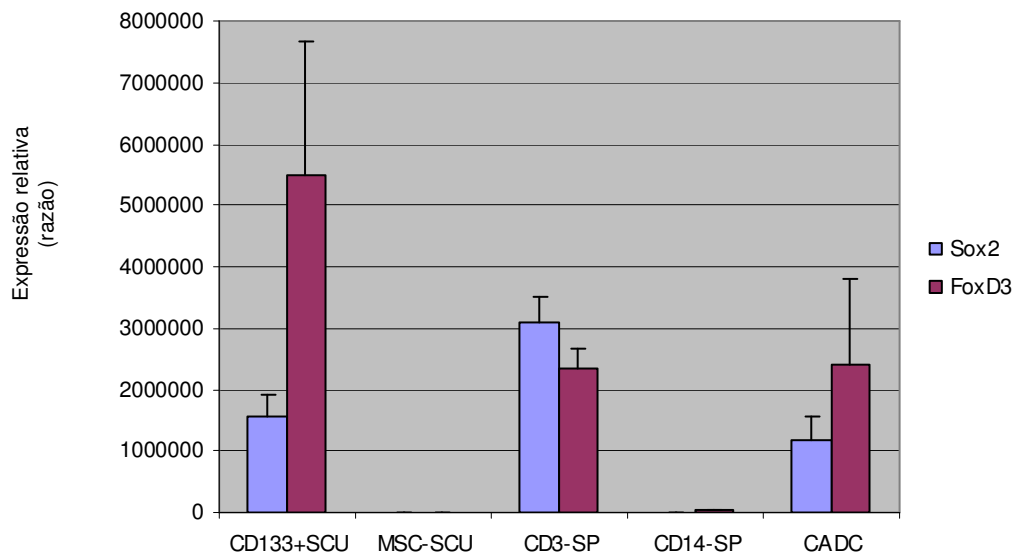


Figura 24. Expressão relativa de Sox2 e FoxD3 em células CD133 de SCU, MSC de SCU, CD3 e CD14 de sangue periférico e CADC.

## 6 Discussão

As células de sangue de cordão umbilical têm sido amplamente utilizadas em transplante de medula óssea e a possibilidade de aumentar o número de células-tronco presentes neste material seria de grande utilidade clínica. Não somente para a reconstituição hematopoética como para outras possíveis aplicações terapêuticas que venham a utilizar essas células.

Neste trabalho estudamos o comportamento de células CD133+ presentes no sangue de cordão umbilical e observamos que este tipo celular possui grande potencial proliferativo o que foi determinado através de experimentos de curva de crescimento celular.

Notamos maior proliferação de CTH quando cultivadas em meio suplementado com E2, embora tenha ocorrido proliferação em todas as condições testadas. Apesar deste resultado favorável utilizando o E2, observamos que as CTH podem ser cultivadas e expandidas em meio basal sem suplementação com mitógenos.

A principal vantagem em não se utilizar mitógenos, é que essas substâncias têm um amplo espectro de ação, podendo induzir transformações, tais como a ativação de oncogenes, o que poderia limitar a aplicação terapêutica das CTH células. Sabe-se que tanto o E2 quanto o LiCl podem estimular a proliferação de células hormônio-dependente presentes no câncer de mama e o E2 também pode estar relacionado a tumores de ovário (Welshons *et al.*, 1995; Green *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2008).

Utilizando o ensaio clonogênico observamos aumento significativo no número total de unidades formadoras de colônias em todas diferentes condições de cultivo. O ensaio clonogênico é muito importante para se determinar o potencial das CTH gerarem progenitores da linhagem hematopoética. Quando analisados e contabilizados os diferentes tipos de colônias, não observamos diferença significativa entre os tratamentos, indicando mais uma vez que os mitógenos utilizados neste estudo não causam grande impacto na proliferação de CTH de SCU.

Através das análises por citometria de fluxo não se evidenciou diferença significativa nas diferentes condições experimentais, demonstrando que em todas as condições ocorreu expansão das células CD133+ a partir da primeira semana de cultivo. Estudos recentes demonstram que células CD133+ têm maior potencial de auto-renovação e proliferação do que as células CD34+, podendo ainda precursoras deste último tipo celular (Goussetis *et al.*, 2006).

A diferenciação das CTH em células hematopoéticas pode ser notada por citometria de fluxo logo a partir da primeira semana de cultivo. Nesse período observamos aumentos progressivos do número de leucócitos (CD45) e de células mielóides (CD33), que não expressavam o marcador CD133.

Como esperado, as células com diferenciação mais tardia só apresentaram aumento significativo de número a partir da segunda semana de cultivo, sendo esse aumento mais evidente na terceira semana. Desta maneira pode ser observado aumento de células monocíticas (CD14), linfócitos (CD3) e células NK (CD16/56). Esse resultado mostra a progressão do processo de diferenciação celular *in vitro* das CTH nas condições utilizadas neste estudo.

Através das análises por citometria de fluxo, também observamos aumento da expressão da integrina, CD11a, e de CXCR4. Essas moléculas são de grande importância na migração e *homing* celular.

A expressão de quimiocinas é importante na migração celular, já que estes agentes direcionam as células para as regiões onde devem migrar. (Alberts, 2002c). A quimiocina SDF-1A tem como receptor o CXCR4. A expressão deste receptor é muito importante na indução da migração de células transplantadas para que ocorra a re-população e recuperação da medula óssea de pacientes que sofreram transplante hematopoético tanto alogênico quanto autólogo (Kahn *et al.*, 2004). Portanto é importante que as CTH além de proliferarem, mantenham a expressão do receptor CXCR4 quando cultivadas *in vitro*.

A integrina CD11a é uma importante proteína de adesão da célula com a matriz extracelular e ainda célula-célula no sistema hematopoético. Esta molécula é observada durante o processo de migração celular e sua importância está relacionada a transplante hematopoético (Ford *et al.*, 2004).

Quando relacionamos a expressão de CD11a com CD133, percebemos que todas as células CD133+ também expressavam a integrina CD11a. Essa dupla marcação indica não só um aumento do número de células-tronco hematopoéticas CD133, mas também que estas células mantêm o seu potencial de adesão à matriz celular, pela expressão de CD11a, o que contribuiria na migração e integração celular em um transplante hematopoético.

Em seu conjunto, os resultados das análises de citometria de fluxo demonstram que o cultivo de CTH de SCU em condições basais já é suficiente para aumentar a proliferação destas células, não havendo a necessidade de adição de mitógenos ao meio de cultura.

Confirmando os dados de citometria, as análises por qRT-PCR das células CD133+ nas diferentes condições experimentais, também indicam proliferação celular logo na primeira semana e diferenciação no período posterior, o que foi confirmado através da análise dos padrões de expressão gênica. Desta forma mostrando que CTH podem ser mantidas indiferenciadas e expandidas *in vitro* por até uma semana.

A enzima telomerase é a principal responsável pela manutenção dos telômeros e a expressão da sua subunidade TERT é indicador suficiente para comprovar a sua atividade (Forsythe *et al.*, 2002). Desta maneira, através de análises por qRT-PCR, observamos aumento da expressão em TERT logo na primeira semana de cultivo em todas as condições testadas. As enzimas tankyrase 1 e 2 favorecem a manutenção dos telômeros, e a expressão dos respectivos genes também estava aumentada no mesmo período de expressão de TERT.

O telossomo é constituído por proteínas reguladoras do comprimento do telômero. Essas proteínas são capazes de inibir a ligação da telomerase ao telômero de uma maneira direta ou indireta. Entre elas encontram-se TRF1, TRF2 e Pot1. A expressão dos genes que codificam essas enzimas, principalmente Pot1, não foi observada na primeira semana de cultivo em todas as condições.

Com base nos resultados da primeira semana de cultivo podemos concluir que houve manutenção dos telômeros o que favorece a proliferação celular

continuada. No entanto, isso não foi observada na segunda semana de cultivo, onde houve um declínio na expressão de TERT e das outras enzimas teloméricas e ainda um aumento de expressão dos genes relacionados ao telossomo, principalmente Pot1, que bloqueia o acesso da telomerase ao telômero, inibindo o seu prolongamento.

Quando analisamos os genes relacionados a pluripotência, foi observada a expressão dos fatores de transcrição Nanog e Oct4 em todas as condições experimentais. Esses fatores são descritos na literatura como exclusivos de células pluripotentes, mais especificamente de células-tronco embrionárias (Mitsui *et al.*, 2003). Sabe-se também que durante o processo de diferenciação celular a expressão destes fatores é reduzida e sua expressão é completamente nula em células adultas (Chambers *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2007).

A expressão de Nanog e Oct4 nas CTH levanta a questão já muito discutida da exclusividade de expressão destes genes em células pluripotentes (Kucia *et al.*, 2007; Ratajczak *et al.*, 2007; Zangrossi *et al.*, 2007).

Com a finalidade de se comprovar o potencial de diferenciação das CTH de SCU, analisamos a expressão gênica de CD133+ logo no dia de coleta do sangue de cordão umbilical, sem serem essas células cultivadas. Os resultados foram comparados com células de sangue periférico, células mesenquimais de sangue de cordão umbilical e ainda com células derivadas do ensaio clonogênico, Methocult. Apenas as células derivadas de SCU expressaram CD133 e CD34.

Também através de qRT-PCR, foi observada alta expressão da subunidade da telomerase, TERT, nas células CD133 de SCU logo após sua coleta do cordão umbilical. Isso indica o potencial proliferativo e de manutenção dos telômeros das CTH de SCU.

Observamos igualmente a expressão de TERT nas células CD3+ de sangue periférico. A expressão desta subunidade da telomerase está diretamente relacionada à proliferação e auto-renovação celular. Este resultado indica que células-tronco e células progenitoras, bem como as células do sistema imune CD3+ que devem ser capazes de expansão clonal, retêm a expressão de genes ligados a manutenção dos telômeros (Scheeren *et al.*, 2005).

A expressão de TERT não pode ser observada em células progenitoras hematopoéticas já comprometidas com a diferenciação em linhagens específicas, demonstrando a perda de seu potencial de proliferativo.,

Pudemos observar alta expressão do receptor CXCR4 em células CD133+ de SCU. Conforme discutido anteriormente, este receptor está relacionado ao potencial migratório das células. Sua expressão está relacionada ao sucesso de transplantes hematopoéticos em terapias celulares. A expressão deste marcador também foi evidenciada nas células CADC e CD3+ de SP.

Observamos a expressão dos fatores de transcrição Nanog e Oct4 em células CD133+ de SCU. Possivelmente esta expressão está relacionada a alta capacidade destas células em se auto-renovarem. Essa expressão também foi demonstrada em linfócitos de sangue periférico, Sabe-se que estes têm uma grande capacidade de expansão clonal essencial para o funcionamento do sistema imunológico adaptativo. Também detectamos alta expressão de Nanog e Oct4 em células progenitoras hematopoéticas (CADC), que apesar de não expressarem TERT, ou seja, terem diminuída sua capacidade replicativa, de alguma maneira ainda retém pluripotência, o que se evidencia pela expressão de Nanog e Oct4.

Com a finalidade de se comprovar a expressão de Nanog e Oct4, foram estudados os fatores de transcrição Sox2 e FoxD3. Sabe-se que estes fatores são cruciais para se manter uma célula em seu estado de pluripotência, formando uma rede de interações moleculares capazes de ativar genes relacionados a auto-renovação, pluripotência e de reprimir genes que levam a diferenciação celular (Sun *et al.*, 2006).

Assim sendo, a expressão destes 4 fatores de transcrição; Nanog, Oct4, Sox2 e FoxD3, desempenha um papel fundamental para manutenção do estado de pluripotência e auto-renovação celular. No presente trabalho, observamos a expressão destes fatores nas células CD133+ de SCU, CD3+ de SP e CADC, comprovando a capacidade de auto-renovação destes tipos celulares. Esses resultados indicam a importância de se ampliar os estudos nesta área para o desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas das CTH.



## 7 Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o cultivo de CTH de SCU em meio na condição basal já é suficiente para a expansão destas células, mantendo suas características de células-tronco, após uma semana de cultivo.

Essas características foram evidenciadas através do aumento de expressão da subunidade da telomerase (TERT). A enzima telomerase é a principal responsável pelo prolongamento e manutenção dos telômeros, o que leva a estabilidade cromossômica. A expressão de TERT está diretamente relacionada à proliferação e auto-renovação celular.

Também observamos a expressão da integrina CD11a em células CD133+. Essa molécula de adesão é muito importante para o processo de *homing* celular. A co-expressão destes marcadores sugere que as células CD133+ após uma semana de cultivo “in vitro” mantêm sua capacidade de *homing*, o que é muito importante na migração e interação celular após transplante realizado com células hematopoéticas.

As células CD133+ também expressaram aumento nos fatores de transcrição Nanog, Oct4, Sox2 e Foxd3. Estas moléculas estão envolvidas na pluripotência e auto-renovação celular, e suas expressões são de extrema importância na caracterização de células-tronco.

Desta forma, os resultados sugerem que as células CD133+ presentes em sangue de cordão umbilical podem ser expandidas “in vitro” em meio de cultivo em condições basais por uma semana sem perder as características de células-tronco e mantendo a capacidade de *homing*.

Apesar de haver aumento do número de células quando o cultivo é feito em meio basal suplementado com E2, sabe-se que o risco de utilização de mitógenos supera este benefício quando se trata de finalidade terapêutica. O E2 é um hormônio com amplo espectro de ação, podendo induzir transformações, tais como a ativação de oncogenes, o que poderia limitar o emprego das células cultivadas em terapia.

## Referências Bibliográficas

Ahmed A, Tollefsbol T. Telomeres, telomerase, and telomerase inhibition: clinical implications for cancer. *JAGS*. 2003; 51:116-22.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. 4. ed. Artes Médicas: Porto Alegre; 2002a. p.1286-1287.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. 4. ed. Artes Médicas: Porto Alegre; 2002b. p. 1015.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. 4. ed. Artes Médicas: Porto Alegre; 2002c. p. 262-266.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. 4. ed. Artes Médicas: Porto Alegre; 2002d. p.1413.

Allsopp RC, Cheshier S, Weissman IL. Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplation of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001; 193(8):917-24.

Armstrong L, Lako M, Lincoln J, Cairns PM, Hole N. mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech Dev*. 2000;97(1-2):109-16.

Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W. A role for Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood* 1997; 89:3624-35.

Avery S, Inniss K, Moore H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2006;15(5):729-40.

Ballin A, Lehman D, Sirota P, Litvinjuk U, Meytes D. Increased number of peripheral blood CD34+ cells in lithium-treated patients. *Br J Haematol*. 1998; 100(1):219-21.

Barker JN. Umbilical Cord Blood (UCB) Transplantation: An Alternative to the Use of Unrelated Volunteer Donors? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007; 55-61.

Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2804-08.

Baumann P. Are mouse telomeres going to pot? *Cell*. 2006;126(1):33-6.

Bouchal J, Kolar Z, Mad'arova J, Hlobilkova A, von Angerer E. The effects of natural ligands of hormone receptors and their antagonists on telomerase activity in the androgen sensitive prostatic cancer cell line LNCaP. *Biochem Pharmacol*. 2002; 63(6):1177-81.

Internacional Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Brandon C, Eisenberg LM, Eisenberg CA. WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. *Blood*. 2000; 96(13):4132-41.

Brunstein CG, Setubal DC, Wagner JE. Expanding the role of umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol*. 2007; 137(1):20-35.

Campbell PA, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navaro MA, Rudnicki MA. Oct4 targets regulatory nodes to modulate stem cell function. *Plos One*. 2007; 6: e553: 1-11.

Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4(1):8

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003; 113: 643-655.

Chan KK, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HY. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol*. 2008; 111(1):144-51.

Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI. Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004; 354-71

Cheng CW, Smith SK, Charnock-Jones DS. Wnt-1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology. *Exp Cell Res*. 2003; 291(2):415-25.

Chiang YJ, Nguyen ML, Gurunathan S, Kaminker P, Tessarollo L, Campisi J, Hodes RJ. Generation and characterization of telomere length maintenance in tankyrase2-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2006; 26(6):2037-43.

Chivu M, Diaconu CC, Bleotu C, Alexiu I, Brasoveanu L, Cernescu C. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *J Cell Mol Méd*. 2004;8(2):223-31.

Colgin L, Reddel R. Telomere biology: a new player in the end zone. *Curr Biol*. 2004;26;14(20):R901-2.

Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S. Role for the related poly (ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol*. 2006; 22(1):332-42.

Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wobus AM. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol Chem*. 2003; 384(10-11):1391-409.

Das SK, Tan J, Raja S, Halder J, Paria BC, Dey SK. Estrogen targets genes involved in protein processing, calcium homeostasis, and Wnt signalling in mouse uterus independent of estrogen receptor- $\alpha$  and  $-\beta$ . *The J of Biol Chem*. 2000; 275:28834-42.

De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguard human telomeres. *Genes Dev*. 2005; 19(18):2100-10

Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Report, 2001. Available from: <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm> [2008 maio 22].

Derksen PW, Tjin E, Meijer HP, Klok MD, MacGillavry HD, van Oers MH, Lokhorst HM, Bloem AC, Clevers H, Nusse R, van der Neut R, Spaargaren M, Pals ST. Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6122-7.

Devine SM, Lazarus HM, Emerson SG. Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: current status and future prospects. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31(4):241-52

Drukker M, Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends Biotechnol*. 2004; 22(3):136-41.

Drummond MW, Balabanov S, Holyoake TL, Brummendorf TH. Concise review: Telomere biology in normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2007; 25(8):1853-61.

Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MAS. Telomerase regulation, cell cycle, and telomerase stability in primitive hematopoietic cells. *Blood*. 1997; 90(1):182-93.

Engelhardt M, Lübbert M, Guo Y. CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive? *Leukemia*. 2002; 16(9):1603-8.

Fagotto F, Jho E, Zeng L, Kurth T, Joos T, Kaufmann C, Costantini F. Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular location. *J Cell Biol*. 1999; 145:741-56.

Ford CD, Greenwood J, Anderson J, Handrahan D, Petersen FB. Good and poor mobilizing patients differ in mobilized CD34+ cell adhesion molecule profiles. *Transfusion*. 2004; 44(12):1769-73.

Forsythe HL, Elmore LW, Jensen KO, Landon MR, Holt SE. Retroviral-mediated expression of telomerase in normal human cells provides a selective growth advantage. *Int J Oncol*. 2002; 20(6):1137-43.

Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 2000; 95(9):2813-20.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog in Neurobio*. 2001; 63: 29-60.

Gelmini S, Poggesi M, Distante V, Bianchi S, Simi L, Luconi M, Raggi CC, Cataliotti L, Pazzagli M, Orlando C. Tankyrase, a positive regulator of telomere elongation, is over expressed in human breast cancer. *Cancer Lett*. 2004; 216(1):81-7.

Gilbert SC *Developmental Biology*. In: Gilbert, S.C. *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. 2003a. p. 366-369.

Gilbert SC *Developmental Biology*. In: Gilbert, S.C. *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. 2003b. p. 4106-4130.

Gilbert SC *Developmental Biology*. In: Gilbert, S.C. *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. 2003c. p. 367-374.

Gluckman E, Rocha V. Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18(5):565-70.

Goussetis E, Theodosaki M, Paterakis G, Tsecoura C, Graphakos S. In vitro identification of a cord blood CD133+CD34-Lin+ cell subset that gives rise to myeloid dendritic precursors. *Stem Cells*. 2006; 24(4):1137-40.

Green CA, Peter MB, Speirs V, Shaaban AM. The potential role of ERbeta isoforms in the clinical management of breast cancer. *Histopathology*. In press 2008.

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999;97(4):503-14.

Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006; 124(1):175-89.

Hager ED, Dziambor H, Winkler P, Höhmann D, Macholdt K. Effects of lithium carbonate on hematopoietic cells in patients with persistent neutropenia following chemotherapy or radiotherapy. *J Trace Elem Med Biol*. 2002;16(2):91-7.

Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of Biol Chem*. 2001; 276: 36869-36872.

Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuçi I. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 996: 141-151.

Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitarano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001;97(11):3354-60.

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002; 109(5):625-37.

Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptors in resistance to hormone therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 608:130-43.

Horwitz EM. Stem cell plasticity: a new image of the bone marrow stem cell. *Curr Opin Pediatr*. 2003; 15(1):32-7.

Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens*. 2005; 9: 1699-1706.

Jilka RL, Takahashi K, Munshi M, Williams DC, Roberson PK, Manolagas SC. Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow: evidence for autonomy from factors released during bone resorption. *J Clin Invest*. 1998; 101:1942-49.

Kahn J, Byk T, Jansson-Sjostrand L, Petit I, Shivtiel S, Nagler A, Hardan I, Deutsch V, Gazit Z, Gazit D, Karlsson S, Lapidot T. Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. *Blood*. 2004; 103(8): 2942-2949.

Kim HK, Kim JE, Chung J, Park KH, Han KS, Cho HI. Lithium down-regulates the expression of CXCR4 in human neutrophils. *J Trace Elem Med Biol*. 2007;21(3):204-9.

Kim SH, Lee SU, Kim MH, Kim BT, Min YK. Mitogenic estrogen metabolites alter the expression of 17beta-estradiol-regulated proteins including heat shock proteins in human MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cells*. 2005; 20(3):378-84.

Kimura T, Nakamura T, Murayama K, Umehara H, Yamano N, Watanabe S, Taketo MM, Nakano T. The stabilization of beta-catenin leads to impaired primordial germ cell development via aberrant cell cycle progression. *Dev Biol*. 2006;300(2):545-53.

Kleber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(6):681-7.

Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, Czajka R, Wojakowski W, Machalinski B, Ratajczak MZ. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia* 2007;21(2):297-303

Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res*. 1999;59:5917-21.

Larson JS, Yin M, Fischer JM, Stringer SL, Stringer JR. Expression and loss of alleles in cultured mouse embryonic fibroblasts and stem cells carrying allelic fluorescent protein genes. *BMC Molecular Biology*. 2006;7:36

Lee JY, Okumus B, Kim DS, Ha T. Extreme conformational diversity in human telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):18938-43.

Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem*. 2004;279(49):51338-42

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Lin J e Blackburn EH. Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. *Genes Dev*. 2004;18(4):387-96

Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*. 2003; 423(6943):1013-8.

Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, Grafakos S, Brichard B, Li X, Nagler A, Giorgiani G, Haut PR, Brochstein JA, Nugent DJ, Blatt J, Woodard P, Kurtzberg J, Rubin CM, Miniero R, Lutz P, Raja T, Roberts I, Will AM, Yaniv I, Vermynen C, Tannoia N, Garnier F, Ionescu I, Walters MC, Lubin BH, Gluckman E; Eurocord Transplant Group. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood*. 2003; 101(6):2137-43.

Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2006; 38(4):431-40.

Losordo DW, Isner JM. Estrogen and angiogenesis. *Art Thr Vasc Biol*. 2001; 21:06-12.

Lou Z, Chen J. Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res*. 2006;312(14):2641-6.

Lu X, Baudouin SV, Gillespie JI, Anderson JJ, Dickinson AM. A comparison of CFU-GM, BFU-E and endothelial progenitor cells using ex vivo expansion of selected cord blood CD133(+) and CD34(+) cells. *Cytotherapy*. 2007;9(3):292-300.

Luckey CJ, Bhattacharya D, Goldrath AW, Weissman IL, Benoist C, Mathis D. Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *PNAS*. 2006;103 (9) 3304-3309.

Majhail NS, Brunstein CG, Wagner JE. Double umbilical cord blood transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18(5):571-5.

Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassauei K, Sui G, Cutler DJ, Liu Y, Brimble SN, Noaksson K, Hyllner J, Schulz TC, Zeng X, Freed WJ, Crook J, Abraham S, Colman A, Sartipy P, Matsui SI, Carpenter M, Gazdar AF, Rao M, Chakravarti A. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genet*. 2005; 37(10): 1099 – 1103.

Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guéry JC. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):512-21.

Masuzawa T, Miyaura C, Onoe Y, Kusano K, Ohta HM, Nozawa S, Suda T. Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J Clin Invest*. 1994; 94:1090-97.

McGrath HE, Liang CM, Alberico TA, Quesenberry PJ. The effect of lithium on growth factor production in long-term bone marrow cultures. *Blood*. 1987; 70(4):1136-42.

Medina KL, Strasse A, Kincade PW. Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursor. *Blood*. 2000; 95:2059-67.

Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen J, Hirte HW, Sacchi A, Pontecorvi A, Bacchetti S, Farsetti A. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogen in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol* 2000;20(11) 3764-71.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003;113: 631-642.

Moggs JG, Murphy TC, Lim FL, Moore DJ, Stuckey R, Antrobus K, Kimber I, Orphanides G. Anti-proliferative effect of estrogen in breast cancer cells that re-express ERalpha is mediated by aberrant regulation of cell cycle genes. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(2):535-51.

Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002; 106:1133-1139.

Murdoch B, Chadwick K, Martin M, Shojaei F, Shah KV, Gallacher L, Moon RT, Bhatia M. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cell in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:3422-7.

Nakayama J, Saito M, Nakamura H, Matsuura A, Ishikawa F. TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell*. 1997; 88:875-84.

Nakayama J, Tahara H, Tahara E, Saito M, Ito K, Nakamura T, Tabara E, Ide T, Ishikawa F. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hematocellular carcinomas. *Nat Genet.* 1998;18:65-8.

Nanni S, Narducci M, Pietra LD, Moretti F, Grasselli A, De Carli P, Sacchi A, Pontecorvi A, Farsetti A. Signaling through estrogen receptors modulates telomerase activity in human prostate cancer. *J Clin Invest.* 2002;110:219-27.

National Institutes of Health. Stem Cells: A Primer. Report, 2002. Available from: <http://www.nih.gov/news/stemcell/primer.htm> [2008 maio 22].

Neth P, Ciccarella M, Egea V, Hoelters J, Jochum M, Ries C. Wnt Signaling Regulates the Invasion Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2006; 24: 1892-1903

Notaro R, Cimmino A, Tabarini D, Rotoli B, Luzzatto L. In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):13782-5.

Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res.* 2006; 34(2):97-115.

Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional network in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Resea.* 2007;17: 42-49.

Perry MJ, Samuels A, Bird D, Tobias JH. Effects of high-dose estrogen on murine hematopoietic bone marrow precede those on osteogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279:E1159-65.

Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, Fagioli F, Berger M, Aglietta M. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood.* 1997; 15;89(8):2644-53.

Povelones M, Nusse R. Wnt signalling sees spots. *Nature Cell Biol.* 2002;4:E249-50.

Przyborski SA. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells.* 2005; 23: 1242 – 1250.

Radomski JL, Fuyat HN, Nelson AA, Smith PK. The toxic effects, excretion and distribution of lithium chloride. *J Pharmacol Exp Ther.* 1950;100(4:1):429-44.

Rao AS, Kremenevskaja N, Resch J, Brabant G. Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/beta-catenin signalling. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153(6):929-38.

Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia.* 2007; 21(5):860-7.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol.* 2000; 18: 399 – 404.

Reya T, Duncan AW, Aliles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423:409-14.

Riddell SR, Applebaum FR. Graft-versus-host disease: a surge of developments. *Plos Med.* 2007; 4(7): 1174 – 1177.



Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, Gluckman E. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med.* 2000; 342(25):1846-54.

Ruzicka K, Grskovic B, Pavlovic V, Qujeq D, Karimi A, Mueller MM. Differentiation of human umbilical cord blood CD133+ stem cells towards myelo-monocytic lineage. *Clin Chim Acta.* 2004; 343(1-2):85-92.

Sakatoku H, Inoue S. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors of cord blood. *Stem cells.* 1997; 15:268-74.

Saldanha SN, Andrews LG, Tollefsbol TO. Analysis of telomerase activity and detection of its catalytic subunit, hTERT. *Anal Biochem.* 2003; 315(1):1-21.

Sato R, Maesawa C, Fujisawa K, Wada K, Oikawa K, Takikawa Y, Suzuki K, Oikawa H, Ishikawa K, Masuda T. Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human normal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis. *Gut.* 2004; 53(7):1001-9.

Scheeren FA, Naspetti M, Diehl S, Schotte R, Nagasawa M, Wijnands E, Gimeno R, Vyth-Dreese FA, Blom B, Spits H. STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nat Immunol.* 2005; 6(3):303-13.

Schoemans H, Theunissen K, Maertens J, Boogaerts M, Verfaillie C, Wagner J. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone Marrow Transp.* 2006; 38: 83-93.

Schuller CE, Jankowski K, Mackenzie KL. Telomere length of cord blood-derived CD34(+) progenitors predicts erythroid proliferative potential. *Leukemia.* 2007; 21(5):983-91.

Seeger H, Wallwiener D, Kraemer E, Mueck AO. Estradiol metabolites are potent mitogenic substances for human ovarian cancer cells. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005; 26(4):383-5.

Seydoux G, Braun RE. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell.* 2006; 127(5):891-904.

Sharma HW, Sokoloski JA, Perez JR, Maltese JY, Sartorelli AC, Stein CA, Nichols G, Khaled Z, Telangs NT, Narayanan R. Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Cell Biol.* 1995; 92:12343-6.

Sharp JG, Kessinger A, Lynch JC, Pavletic ZS, Joshi SS. Blood stem cell transplantation: factors influencing cellular immunological reconstitution. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000; 9:971-981.

Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest.* 2004; 113(2):160-8.

Sidorova N, Zavalishina L, Kurchashova S, Korsakova N, Nazhimov V, Frank G, Kuimov A. Immunohistochemical detection of tankyrase 2 in human breast tumors and normal renal tissue. *Cell Tissue Res.* 2006; 323(1):137-45.

Silva J, Chambers I, Pollard S, Smith A. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature.* 2006; 441(7096):997-1001.

Sjoholm A, Welsh N, Hellerstrom C. Lithium increases DNA replication, polyamine content, and insulin secretion by rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol.* 1992; 262(2 Pt 1):C391-5.

Smith S, de Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol.* 2000; 10(20):1299-302.

Smythe J, Armitage S, McDonald D, Pamphilon D, Guttridge M, Brown J, Green A, Brown C, Warwick RM, Lankester A, Fehily D, Contreras M, Navarrete C, Watt SM. Directed sibling cord blood banking for transplantation: the 10-year experience in the national blood service in England. *Stem Cells.* 2007; 25(8):2087-93.

Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J.* 2001;20(19):5532-40.

Sun Y, Li H, Yang H, Rao MS, Zhan M. Mechanisms controlling embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2006;16(3):211-31.

Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, Lebl DR, Caffarelli AD, de Bruin JL, Fedoseyeva EV, Robbins RC. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation.* 2005; 112:1166-72.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotency stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663-676.

Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 1959; 38:1709-16.

Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 2005; 23(8):1105-12.

Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* 1998; 58:4168-72.

Valenta T, Lukas J, Korinek V. HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/conduction in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:2369-80.

Vaticano. Available from: [www.vatican.va/roman\\_curia/pontifical\\_academies/acdlife/documents/rc\\_pa\\_acdlife\\_doc\\_20000824\\_cellule-staminali\\_po.html](http://www.vatican.va/roman_curia/pontifical_academies/acdlife/documents/rc_pa_acdlife_doc_20000824_cellule-staminali_po.html) [2008 maio 22].

Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Landsdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91:9857-60.

Vegeto E, Pollo G, Pellicciari C, Maggi A. Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *FASEB J.* 1999; 13:793-803.

Welshons WV, Engler KS, Taylor JA, Grady LH, Curran EM. Lithium-stimulated proliferation and alteration of phosphoinositide metabolites in MCF-7 human breast cancer cells. *J Cell Physiol.* 1995; 165(1): 134-144.

Willians R, Ryves WJ, Dalton EC, Eickholt B, Shaltiel G, Agam G, Harwood AJ. A molecular cell biology of lithium. *Biochem Society Trans.* 2004; 32: 799-802.

Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Development Biology*. 2002;2:8.

Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*. 2003; 34(6):461-75.

Xu R, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*. 2002; 20: 1261 – 1264.

Yamamoto H, Kishida S, Uochi T, Ikeda S, Koyama S, Asashima M, Kikuchi A. Axil, a member of the axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin and inhibits axis formation of *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol*. 1998; 18:2867-75.

Ye JZ e de Lange T. TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. *Nat Genet*. 2004; 36(6):618-23.

Yi X, Shay JW, Wright WE. Quantitation of Telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(23):4818-25.

Yui J, Chiu CP, Landsdorp PM. Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood*.1998; 91(9) 3255-62.

Zangrossi S, Marabese M, Broggini M, Giordano R, D'Erasmo M, Montelatici E, Intini D, Neri A, Pesce M, Rebulli P, Lazzari L. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells*. 2007; 25(7):1675-80.

Zimmermann S, Glaser S, Ketteler R, Waller CF, Klingmuller U, Martens UM. Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*. 2004; 22(5):741-9.

Zimmermann S, Martens UM. Telomeres, senescence, and hematopoietic stem cells. *Cell Tissue Res*. 2008; 331(1):79-90.

Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, Lagoo A, Reya T. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell*. 2007; 528-41.

Zhou XZ, Lu KP. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell*. 2001; 107(3):347-59.

## Anexos

### Anexo 1

 <p>INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA ALBERT EINSTEIN</p>	<p><b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b></p>	<p>Doação Número</p> <p>_____</p>
---	--	-----------------------------------

**Projeto “Células Tronco”**  
**Grupo “SCRIPTA” (Stem Cell Resource Initiative for Potencial Therapeutic Applications)**

**Informação para a gestante doadora de Sangue de Cordão Umbilical**

O sangue de cordão umbilical é uma fonte rica em um tipo especial de células chamadas de “células-tronco”.

Em nosso Instituto está sendo pesquisada a capacidade destas células em regenerar diversos tipos de tecidos celulares, bem como, a sua utilização para o desenvolvimento de vacinas contra doenças como o câncer. Estes estudos dependem da obtenção das “células-tronco” que estão presentes no sangue de cordão umbilical o qual é normalmente desprezado após o parto. A coleta de sangue de cordão umbilical não interfere no parto ou traz quaisquer risco a você ou ao seu bebê.

**Procedimentos relacionados ao estudo**

**Triagem**

Você deverá responder à um questionário sobre seus antecedentes clínicos.

**Coleta**

Ocorrerá na sala de parto, logo após a secção do cordão e quando o recém nato já se encontrar aos cuidados do pediatra. O sangue será colhido da extremidade do cordão umbilical que permanece ligado à placenta. Não há possibilidade de causar nenhum dano ao bebê ou a você.

**Material coletado**

O material coletado será processado e manipulado em laboratório para a obtenção das células-tronco. Após a realização das pesquisas, todo o material será desprezado, não havendo possibilidade do seu uso futuro.

**Interrupção do estudo**

O estudo pode ser interrompido a qualquer tempo por decisão da equipe médico-científica. Você também pode anular este consentimento a qualquer tempo até o parto.

**Custo do procedimento**

Nem você, nem sua companhia de seguros terão qualquer ônus pelo procedimento.

**Benefícios em participar do estudo**

Não há benefícios diretos para você, ou para seu bebê, com esta pesquisa científica. Entretanto, você estará dando uma importante contribuição para o progresso da ciência médica.

**Confidencialidade**

Apenas a equipe do Estudo e a equipe assistencial terão acesso a seu prontuário. Possíveis publicações científicas resultantes deste estudo não a identificarão, em nenhuma circunstância, como participante.

**Indenização**

Ao assinar este termo, você não abre mão de nenhum direito legal que você teria, em caso de conduta errônea ou negligente de qualquer membro da equipe multiprofissional de saúde que lhe dará assistência durante o estudo.

Contatos:

Médico Responsável:  
Dra. Andreza Alice Feitosa Ribeiro  
Telefone: (xx-11) 37470444

Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa:  
Dr. José Pinus  
Telefone: (xx-11) 37471338

**Eu** \_\_\_\_\_

**RG: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_, declaro que concordo em participar deste protocolo de pesquisa doando o sangue de cordão umbilical e placenta de meu(minha) filho(a) , que será realizado no Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein. Estou ciente que este material será cultivado em laboratório e nunca será utilizado em outro ser humano.**

\_\_\_\_\_  
**Nome da doadora**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura da doadora**

\_\_\_\_\_  
**Nome da testemunha**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura da testemunha**

\_\_\_\_\_  
**Nome do Obstetra**

## Anexo 2

Oligonucleotídeo	Temperatura Anelamento	Tamanho do Produto	Seqüência
TERT 7/9	60°C	277bp	(forward) (5' CAGCACTTGAAGAGGGTG 3') (reverse) (5' CGCAAACAGCTTGTTCTCCATGTC 3')
TNKS	60°C	344bp	(forward) (5' GGATGCTGCTTTGTTGGATG 3') (reverse) (5' GCTGCGTCCTTCCTTTCT G 3')
TNKS2	58°C	434bp	(forward) (5' CAAGGCAGACATTCAACACC 3') (reverse) (5' GCTCCTGGGCTTCTCACA 3')
TRF1	56°C	243bp	(forward) (5' GGAACCCAGCAACAAGAC 3') (reverse) (5' GCAACAGTATTTTAGACCAG 3')
TRF2	60°C	219bp	(forward) (5' GCTTCAGCGCCACCATCCA 3') (reverse) (5' CTCGCTTTCTTCTACAGTCC 3')
POT1	56°C	344bp	(forward) (5' GGTATTCTCCCGCTTTCAA 3') (reverse) (5' GCTTC AGTACTCCTGTTC 3')
CXCR4	62°C	228bp	(forward) (5' CCCTGCCCTCCTGCTGACTATT 3') (reverse) (5' AGGGCCTTGCCTTCTGGTG 3')
SDF1A	62°C	177bp	(forward) (5' AGGTCGTGGTCGTGCTGGTC 3') (reverse) (5' GCCGGGCTACAATCTGAAGG 3')
Nanog	62°C	181bp	(forward) (5' CCTGAAGAAAATATCCATCC 3') (reverse) (5' CCTTGTCTTCCTTTTTTGCGA 3')
Oct4	62°C	191bp	(forward) (5' TGAAGCTGGAGAAGGAGAAG 3') (reverse) (5' GGCAGATGGTCGTTTGGCT 3')
Sox2	62°C	200bp	(forward) (5' CCGCCCCAGCAGACTTC 3') (reverse) (5' CCCCTCCATTTCCCTCG 3')
FoxD3	64°C	198bp	(forward) (5' GCAGAGCCCGCAGAAGAAG 3') (reverse) (5' CGGGTCCAGGTCCAGTAG 3')
GAPDH	60°C	344bp	(forward) (5' GGAGAAGGCTGGGGCTCAT 3') (reverse) (5' GTCCTTCCACGATACCAAAGTT 3')
CD34	60°C	200bp	(forward) (5' TGAAGCCTAGCCTGTCACCT 3') (reverse) (5' CGCACAGCTGGAGGTCTTAT 3')
CD133	60°C	200bp	(forward) (5' CAGTCTGACCAGCGTGAAAA 3') (reverse) (5' GGCCATCCAAATCTGTCCTA 3')
CD45	66°C	149bp	(forward) (5' CAGCAGGAGCTTGTTGAAAGGGATGATG 3') (reverse) (5' AACACCCGCGGGATGCTCTGAAA 3')
CD14	64°C	192bp	(forward) (5' GGCGAACGCGGACTGATGG 3') (reverse) (5' CTCGGAGCGCTAGGGTTTAC 3')