

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**LUCILA HABIB BOURGUIGNON OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE  
CÉLULAS CD34+ E CÉLULAS CD133+ ISOLADAS DE MEDULA  
ÓSSEA E DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL**

**ARARAQUARA – SP  
2008**

**LUCILA HABIB BOURGUIGNON OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE  
CÉLULAS CD34+ E CÉLULAS CD133+ ISOLADAS DE MEDULA  
ÓSSEA E DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas.

Área de concentração: Análises Clínicas  
Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

**ARARAQUARA – SP  
2008**

## **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

O48a Oliveira, Lucila Habib Bourguignon  
Avaliação do perfil de expressão gênica de células CD34+ e células CD133+ isoladas de medula óssea e de sangue de cordão umbilical. / Lucila Habib Bourguignon Oliveira. – Araraquara, 2008.  
110 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Dimas Tadeu Covas

1.Células-tronco hematopoéticas. 2.Células CD34+. 3.Células CD 133+. 4.Sangue do cordão umbilical. 5.Medula óssea. I.Covas, Dimas Tadeu, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Lucila Habib Bourguignon Oliveira**

Avaliação do perfil de expressão gênica de células CD34+ e células CD133+ isoladas de medula óssea e de sangue de cordão umbilical.

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para a obtenção do título de Mestre.  
Área de concentração: Análises Clínicas.

Aprovado em:

## Banca examinadora:

Prof. Dr.

\_\_\_\_\_  
Instituição:

\_\_\_\_\_  
Assinatura:

Prof. Dr.

\_\_\_\_\_  
Instituição:

\_\_\_\_\_  
Assinatura:

Prof. Dr.

\_\_\_\_\_  
Instituição:

\_\_\_\_\_  
Assinatura:

***Dedico este trabalho aos meus pais  
Ewerton e Maria Inês e à minha avó  
Ignês (in memoriam), uma  
professora excepcional e um  
exemplo de mulher.***

## **Agradecimentos**

*Em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida, pela saúde e capacidade concedidas a mim e por me cercar de pessoas tão queridas e fundamentais em minha vida.*

*Aos meus pais, Ewerton e Maria Inês, pelo amor e apoio incondicionais que sempre recebi e por serem os grandes incentivadores das minhas conquistas. Obrigada por compreenderem minhas dificuldades e me fortalecerem nos momentos difíceis. Saibam que cada conquista minha é um triunfo de vocês.*

*Aos meus amados irmãos, Larissa e Gil pelo carinho, compreensão e força.*

*Aos meus avós, Auxiliadora e Messias por serem pessoas incríveis que eu amo tanto. Aos meus avós Ignês (in memoriam) e José Luis (in memoriam) pelo exemplo de vida, honestidade e altruísmo. Às minhas tias Lena e Jane e à Neide pelas palavras de carinho e incentivo.*

*Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas pela orientação, confiança e oportunidade.*

*Ao Prof. Dr. Marco Antonio Zago pela oportunidade de trabalhar com sua equipe.*

*Ao CNPQ, pela bolsa concedida e à FAPESP e à FINEP pelo auxílio financeiro.*

Agradeço ao “nosso lab”, o **Laboratório de Terapia Celular**. Em especial à Maristela Orellana Delgado, por sua grande ajuda desde o início e durante a execução deste trabalho, além da amizade, compreensão e disponibilidade. Às “meninas” do laboratório, Karina Rosa Solano, Sâmia Rigotto Caruso, Thaísa Fernandes e Aline Garcia pelo companheirismo, incentivo, momentos de descontração e boa convivência durante esses 2 anos e meio. À Ane Rose pela paciência e pela ajuda inicial e aos demais integrantes do laboratório.

Ao **Laboratório de Citometria de Fluxo**. À Patrícia Vianna Bonini de Palma e Camila C.B.O. Menezes pela contribuição fundamental neste trabalho.

Ao **Laboratório de Biologia Molecular**. À Prof. Dra. Simone Kashima Haddad e à todos do laboratório pela troca de idéias, solicitude e amizade.

Ao **Laboratório de Transferência Gênica**. À Prof. Dra. Aparecida Maria Fontes e à todos do laboratório pela amizade e contribuições durante o desenvolvimento do projeto.

Ao **laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP** pela oportunidade e por me acolherem nos últimos meses do trabalho.

À Dalila Zanette, Rita de Cassia Viu Carrara, Viviane C Oliveira e Amélia Goes Araujo, pelas participações fundamentais no trabalho e ao Dr. Vergílio Colturato do **Hospital Amaral Carvalho (Jaú)** pela colaboração.

Aos **funcionários da Fundação Hemocentro** que sempre tiveram dispostos a me ajudar, seja por ações ou mesmo um simples sorriso... Especialmente ao Miro, Bernadete, Dalvinha, Sandra Navarro, Cíntia Santos, Rodrigo Gomes e Marco Antônio Martins.

Aos **voluntários** que cederam as amostras de medula óssea e sangue de cordão umbilical. Sem vocês nada disso seria possível...

## Em especial aos amigos...

*Ana Valéria Gouveia de Andrade e Mariana Carolina Sobral por cada dia que vivemos, que rimos, que sofremos e que aprendemos juntas. Agradeço por toda a força e carinho que sempre me deram, me ajudando a superar obstáculos e a prosseguir em frente na luta. Obrigada de coração meninas!!*

*Rodrigo Alexandre Panepucci por ter contribuído substancialmente neste estudo, desde a doação das amostras até as discussões, trocas de idéias e incentivo. Por ter participado ativamente na minha evolução e com quem compartilho os méritos concedidos por esse trabalho. Pela compreensão, carinho, e, principalmente por ter acreditado em mim! Obrigada pela parceria e, acima de tudo, pela amizade. Valeu Querido!!!*

*Bruno Marcos Verbeno pela amizade fiel, pelo esforço em conjunto e por nossos “rabiscos” em papel, sempre grande fonte de inspiração. Obrigada, Bruninho, por tudo!!*

*Paula Barbugli, Aline Ferreira, Fernanda Trigo, Alessandra de Paula Sousa e Luís Garcia, o “teacher”, pela amizade, companheirismo, carinho, conselhos, e, claro, pelas muitas risadas proporcionadas!!*

*Mara Nogueira Martins, Karina Magalhães e a todas as “Marias” que eu guardo sempre no meu coração por todo o carinho e amizades sinceras.*

*Aos meus anjinhos da guarda Livia Paschoal e Átila Soares, por cada palavra de carinho e incentivo. À Neuza Fiori por todas as conversas imprescindíveis para a conclusão desta etapa.*

*Agradeço finalmente á Cláudia, Laura e Sônia da Seção de Pós-Graduação pela paciência, ajuda e solicitude. E também a todos os amigos e familiares que mesmo longe torceram por mim!!!*



*“O segredo não é correr atrás das borboletas.  
É cuidar do jardim para que elas venham até você.”*

Mário Quintana

## Resumo

A maior expressão de alvos transcricionais e componentes da via NFκB é uma característica distintiva das células-tronco hematopoéticas (CTH) CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão umbilical (SCU) comparadas às CTH CD34<sup>+</sup> de medula óssea (MO) e pode estar relacionada com o estado mais primitivo das CTH dos neonatos. No entanto, as células CD34<sup>+</sup> são um grupo heterogêneo de células-tronco (CT) e progenitoras em diferentes estágios de maturação e diferenças na composição celular entre MO e SCU poderiam contribuir para os resultados mencionados. Estudos recentes têm identificado o marcador de superfície CD133, como um marcador de CT mais primitivas, expresso em uma subpopulação de células CD34<sup>bright</sup>, com um sugestivo potencial de hemangioblasto. Com o objetivo de caracterizar a composição celular de MO e SCU e identificar mecanismos moleculares envolvidos com a maior primitividade das células CD133<sup>+</sup>, propusemos avaliar o perfil imunofenotípico (quanto à expressão de CD34 e CD133) por citometria de fluxo e de expressão gênica de células CD34<sup>+</sup> e células CD133<sup>+</sup> selecionadas imunomagneticamente, de ambas as fontes, pelas técnicas de *microarray* e PCR em tempo real. Nossos resultados revelaram que enquanto a maioria das células CD133<sup>+</sup> são CD34<sup>+</sup>, independente da fonte, as células CD34<sup>+</sup> de SCU possuem uma porcentagem significativamente maior de células CD133<sup>+</sup> do que às células CD34<sup>+</sup> de MO. A análise de clusterização revelou que as células CD133<sup>+</sup> de MO se agrupam com as células de SCU (CD34<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>), enquanto as CD34<sup>+</sup> de MO aparecem como um grupo distinto. A comparação dos perfis de expressão gênica entre as células CD133<sup>+</sup> e as células CD34<sup>+</sup>, revelou a hiper-expressão de 47 fatores de transcrição (FT) nas

células CD133+, dentre eles, diversos relacionados à regulação da hematopoese embrionária e à auto-renovação nas CTH, como RUNX1, GATA3, USF1, TAL1, HOXA9 e HOXB4. A análise de promotores destes FT revelou uma frequência de sítios de ligação significativamente maior que o esperado, para fatores da via NFκB, incluindo como potenciais alvos RUNX1, GATA3 e USF1. A avaliação dos FT selecionados bem como de NFκB2, RELB e NOTCH1 por PCR em tempo real revelou que, enquanto a maioria dos transcritos apresentaram níveis de expressão significativamente maior nas células CD133+ de MO, comparados com as células CD34+ de MO, somente USF1, HOXB4 e HOXA9 seguiram o mesmo padrão nas células de SCU. Por sua vez, as células de SCU apresentaram níveis mais elevados de NOTCH1, RELB, RUNX1, TAL1 e HOXB4 comparadas às células de MO para ambas as células, CD34+ e CD133+, indicando que, mesmo a subpopulação de CTH mais primitivas CD133+, apresentam diferenças moleculares intrínsecas relacionadas à fonte de origem. Finalmente, a correlação positiva significativa entre todos os FT avaliados evidenciou uma potencial co-regulação entre os mesmos nas CTH. Em suma nossos resultados sugerem a existência de uma rede de regulação transcricional altamente interconectada, caracterizada pela expressão coordenada de NOTCH, NFκB e outros importantes FT que poderia ser parcialmente responsável pela manutenção de um estado mais primitivo das CTH.

**Palavras-chave:** Células-tronco hematopoéticas, células CD34+, células CD133+, sangue de cordão umbilical, medula óssea, composição celular, perfil de expressão gênica, rede de regulação transcricional.

## Abstract

A higher expression of transcription targets and components of the NF- $\kappa$ B pathway is a distinctive feature of umbilical cord blood (UCB) CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells (HSC) when compared to bone marrow (BM) CD34<sup>+</sup> HSC and this could be related to the more primitive state of the newborn's HSC. However, CD34<sup>+</sup> cells represent a heterogeneous group of cells composed by stem and progenitors cells in different developmental stages, and differences in cellular composition between both sources could contribute for these finding. The surface marker CD133 has been identified as a very primitive marker, expressed in a subpopulation of CD34<sup>bright</sup>, with a proposal hemangioblast potential. Thus, in attempt to better characterize the cellular composition of UCB and BM and to identify molecular mechanisms related to the more primitive characteristics of CD133<sup>+</sup> cells, we proposed to evaluate the immunophenotypic profile (expression of CD34 and CD133) by flow-cytometry and the gene expression profiles of immunomagnetically selected CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup> cells, from both sources, by microarray and Real time PCR. Our results highlighted that, while almost all CD133<sup>+</sup> cells are CD34<sup>+</sup> independently of the evaluated source, the UCB CD34<sup>+</sup> cells showed a significantly higher proportion of CD133 expression, compared to BM CD34<sup>+</sup> cells. After obtaining the expression profiles from distinct HSC pooled samples generated by microarrays, cluster analysis showed that BM CD133<sup>+</sup> cells preferentially grouped with UCB cells (CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup>) instead of BM CD34<sup>+</sup> cells, which appeared as a very distinct profile. The comparison between CD133<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> samples revealed the over-expression of 47 transcriptional factors (TF) in CD133<sup>+</sup> cells, many of them well-known and related to the regulation of

embryonic hematopoiesis and self-renewal of HSC such as RUNX1, GATA3, USF1, TAL1, HOXA9 and HOXB4. Promoter analysis of selected TF revealed a significantly higher frequency of NF- $\kappa$ B binding sites on these genes, than expected by chance, and included potentially novel NF- $\kappa$ B targets such as RUNX1, GATA3 and USF1. The evaluation of transcriptional levels of selected TF, as well as NFKB2, RELB and NOTCH1 by Real Time PCR, revealed that, while almost transcripts showed a significantly higher levels on BM CD133+ cells compared to BM CD34+ cells, only USF1, HOXB4 and HOXA9 showed the same pattern in the comparison between UCB cells. Nevertheless, the UCB cells revealed a significantly higher expression of NOTCH1, RELB, RUNX1 TAL1 and HOXB4 when compared to BM (for both cell populations, CD133+ and CD34+), which indicates that, even the more primitive CD133+ subpopulation cells display intrinsic molecular differences related to the source. Finally, significant positive correlation analysis between all the transcripts evaluated suggest a potential co-regulation of these TF in HSC. Taken together, our results corroborate the existence of a highly interconnected transcriptional network characterized by the coordinated expression of NOTCH, NF- $\kappa$ B and other important TF, that could be, in part, responsible for the maintenance of the more primitive state of HSC cells.

**Keywords:** Hematopoietic stem cells, CD34+ cells, CD133+ cells, umbilical cord blood, bone marrow, cellular composition, gene expression profile, transcription network.

## Lista de Ilustrações

Página

<b>Figura 1:</b> Estratégia adotada para a determinação da expressão dos marcadores CD133 e CD34 em citometria de fluxo .....	40
<b>Figura 2:</b> Desenho experimental utilizado no estudo .....	43
<b>Figura 3:</b> Abordagem experimental da técnica de <i>microarray</i> .....	45
<b>Figura 4:</b> Avaliação da pureza e porcentagem de células CD34+ nas células CD133+ selecionadas .....	53
<b>Figura 5:</b> Porcentagem de células CD133+ nas células CD34+ presente na fração mononuclear .....	54
<b>Figura 6:</b> Enriquecimento da subpopulação celular CD34+CD133+ após a seleção imunomagnética de células CD34+ .....	55
<b>Figura 7:</b> Agrupamento obtido após análise de clusterização hierárquica .....	61
<b>Figura 8:</b> Fatores de transcrição hiper-expressos nas células CD133+ comparadas às células CD34+ .....	64
<b>Figura 9:</b> Sítios de ligação para NFκB e os potenciais alvos transcricionais encontrados hiper-expressos nas células CD133+.....	66
<b>Figura 10:</b> Validação das diferenças encontradas nas análises de <i>microarrays</i> por PCR em tempo real .....	67
<b>Figura 11:</b> Níveis de expressão gênica avaliados por PCR em tempo real ....	68
<b>Figura 12:</b> Análise de correlação entre os transcritos NOTCH1, RUNX1, GATA3 e HOXA9 .....	70

**Figura 13:** Análise de correlação entre os transcritos NOTCH1, GATA3, RELB ..... 71

**Figura 14:** Análise de correlação entre os transcritos HOXB4 e HOXA9 e entre os transcritos NFkB2 e RELB ..... 71

**Figura 15:** Rede de regulação gênica interconectando diferentes fatores de transcrição relacionados à primitividade das CTH ..... 90

## Lista de Tabelas

Página

<b>Tabela 1:</b> Amostras utilizadas para confecção dos <i>pools</i> de células CD133+ de sangue de cordão umbilical.....	56
<b>Tabela 2:</b> Amostras utilizadas para confecção das dos <i>pools</i> de células CD133+ de medula óssea.....	57
<b>Tabela 3:</b> Amostras utilizadas para confecção dos <i>pools</i> de células CD34+ de sangue de cordão umbilical.....	58
<b>Tabela 4:</b> Amostras de células CD133+ utilizadas para os estudos de expressão gênica por PCR em Tempo Real.....	59
<b>Tabela 5:</b> Coeficientes de correlação entre os transcritos avaliados.....	69



## Lista de Abreviaturas e Siglas

- **µg** = micrograma
- **µL** = microlitro
- **µm** = micrometro
- **ACD** = do inglês "*Acid Citrate Dextrose*"
- **Am** = Amostras
- **Anti-CD133** = referente ao anticorpo contra o antígeno CD133
- **Anti-CD34** = referente ao anticorpo contra o antígeno CD34
- **Arrays** = referente aos microarranjos, do inglês "*microarrays*"
- **BM** = do inglês "*Bone Marrow*"
- **BS** = do inglês "*Binding Sites*"
- **CD** = do inglês "*Cluster of Differentiation*"
- **CD133+** = referente às células que expressam o marcador CD133
- **CD34+** = referente às células que expressam o marcador CD34
- **CD38-** = referente às células com ausência do marcador CD38
- **cDNA** = do inglês "*Complementary Desoxiribonucleic Acid*"
- **CMN** = Células Mononucleares
- **CPD** = do inglês "*Citrate Phosphate Dextrose*"
- **CPE** = Células Progenitoras Endoteliais
- **cRNA** = do inglês "*Complementary Ribonucleic Acid*"
- **CTH** = Células-Tronco Hematopoéticas
- **CTM** = Células-Tronco Mesenquimais
- **Cy5** = do inglês "*Cyanin 5*"
- **DECH** = Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro"
- **DEPC** = Dietilpirocarbonato
- **DNA** = do inglês "*Desoxiribonucleic Acid*"
- **dNTP** = Desoxi-Nucleotídeo Trifosfato
- **EB** = do inglês "*Embryoid Bodies*"
- **FACS** = do inglês "*Fluorescence-Activated Cell Sorter*"
- **FDR** = do inglês "*False Discovery Rate*"
- **FITC** = do inglês "*Fluorescein Isothiocyanate*"
- **FSC** = do inglês "*Forward Scatter*"
- **FT** = Fator de Transcrição

- **GVHD** = do ingles “*Graft Versus Host Disease*”
- **HCRP** = Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
- **HLA** = do ingles “*Human Leukocyte Antigen*”
- **IgG1** = Imunoglobulina Gama Isotipo 1
- **IgG2A** = Imunoglobulina Gama Isotipo 2A
- **kD** = kilodalton
- **KDR** = do inglês “*kinase insert domain receptor*”
- **Log** = logaritmo
- **LTC-IC** = do inglês “*Long-Term Culture-Initiating Cells*”
- **mL**=mililitro
- **MO** = medula óssea
- **NFκB** = do inglês “*Nuclear Factor kappa B*”
- **ng** = nanograma
- **nm** = nanometro
- **NOD/SCID**= do inglês “*Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient*”
- **pb** = pares de base
- **PBS** = do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”
- **PCR** = do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”
- **PE** = do inglês “*Phycoeritrin*”
- **Pop**= População
- **R1** = Região 1 (representa a população celular delimitada)
- **RNA** = do inglês “*Ribonucleic Acid*”
- **rpm** = rotações por minuto
- **SAM** = do inglês “*Significance Analysis of Microarrays*”
- **SCU** = Sangue de Cordão Umbilical
- **SSC**= do inglês “*Side Scatter*”
- **TA** = Temperatura Ambiente
- **TELIS** = do inglês “*Transcription Element Listening System*”
- **TMO** = Transplante de Medula Óssea
- **UCB**= do inglês “*Umbilical Cord Blood*”
- **USP** = Universidade de São Paulo
- **UTP** = do inglês “*uridine-5'-triphosphate*”
- **VEGFR2** = do inglês “*Vascular Endothelial Grow Factor*”

## **Nota sobre a nomenclatura de genes**

Devido à sua natureza, o presente trabalho inclui grande número de nomes de genes, cujos nomes serão mantidos em inglês, seguindo a nomenclatura do HUGO (*Human Genome Organization*), como por exemplo NFKB2 (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2*), RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*) e USF1 (*upstream transcription factor 1*).

# Sumário

	Página
<b>1. Introdução.....</b>	<b>22</b>
1.1 <i>Células-tronco hematopoéticas – CTH e hematopoese fetal e adulta....</i>	23
1.2 <i>Caracterização das CTH .....</i>	24
1.3 <i>O uso das CTH em transplantes .....</i>	25
1.4 <i>O sangue de cordão umbilical como fonte alternativa.....</i>	26
1.5 <i>Diferenças na expressão gênica entre células CD34+ de SCU e MO....</i>	27
1.6 <i>As células CD133+.....</i>	29
1.7 <i>Delineamento do estudo.....</i>	30
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
2.1 <i>Objetivo geral .....</i>	33
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	33
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>34</b>
3.1 <i>Aspectos éticos .....</i>	35
3.2 <i>Coleta de sangue de cordão umbilical.....</i>	35
3.3 <i>Coleta da medula óssea.....</i>	35
3.4 <i>Isolamento das células mononucleares.....</i>	36
3.5 <i>Seleção imunomagnética de células CD133+ e células CD34+ .....</i>	37
3.6 <i>Citometria de fluxo.....</i>	38
3.7 <i>Extração do RNA.....</i>	40
3.8 <i>Quantificação e análise da qualidade do RNA .....</i>	41
3.9 <i>Microarrays de oligonucleotídeos.....</i>	42
3.9.1 <i>Formação dos pools de RNA.....</i>	42
3.9.2 <i>A técnica de microarray .....</i>	44
3.9.3 <i>Obtenção e análise das imagens.....</i>	46
3.10 <i>Análises Bioinformáticas.....</i>	47
3.10.1 <i>Clusterização hierárquica.....</i>	47
3.10.2 <i>Seleção de genes diferencialmente expressos.....</i>	47
3.10.3 <i>Análise de Promotores.....</i>	48
3.11 <i>PCR em tempo real.....</i>	49

<b>4. Resultados</b> .....	<b>52</b>
4.1 <i>Caracterização por citometria de fluxo</i> .....	53
4.1.1 Pureza e co-expressão de CD34 nas células CD133+ .....	53
4.1.2 Co-expressão de CD133 nas células CD34+.....	54
4.2 <i>Seleção das amostras para os experimentos de microarrays</i> .....	56
4.2.1 Células CD133+ de sangue de cordão umbilical.....	56
4.2.2 Células CD133+ de medula óssea.....	57
4.2.3 Células CD34+ de sangue de cordão umbilical .....	58
4.2.4 Células CD34+ de medula óssea.....	58
4.3 <i>Amostras utilizadas no PCR em tempo real</i> .....	59
4.3.1 Amostras CD133+ de SCU .....	60
4.3.2 Amostras CD133+ de MO.....	60
4.3.3 Amostras CD34+ de MO e SCU .....	60
4.4 <i>Perfis de expressão gênica</i> .....	61
4.4.1 Análise de Clusterização .....	61
4.4.2 Genes diferencialmente expressos entre as células CD34+ e as células CD133+ e seleção dos fatores de transcrição .....	62
4.5 <i>Análise de promotores</i> .....	65
4.6 <i>PCR em tempo real</i> .....	67
4.6.1 Análise de Correlação entre os transcritos .....	69
<b>5. Discussão</b> .....	<b>72</b>
5.1 <i>Diferenças na composição celular entre as CTH de MO e SCU</i> .....	73
5.2 <i>Similaridade entre as células CD133+ de MO e as células de SCU</i> .....	74
5.3 <i>Enriquecimento de CD133 nas células CD34+ após seleção imunomagnética</i> .....	75
5.4 <i>Fatores de transcrição hiper-expressos nas células CD133+</i> .....	76
5.4.1 TAL1 .....	77
5.4.2 RUNX1 .....	78
5.4.3 Genes HOX.....	79
5.4.4 USF1.....	83
5.4.5 GATA-3 .....	83
5.5 <i>Análise de promotores e a participação da via NFκB</i> .....	84

5.6 Avaliação dos transcritos por PCR em tempo real e análise de correlação .....	85
5.7 Evidências de uma potencial rede de regulação transcricional nas CTH.....	89
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>91</b>
<b>Referências.....</b>	<b>94</b>
<b>Apêndices .....</b>	<b>108</b>
APÊNDICE A: <i>Fatores de transcrição hiper-expressos nas células CD133+ quando comparadas às células CD34+.....</i>	109
APÊNDICE B: <i>P valores obtidos da análise estatística entre os diferentes grupos. ....</i>	111

# **1. Introdução**

Nos últimos anos, as células-tronco têm recebido grande destaque devido à sua potencial utilização terapêutica em diversas doenças. Enquanto a maioria dessas aplicações ainda se encontram em um campo experimental, alguns procedimentos já estão incorporados na clínica médica e utilizados com sucesso na terapêutica, como por exemplo, o transplante de células-tronco hematopoéticas (CTH), mais conhecido como transplante de medula óssea.

### **1.1 Células-tronco hematopoéticas – CTH e hematopoese fetal e adulta**

As células-tronco hematopoéticas (CTH) são um grupo de células sanguíneas imaturas capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares encontrados no sangue periférico como os granulócitos, linfócitos e eritrócitos. Como propriedades fundamentais das células-tronco, as CTH possuem a capacidade de diferenciação, ou seja, são capazes de se diferenciar em progenitores que dão origem a células especializadas, bem como a capacidade de sofrer auto-renovação, dando origem a células idênticas, permitindo a manutenção do *pool* de células indiferenciadas no compartimento hematopoético (MAYANI & LANSDORP, 1998).

A hematopoese constitui o processo de produção contínua de elementos figurados no sangue e tem início precoce no embrião, podendo ser classificada como primitiva ou definitiva. A hematopoese primitiva é caracterizada pelo surgimento das primeiras células sanguíneas, cerca do 20º dia após a fertilização, localizada no saco vitelínico (extra-embriônico) e a hematopoese definitiva tem início pouco depois, em uma região chamada aorta gônado-



mesonefros (AGM) (DZIERZAK, 1999). Enquanto a primeira é transitória, gerando apenas células da linhagem eritróide, a segunda é capaz de originar todas os tipos celulares sanguíneos encontrados no indivíduo adulto (PALIS & YODER, 2001).

Durante o desenvolvimento embrionário, as CTH definitivas são encontradas predominantemente em órgãos como o fígado e o baço. Ao se aproximar a época do nascimento, essas células migram pela corrente sanguínea, desses órgãos primários, para a medula óssea (MO) onde se fixará a hematopoese definitiva no adulto. Na MO, as CTH encontram um micro-ambiente capaz de sustentar a constante renovação do tecido sanguíneo, através da interação com as células-tronco mesenquimais (CTM). Estas células têm o potencial de se diferenciarem em adipócitos, condrócitos, osteócitos e células estromais formando a micro-arquitetura da MO e fornecem sinais às CTH, por meio de fatores secretados, que auxiliam hematopoese (DEANS & MOSELEY, 2000; GRONTHOS et al., 1994; PITTENGER et al., 1999). Também durante o desenvolvimento, as CTH migram para órgãos linfóides como o timo onde se inicia a produção de linfócitos T (SPITS, 2002).

## **1.2 Caracterização das CTH**

Do ponto de vista morfológico, as CTH não podem ser diretamente identificadas. No entanto, é possível caracterizá-las através da presença de determinados marcadores (ou antígenos) na superfície celular, bem como pela ausência de expressão de outros marcadores. A ligação desses antígenos com

anticorpos conjugados a moléculas de fluorocromos, e posterior análise em citometria de fluxo permite, assim, a caracterização dessas células.

A ausência de marcadores específicos dificulta a identificação da “verdadeira” CTH, embora saiba-se que elas fazem parte das células mononucleares (CMN) do tecido hematopoético (medula óssea), e estão enriquecidas em uma sub-população de células caracterizadas imunofenotipicamente como células CD34+ (CIVIN et al., 1984; SUTHERLAND & KEATING, 1992).

O antígeno CD34 é uma glicoproteína integral de membrana com 385 aminoácidos e cerca de 116 kD. O domínio N-terminal extracelular possui os epítomos que interagem com os anticorpos utilizados na identificação e/ou purificação das células CD34+. Acredita-se que esta proteína tenha a função de adesão celular, controlando a localização destas células por interações com proteínas de membrana de outras células (HEALY et al., 1995; SUTHERLAND et al., 1992). Diversos estudos clínicos utilizando as células CD34+, revelaram a importância desse antígeno que foi, durante muito tempo, o principal marcador utilizado na definição dos progenitores hematopoéticos (KRAUSE et al., 1996). De fato, as CTH CD34+ possuem uma capacidade 100 vezes maior de reconstituir a hematopoese em camundongos NOD/SCID do que células CD34-, em transplantes intravenosos (GAO et al., 2001).

### **1.3 O uso das CTH em transplantes**

A utilização das CTH em transplantes para fins terapêuticos existe a mais de 40 anos. Os primeiros transplantes foram realizados com CTH de MO

visando a reconstituição do sistema hematopoético de indivíduos submetidos a regimes de quimioterapia no tratamento de doenças neoplásicas, hematológicas ou não (THOMAS et al., 1957; THOMAS et al., 1959). Desde então as células de MO vêm sendo utilizadas no tratamento de diversas doenças e sem dúvida é hoje uma importante fonte para obtenção de CTH. No entanto, o sucesso dos transplantes com células de MO depende, entre outros fatores, da compatibilidade entre doador e receptor e, muitas vezes, a demora em encontrar um doador compatível, quando possível, torna-se um processo de grande sofrimento, levando à busca de outras fontes de CTH para os transplantes.

#### **1.4 O sangue de cordão umbilical como fonte alternativa**

Recentemente, o sangue de cordão umbilical (SCU) passou a ser considerado uma fonte alternativa válida, tanto para adultos como para crianças (ROCHA et al., 2004). O primeiro transplante de células hematopoéticas de SCU foi realizado em 1989 para a reconstituição do sistema hematopoético de uma criança com anemia de Fanconi (GLUCKMAN et al., 1989). Desde então, o SCU tem sido alvo de importantes estudos, apresentando algumas vantagens em relação à MO como, por exemplo, a fácil coleta (procedimento não invasivo e indolor ao doador) e a possibilidade da criação de bancos de sangue de cordão umbilical e placentário, aumentando as chances de se encontrar material HLA-compatível quando surge o paciente que necessita do transplante (WAGNER et al., 1992).

No entanto, os resultados pós transplante com células do SCU diferem daqueles realizados com células de MO, com uma menor incidência da doença

do enxerto contra o hospedeiro (DECH ou GVHD-*graft versus host disease*) mas com uma demora no enxertamento e restabelecimento de células do sistema imune, mais especificamente de neutrófilos, nos pacientes transplantados com as células do SCU (ROCHA et al., 2004). Também os transplantes realizados com as CTH dos neonatos proporcionam uma melhor reconstituição dos progenitores hematopóéticos mais primitivos e comprometidos em comparação com os realizados com CTH de MO, indicando que CTH de SCU privilegiariam a auto-renovação às custas de diferenciação e maturação (FRASSONI et al., 2003).

### **1.5 Diferenças na expressão gênica entre células CD34+ de SCU e MO**

Com o intuito de esclarecer as bases moleculares das diferenças funcionais entre as CTH de MO e de SCU, foi realizado um amplo estudo em nossos laboratórios, no qual foram analisados em uma escala global, os genes diferencialmente expressos entre as células CD34+ de MO e SCU. Os resultados obtidos permitiram destacar uma acentuada sinalização constitutiva da via *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), com uma maior expressão de componentes centrais e alvos transcricionais, como uma característica distintiva das células CD34+ de SCU quando comparadas às células CD34+ da MO (PANEPUCCI et al., 2007).

Conhecida por desempenhar papéis importantes na biologia das células do sistema imune (BEINKE & LEY, 2004) e na sobrevivência das CTH (PYATT et al., 1999), a sinalização de NF $\kappa$ B atua por duas vias: a clássica ou canônica

(mediada pelas subunidades proteicas RELA e NFkB1), e a não-canônica ou constitutiva (mediada por RELB e NFkB2). Enquanto a última é responsável pela ativação continuada de NF-kB, a primeira pode influenciar a duração e amplitude desta ativação (BEINKE et al., 2004).

Além dos componentes centrais da via NFkB no conjunto de genes hiper-expressos nas células CD34+ de SCU, também foram encontrados ativadores dessa via como, por exemplo o NOTCH1, que apresenta um papel central no controle da timopoese, favorecendo a diferenciação de progenitores linfóides em células T (DE SMEDT et al., 2002). Adicionalmente, a ativação da via Notch está relacionada com o aumento da capacidade de auto-renovação das CTH em ensaios de repopulação *in vivo* por longos períodos após transplante (STIER et al., 2002).

O aumento na expressão de NFkB1 em populações de CTH mais primitivas já havia sido observado por Shojaei e col, em linha com os resultados relatados por Panepucci e col. que destacou, ainda, a possível relação da via constitutiva (não canônica) NF-kB, mediada por altos níveis de NFkB2 e RELB, com o estado mais primitivo das CTH CD34+ encontradas no SCU (PANEPUCCI et al., 2007; SHOJAEI et al., 2004).

No entanto, as células caracterizadas pelo marcador CD34, constituem um grupo heterogêneo de células-tronco e progenitoras em diferentes estágios de maturação (BURT, 1999; MAYANI & LANSDORP, 1998). Diferenças na composição das subpopulações de células CD34+ de MO e SCU, com uma maior proporção de células mais primitivas no SCU poderiam, assim, explicar parte dos resultados encontrados.

## 1.6 As células CD133+

Com o objetivo de identificar células progenitoras mais primitivas, muitos grupos definiram subpopulações de células CD34+ com base na expressão de outros antígenos de superfície. Assim, subpopulações mais primitivas de CTH foram posteriormente definidas pela ausência (ou baixa expressão) de marcadores como CD38 (TERSTAPPEN et al., 1991) ou pela presença de marcadores como KDR (ZIEGLER et al., 1999) ou CD133 (YIN et al., 1997).

Embora ainda de função desconhecida, a molécula CD133 (também conhecida como AC133) é uma glicoproteína transmembrana de 865 aminoácidos, encontrada em uma subpopulação das células CD34<sup>bright</sup> (com alta expressão de CD34) de fígado fetal, medula óssea, sangue de cordão umbilical e sangue periférico mobilizado (YIN et al., 1997; SHMELKOV et al., 2005). Caracterizadas como uma sub-população de células-tronco mais primitivas, as células CD34+CD133+ demonstram ter maior capacidade de gerar progenitores em cultura de células por longo período (LTC-IC, *long-term culture-initiating cells*) do que as células CD34+CD133-. Também possuem capacidade de recuperação da hematopoese em camundongos NOD/SCID letalmente irradiados, após transplante intra-venoso (DE WYNTER et al., 1998). Adicionalmente, o potencial de repopulação das células CD34+CD133+ por longos períodos foi demonstrado em modelos de transplante de medula em fetos de ovelhas (YIN et al., 1997). Em ambos os estudos, não foi demonstrado a presença de células CD133+ que não expressasse o marcador CD34, embora células CD133+CD34- que, apesar de raras, são capazes de se diferenciar em células CD133+CD34+ (BHATIA, 2001).

Além da identificação de CTH, a molécula CD133 é utilizada como marcador de células progenitoras endoteliais (CPE). Presente na superfície de progenitores endoteliais VEGFR2+ (ou KDR+), o CD133 tem sua expressão diminuída conforme a maturação dessas células (PEICHEV et al., 2000). No mesmo ano, Gehling e col., demonstraram que células CD133+ eram capazes de se diferenciarem em células endoteliais *in vitro* e *in vivo* (GEHLING, 2006), e em 2002, Grant e col. demonstraram que o transplante de uma única célula da MO era capaz de promover a reconstituição da MO e a neovascularização retiniana (GRANT et al., 2002).

Em resumo, esses estudos indicam a existência de uma célula-tronco do adulto mais primitiva, caracterizada pelo marcador CD133, com capacidade de regenerar a hematopoese bem como de promover ao mesmo tempo a vasculogênese, razão pela qual tem sido proposto denominá-las, a exemplo do que ocorre com células com esta mesma característica no embrião, de hemangioblastos (BAILEY et al., 2004; GEHLING, 2006).

### **1.7 Delineamento do estudo**

A exata proporção dos diferentes subtipos de CTH, caracterizadas pela expressão de CD34 e CD133 na medula óssea e no sangue de cordão umbilical não é conhecida. Da mesma forma, não se sabe se eventuais diferenças nesta proporção se reflete na expressão diferencial de genes que poderiam explicar o comportamento distinto observado clinicamente nos transplantes realizados com CTH derivadas da MO ou do SCU.

---

O nosso objetivo neste estudo foi caracterizar as populações de CTH presentes na MO e SCU com relação à expressão de CD34 e CD133 e ao perfil de expressão gênica em larga escala, este último com o intuito de identificar os mecanismos moleculares relacionados à maior primitividade das células CD133+.



## **2. Objetivos**

## **2.1 Objetivo geral**

- Isolar, caracterizar e avaliar o perfil de expressão gênica em larga escala de células CD34+ e CD133+ derivadas de medula óssea e de sangue de cordão umbilical.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Isolar as CTH de medula óssea e de sangue de cordão umbilical.
- Caracterizar a composição celular de ambas as fontes, quanto à expressão dos marcadores CD34 e CD133.
- Avaliar o perfil de expressão gênica das células CD34+ e CD133+ de medula óssea e de sangue de cordão umbilical pela técnica de *microarray*.
- Identificar os genes diferencialmente expressos entre as células CD34+ e CD133+ de ambas as fontes.
- Identificar possíveis mecanismos de regulação envolvidos nas diferenças observadas.
- Validar as diferenças observadas por PCR quantitativo em tempo real.

### **3. Material e Métodos**

### **3.1 Aspectos éticos**

As amostras de sangue de cordão umbilical e de medula óssea foram obtidas com consentimento após total esclarecimento dos doadores, de acordo com os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da USP de Ribeirão Preto sob os processos HCRP n° 2146/2008, n° 6775/2002 e n° 4727/2001.

### **3.2 Coleta de sangue de cordão umbilical-SCU**

As coletas de SCU foram realizadas pela equipe de obstetrícia do hospital MATER em Ribeirão Preto. O sangue foi coletado utilizando-se técnicas de assepsia imediatamente após o parto e secção do cordão umbilical e posteriormente à dequitação da placenta. Foi feita a punção da veia umbilical com uma agulha acoplada à uma bolsa de coleta (JP indústria farmacêutica, Ribeirão Preto, SP, Brasil) devidamente identificada, contendo 25 mL de solução anticoagulante CPD (*citrate phosphate dextrose*). As bolsas foram mantidas a 4°C e processadas num período de até 6 horas após a coleta.

### **3.3 Coleta da medula óssea-MO**

As amostras de MO foram obtidas de doadores normais, com idade mínima de 18 anos e máxima de 60 anos, recrutados dentre os doadores de medula óssea para transplante de medula (TMO) alogênico.

As coletas foram feitas através da punção aspirativa da crista ilíaca posterior ou anterior, após anti-sepsia e anestesia local. Do volume total

aspirado, uma alíquota de 20 a 40 mL era separada e acondicionada em tubos com anticoagulante heparina (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) para a realização dos experimentos propostos. Os procedimentos de coleta foram realizados no hospital Amaral de Carvalho (Jaú-SP), no serviço de transplante de medula óssea e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. Em geral, as amostras foram processadas num período de até 6 horas após a coleta.

### **3.4 Isolamento das células mononucleares**

As células mononucleares (CMN) de SCU e de MO foram isoladas pelo gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Amershan Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA). Considerando a necessidade de amostras com alta pureza para análise de expressão gênica, o protocolo de Ficoll padrão foi modificado a fim de elevar a pureza final e otimizar os resultados obtidos. Neste sentido, primeiramente era realizada uma pré-centrifugação a 300g por 10 minutos, com o intuito de retirar parte das plaquetas contidas no aspirado de MO e principalmente no plasma do SCU. Em seguida as amostras eram então diluídas na proporção 1:2 em tampão fosfato salina, PBS (*phosphate buffered saline*) + 0,6% ACD (*acid citrate dextrose*) e após homogeneização, era feito a adição de 13 mL de Ficoll na parte inferior de cada tubo, de maneira vagarosa, com a conseqüente formação de duas fases: uma fase orgânica (inferior), composta pela solução de Ficoll e uma fase aquosa (superior), composta pela amostra (suspensão celular diluída). Em seguida, as amostras eram submetidas à centrifugação a 800g por 30 minutos à temperatura ambiente

(TA) de modo que ao final, podia-se observar a formação de um anel, entre as fases, composto por CMN, bem como um *pellet* celular no fundo do tubo, composto pelas demais células (polimorfonucleares e células da linhagem eritróide).

As CMN presentes na interface Ficoll-fase aquosa eram então cuidadosamente coletadas, transferidas para novos tubos e lavadas duas vezes com PBS + 0,6% ACD. Considerando o elevado número de eritroblastos presentes no sangue de cordão umbilical, como segundo passo adicional, era feito a lise das hemáceas, no qual o *pellet* proveniente da última lavagem era ressuspenso em solução de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) e incubado em banho de gelo por um período de 10 a 15 minutos. Em seguida era adicionado 30 mL de solução de PBS + 5% de albumina humana e realizadas mais duas lavagens com essa solução. Após as lavagens, as células eram ressuspenso em tampão de coluna contendo PBS + 0,6% de ACD + 0,5% albumina e contadas em câmara de Newbauer.

### **3.5 Seleção imunomagnética de células CD133+ e células CD34+**

As células CD133+ e CD34+ foram selecionadas (ou purificadas) imunomagneticamente utilizando o *kit* MACS para seleção positiva (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemanha). Resumidamente as células mononucleares eram incubadas com anticorpos monoclonais anti-AC133 ou anti-CD34 acoplados a partículas magnéticas (*beads*). As células eram então passadas em uma coluna de separação magnética LS (MACS® Miltenyi Biotec)

sob o campo magnético de um potente ímã SuperMACS (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemanha), levando à retenção das células CD133+ ou CD34+ marcadas magneticamente. A coluna ainda sob o campo magnético era lavada eliminando as células não marcadas, sendo então retirada do campo para eluição das células CD133+ ou CD34+. Ao final do procedimento, as células eram novamente contadas em câmara de Neubauer e cerca de  $2 \times 10^5$  células eram separadas para análise em citometria de fluxo. As demais células eram utilizadas para a extração do RNA.

### **3.6 Citometria de fluxo**

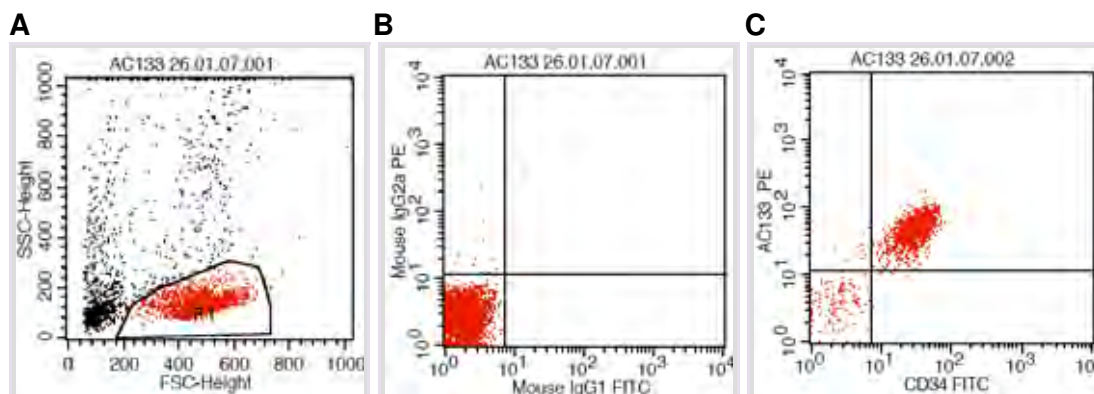
A avaliação da pureza final e a caracterização da composição celular das CTH de MO e SCU, a fim de definir qual a extensão da co-expressão de CD133 e CD34 nas populações definidas por estes marcadores, foram realizadas por citometria de fluxo. A aquisição e análise dos eventos foi feita com o citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) utilizando o software específico CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Em resumo, como protocolo de marcação, cerca de  $2 \times 10^5$  células totais mononucleares ou imunomagneticamente selecionadas (CD34+ ou CD133+) eram ressuspensas em 200 $\mu$ l de PBS, divididas em duas alíquotas de 100 $\mu$ l e incubadas separadamente em dois tubos, um controle e um teste. Ao tubo teste eram adicionados 3 $\mu$ l do anticorpo anti-AC133 conjugado ao fluorocromo PE (*phycoerythrin*) (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemanha) seguida da adição de 3 $\mu$ l do anticorpo anti-CD34 conjugado ao FITC (*fluorescein isothiocyanate*) (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e ao tubo controle era

adicionado 3 $\mu$ l da solução de anticorpos controles inespecíficos  $\gamma$ 1 conjugado a FITC (isotipo IgG1) e  $\gamma$ 2 conjugado a PE (isotipo IgG2<sub>A</sub>) (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA).

Como as células haviam sido selecionadas imunomagneticamente utilizando anticorpos anti-AC133 (AC133-1) ou anti-CD34 (clone QBEND/10) foram utilizados anticorpos monoclonais anti-AC133 (AC133-2) e anti-CD34 (clone 8G12) diferentes, que reconhecem epitopos distintos.

Os tubos eram então incubados sob a proteção de luz por 20 minutos e, logo após, eram adicionados 2 ml de PBS e centrifugados a 1800 rpm por 5 minutos. O sobrenadante era descartado e o *pellet* de células era ressuspenso em 200  $\mu$ l de PBS seguida da aquisição das células em citômetro (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) ou adição de 200  $\mu$ l de PBS + formol, para posterior análise. Cerca de 10.000 a 50.000 eventos eram adquiridos e plotados em função dos parâmetros de FSC (*forward scatter*), que corresponde ao tamanho da célula e SSC (*side scatter*), que corresponde à granularidade. De acordo com esses parâmetros, os eventos correspondentes às células com perfil linfocitário típico de células progenitoras, já estabelecido em nossos laboratórios, eram selecionados, constituindo a *gate* R1, enquanto os eventos não selecionados corresponderiam a artefatos ou debris (Figura 1A). As células selecionadas em R1 eram então plotadas em um *dot plot* onde o sinal das células marcadas com  $\gamma$ 1 e  $\gamma$ 2 era utilizado para a calibração do aparelho (Figura 1B). Por fim, as células marcadas com os anticorpos CD34-FITC e AC133-PE eram lidas em um novo *dot plot* para a quantificação do sinal de fluorescência (Figura 1C).





**Figura 1: Estratégia adotada para a determinação da expressão dos marcadores CD133 e CD34 em citometria de fluxo.** Durante a aquisição das células, foi desenhada uma *gate* na população de progenitores linfocitários (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC) (A). Os *dot plots* revelam a marcação dos eventos selecionados por R1, para os isotipos controles IgG1/IgG2a (B) e para o sinal de CD34-FITC e CD133-PE (C).

### 3.7 Extração do RNA

A extração do RNA foi realizada pelo método do Trizol, o qual é constituído de uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe a célula mantendo a integridade do RNA total. Depois de selecionadas, as células CD133+ ou CD34+ eram centrifugadas e ressuspensas em 250  $\mu$ l de PBS previamente tratado com DEPC (Dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) + 750 $\mu$ l da solução de Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A mistura era completamente homogeneizada com uma pipeta, transferida para um tubo de microcentrifuga e em seguida armazenada em freezer a -80 °C. No momento da extração, as amostras eram descongeladas e a cada tubo eram adicionados 10 $\mu$ L de glicogênio (10  $\mu$ g/ $\mu$ L) seguido de 200  $\mu$ L de clorofórmio puro. O tubo era então incubado por 15 minutos a TA e após esse período era feita uma agitação

vigorosa em vórtex por 10 segundos. Na seqüência, o tubo era centrifugado a 14.000 g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa (fase superior) que se formava era transferida para um novo tubo, evitando-se a coleta da interface entre fase aquosa/fase orgânica, composta por proteínas. Em seguida era adicionado 500 µL de álcool isopropílico gelado para a precipitação do RNA. A mistura era então homogeneizada e incubada à temperatura -20°C por cerca 12 horas (ou *overnight*). Após esse período, o tubo era centrifugado a 14.000 g por 15 minutos a 4°C descartando-se o sobrenadante. O RNA era então lavado com a adição de 1 mL de etanol 75% para a retirada de sais. Em seguida o tubo era agitado e centrifugado a 14.000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Ao final, o *pellet* de RNA obtido era deixado secar, para a evaporação do etanol e logo em seguida era ressuspenso em água (tratada com DEPC) e armazenado em freezer a -80 °C até ser utilizado.

### **3.8 Quantificação e análise da qualidade do RNA**

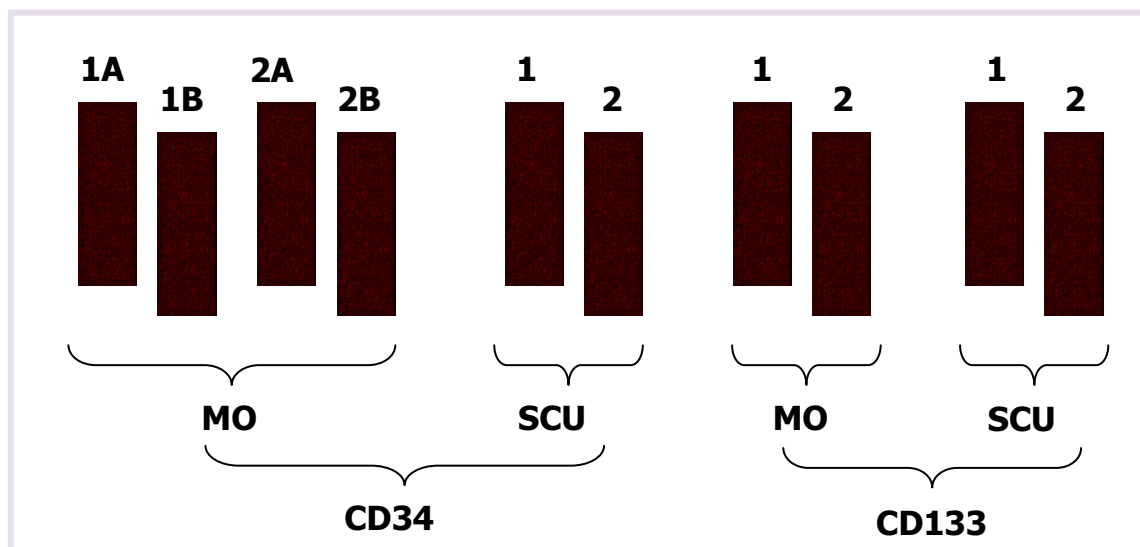
O RNA total obtido das amostras foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 260 nm, utilizando uma equivalência de 40 µg/mL para 1 unidade de Absorbância. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 a 1,8. Finalmente, a integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio para a visualização das bandas de RNA ribossomal 18S e 28S.

### **3.9 *Microarrays de oligonucleotídeos***

O *microarray* é uma técnica de biologia molecular que permite a análise da expressão gênica em larga escala (milhares de genes simultâneos) e possibilita a comparação direta do perfil transcricional gerado entre diferentes amostras. Neste sentido, as análises do perfil de expressão gênica das células CD133+ e CD34+ selecionadas foram realizadas utilizando a plataforma comercial de *microarray* Amersham *CodeLink UniSet Human I BioArrays* (GE Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), contendo cerca de 10.000 genes.

#### **3.9.1 Formação dos *pools* de RNA**

Com exceção das amostras CD34+ de MO, cujos resultados foram obtidos de um estudo realizado anteriormente em nossos laboratórios (dados não publicados), o RNA total das células CD34+ de SCU e das células CD133+ de MO e de SCU foi agrupado de modo a obter-se *pools* contendo RNA de diferentes amostras de acordo com a Figura 2.



**Figura 2: Desenho experimental utilizado no estudo.** Cada lâmina corresponde a um *pool* de amostras (1=*pool* 1 e 2=*pool* 2), com exceções das lâminas 1A/B e 2A/B, que correspondem a amostras únicas em duplicata experimental (A e B) de CD34+ de MO, cujos resultados foram obtidos de um estudo prévio.

A opção em se trabalhar com *pools* teve como objetivo permitir a obtenção de uma quantidade adequada de RNA para os experimentos de *microarrays* e, ao mesmo tempo, reduzir o impacto da variação biológica, já que com a utilização de um número maior de amostras por *array*, os níveis de expressão obtidos para os diferentes genes correspondem a uma média da expressão gênica das diferentes amostras. Assim, apesar do número reduzido de *arrays* por tipo celular, as diferenças observadas representam, de maneira mais aproximada, o que se observaria em um número maior de amostras. Neste sentido, o número total de amostras utilizadas para cada um dos *pools* de CD133+ de MO, CD133+ de SCU e CD34+ de SCU foram 5, 4 e 3, respectivamente.

As amostras de cada *pool* foram selecionadas de forma que a pureza final do mesmo estivesse acima de 90%. Para o cálculo da pureza do *pool*,

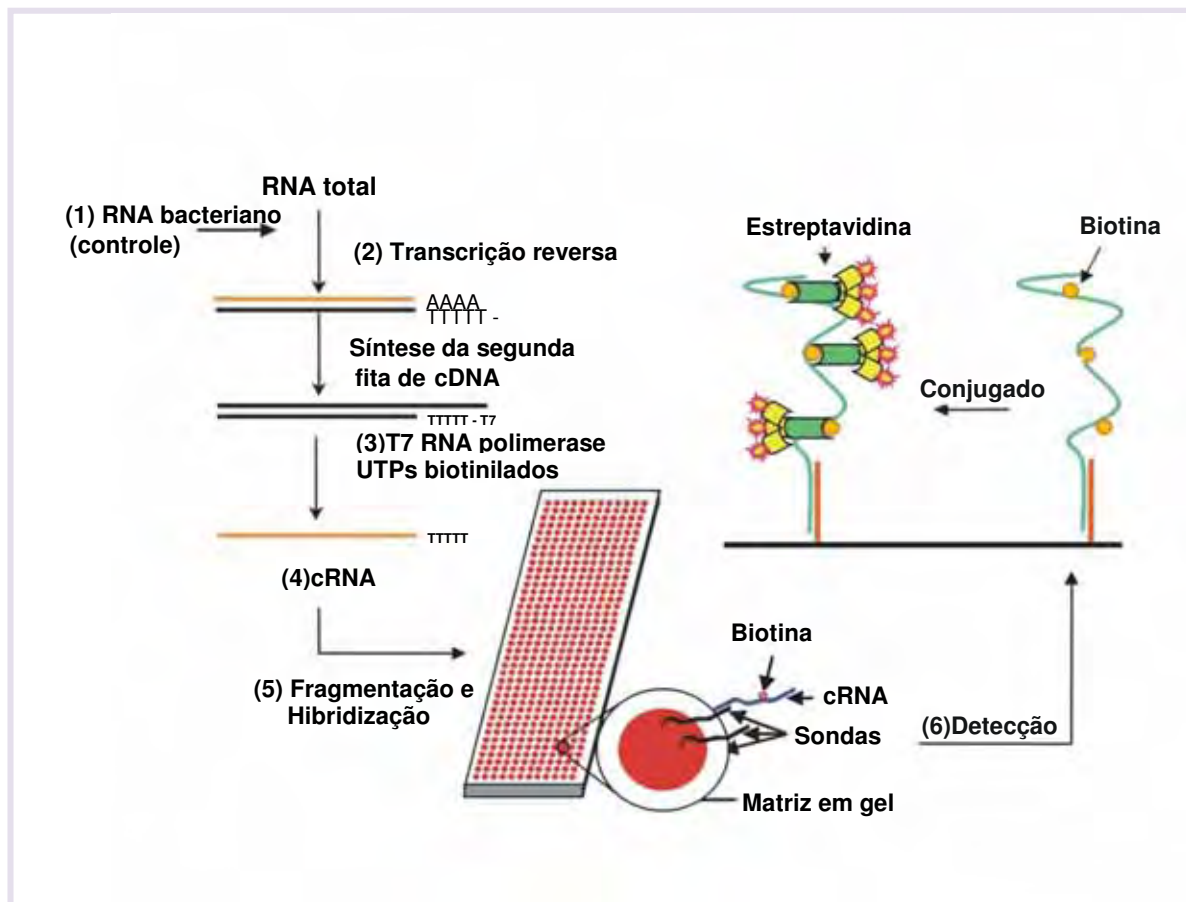
utilizamos a média ponderada, levando em consideração o número de células de cada amostra, de acordo com a fórmula a seguir:

$$MP = \frac{(n^\circ \text{ de celsAm1} \times \%) + (n^\circ \text{ de celsAm2} \times \%) + \dots + (n^\circ \text{ de celsAmn} \times \%) }{\sum n^\circ \text{ de cels Am}}$$

Após a formação dos *pools*, o RNA foi purificado com o kit *RNeasy* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e a qualidade do RNA total foi adicionalmente verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, para a detecção de ambas as bandas 18S e 28S, indicando a integridade do RNA do *pool* seguido de nova quantificação em espectrofotômetro (260 nm).

### 3.9.2 A técnica de *microarray*

Um total de 1,5 µg de cada *pool* de amostras foi utilizado para gerar o RNA complementar (cRNA) biotilado, utilizando o kit *CodeLink Expression Assay Reagent* (GE Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), seguindo as instruções do fabricante. O esquema da abordagem experimental da técnica de *microarray* é ilustrado na Figura 3.



**Figura 3: Abordagem experimental da técnica de *microarray*.** As etapas de 1 a 6 são detalhadas no texto a seguir.

Inicialmente cada *pool* de amostras foi adicionado com uma quantidade pré-determinada de RNA bacteriano utilizado como controle interno da hibridização (1), e submetido então, à transcrição reversa utilizando primers oligo(dT) contendo a seqüência promotora da RNA T7 polimerase (2). Após a síntese da segunda fita, o cDNA gerado foi purificado em colunas QIAquick (Qiagen, Valencia, CA, USA). O cDNA de cada amostra foi utilizado em reações de transcrição de RNA *in vitro* utilizando a enzima RNA polimerase T7 e nucleotídeos (biotin-11-UTP) marcados com biotina (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) (3). Este passo amplifica a amostra de RNA linearmente, mantendo a representatividade original da amostra, e gerando um RNA complementar

(cRNA) biotilado (4). O cRNA de cada amostra foi purificado com o kit RNeasy e quantificado por espectrofotometria. Para a hibridização, 10µg de cRNA de cada *pool* foram fragmentados por aquecimento a 94°C por 20 minutos, em uma solução tampão adequada contendo magnésio. O cRNA fragmentado foi então injetado nas microcâmaras das lâminas de *microarrays* (5), e depois de seladas, as lâminas foram incubadas por 18 horas a 37°C sob agitação intensa (300 rpm) em um *shaker* adaptado especificamente para manter as lâminas fixas na horizontal. Após este período de hibridização, as microcâmaras foram removidas das lâminas, e estas foram incubadas com um conjugado cianina 5-estreptavidina (*Cy5-Streptavidin conjugate*; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), para a detecção da fluorescência (6), sendo lavadas e, logo após, secadas para finalmente serem escaneada e analisadas.

### 3.9.3 Obtenção e análise das imagens

Após a lavagem e a secagem das lâminas, estas foram escaneadas utilizando o software *GenePix Pro 6.0* e um scanner *GenePix 4000B* (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). As lâminas foram escaneadas a 650nm (fluorescência do *Cy5*) utilizando uma resolução de 10µm. Para a determinação da intensidade do sinal de fluorescência dos diferentes *spots* da lâmina, as imagens obtidas foram analisadas com o programa *CodeLink Expression Analysis Software* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Em suma, este software reconhece os *spots* presentes na lâmina e quantifica a intensidade de fluorescência de cada *spot*. Os valores de fluorescência obtidos são então normalizados pela mediana dos valores de todos os *spots* da lâmina,

de forma que diferentes lâminas (amostras) possam ser comparadas e os resultados exportados para planilhas do software Microsoft Excel.

## **3.10 Análises Bioinformáticas**

### **3.10.1 Clusterização hierárquica**

Cerca de 10.000 genes foram utilizados para agrupar os *arrays* de acordo com a similaridade nos perfis de expressão gênica. O software Cluster 3.0 foi utilizado para a clusterização hierárquica pelo método de *Average Linkage* utilizando a métrica baseada no coeficiente de correlação de *Spearman Rank*. O dendograma foi gerado utilizando o software *Java TreeView*.

### **3.10.2 Seleção de genes diferencialmente expressos**

Os valores de expressão finais de cada gene foram utilizados numa análise de significância estatística utilizando o programa SAM V3.00 (*Significance Analysis of Microarrays*) (TUSHER et al., 2001). O programa SAM se baseia na realização de testes estatísticos repetidas vezes sobre o mesmo conjunto de dados, realizando permutações entre os grupos sendo comparados. Desta forma, pode-se estimar a chance de erro na seleção de genes resultante, ou FDR (*False Discovery Rate*), assim como um *Score* (d) utilizado no ranqueamento dos genes selecionados. O número de genes selecionados pelo programa depende de um parâmetro interno do programa chamado *Delta*, cujo valor é estipulado pelo usuário. Ao contrário dos métodos



estatísticos usuais, onde um valor de  $P$  é obtido, e um limiar considerado aceitável (usualmente  $P < 0.05$ ) define o conjunto de genes diferencialmente expressos; o método SAM deixa a critério do usuário, a seleção do número de genes, associando a este conjunto, um FDR. O ordenamento dos genes pelo *Score*, permite saber quais genes apresentam diferenças estatisticamente mais significativas.

Após a seleção dos genes diferencialmente expressos, nós fizemos uma busca de todos os genes com atividade de fatores de transcrição (FT) presentes no conjunto dos genes hiper-expressos nas células CD133+, utilizando a ferramenta de bioinformática *PathwayStudio* (Ariadne Genomics, Inc. Rockville, MD, USA).

### 3.10.3 Análise de Promotores

Para realizar a análise de promotores, nós utilizamos uma ferramenta de bioinformática *on-line* chamada TELIS - *Transcription Element Listening System* (<http://www.telis.ucla.edu/TELiS.htm>) para determinar a frequência de sítios de ligação de fatores de transcrição, entre os promotores dos genes selecionados (COLE et al., 2005). Neste sentido, o trecho genômico de 600pb acima do início da transcrição destes genes foram definidos como regiões promotoras. Adicionalmente, as matrizes da base TRANSFAC (WINGENDER et al., 2001) foram utilizadas para busca e determinação dos sítios de ligação utilizando como parâmetro de estringência um valor de 0.95 (máxima estringência) utilizando o algoritmo MatInspector (QUANDT et al., 1995). Finalmente, o conjunto total de promotores humanos foi definindo como parâmetro para determinação da frequência (número de sítios por promotor),

bem como da incidência (porcentagem de promotores contendo o sítio) esperada dos diferentes sítios de ligação de fatores de transcrição entre os promotores. Uma vez definidos o tamanho do promotor e a estringência, a frequência e incidência calculada para os diferentes sítios de ligação, presentes no conjunto de promotores sendo avaliado, são comparadas às frequências e incidência, calculadas para o conjunto de promotores de referência utilizado (QUANDT et al., 1995). Desta forma, os fatores de transcrição potencialmente envolvidos no controle da expressão dos genes diferencialmente expressos foram definidos.

### **3.11 PCR em tempo real**

Para a realização dos estudos de PCR quantitativo em tempo real (*Real time PCR*), 500 ng de RNA total de cada amostra foi utilizado para a transcrição reversa e síntese de 25µl de cDNA, usando o High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O cDNA resultante foi então diluído 5 vezes para uso nas reações.

Realizamos a quantificação relativa dos genes NFKB2, RELB, NOTCH1, GATA3, RUNX1, USF1, TAL1, HOXA9 e HOXB4 em um total de 29 amostras de CD34+ (18 de MO+ e 11 de SCU) e 25 amostras de CD133+ (11 de MO e 14 de SCU). Todas as amostras de CD34+ de MO e de SCU, exceto aquelas utilizadas também para os experimentos de *microarrays*, foram derivadas de um estudo anterior (PANEPUCCI et al., 2005). As reações foram realizadas em duplicata utilizando mix de sonda e primers TaqMan (“Assay on demand”) em conjunto com o reagente MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A amplificação foi realizada em um volume final de 10µl, utilizando 5µl

do reagente específico *TaqMan Master Mix*, 0,5 µl do mix específico de sonda e primers *TaqMan*, 2,5µl de H<sub>2</sub>O, e 2µl de cDNA diluído. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos). Um aparelho de detecção de PCR em tempo real *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi utilizado juntamente com o software *Sequence Detection System V1.3* para obtenção dos valores de CT. Ao final das corridas os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de  $\Delta CT$ .

O gene endógeno (ou *housekeeping*) GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi utilizado para a normalização interna das amostras e a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , (PFAFFL, 2001) foi utilizada para o cálculo da expressão relativa, de modo a obtermos, ao final, valores de expressão relativos à amostra central de CD34+ de MO. Neste sentido, para cada gene avaliado, as reações de PCR foram realizadas inicialmente com as amostras de MO (CD34+ e CD133+) e as duas amostras CD34+ de MO imediatamente anterior e posterior à mediana dos valores de  $\Delta CT$  das mesmas, foram utilizadas como calibradores durante a avaliação das amostras de SCU (CD34+ e CD133+), permitindo a posterior comparação entre todas as amostras.

O software GraphPad Prism V4.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) foi utilizado para gerar os gráficos e para calcular a significância estatística, aplicando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney com uma cauda.

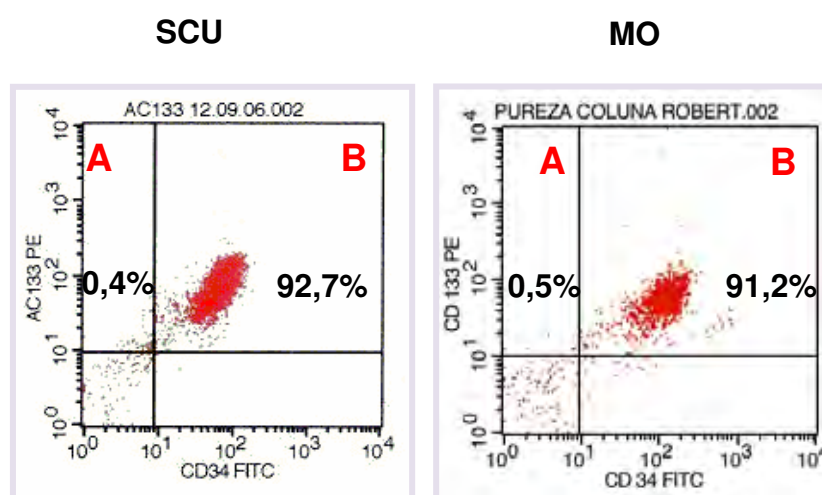
Adicionalmente fizemos uma análise de correlação entre os genes avaliados, utilizando os níveis de expressão obtidos por PCR em tempo real e o teste Spearman não paramétrico para testar a significância estatística entre as correlações.

## **4. Resultados**

## 4.1 Caracterização por citometria de fluxo

### 4.1.1 Pureza e co-expressão do CD34 nas células CD133+

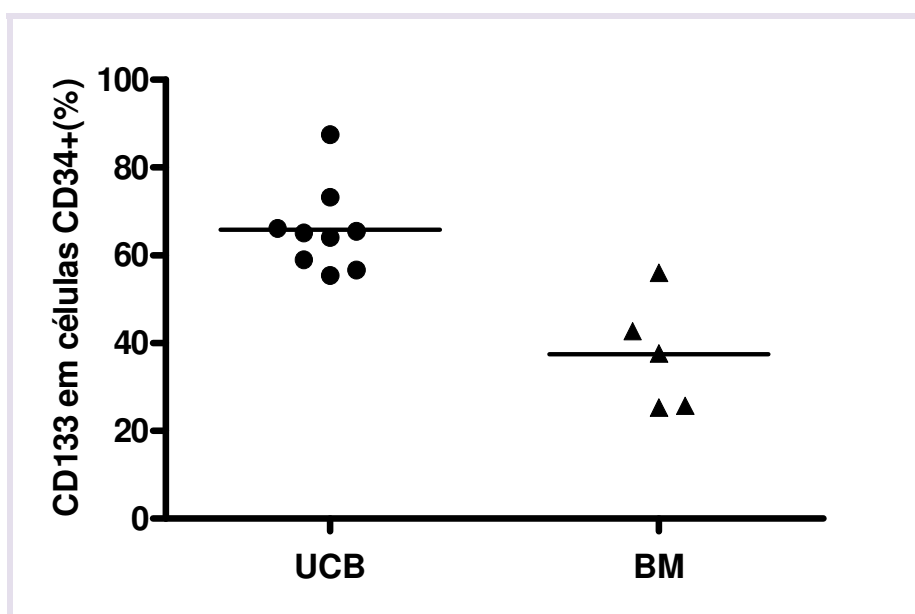
A pureza final das células CD133+ obtidas após a seleção imunomagnética e a co-expressão do marcador CD34 nessas células, foram avaliadas por citometria de fluxo (Figura 4). Inicialmente, observamos que a maioria das células CD133+ expressam também o marcador CD34, de modo que uma média de 99,6 % das células CD133+ de SCU são CD34+ enquanto na MO essa porcentagem é de 99,4%. As purezas finais das amostras de CD133+ de SCU e MO estão detalhadas nas tabelas 1 e 2 e serão mostradas posteriormente.



**Figura 4: Avaliação da pureza e porcentagem de células CD34+ nas células CD133+ selecionadas. SCU=sangue de cordão umbilical. MO=medula óssea. A=%CD34-/CD133+ e B=%CD34+/CD133+. A pureza de cada amostra é determinada pela porcentagem de células CD133+ totais (A+B), com médias de 93,1% para as amostras CD133+ de SCU (n=7) e 91,7% para as amostras CD133+ de MO (n=7). A avaliação da co-expressão do marcador CD34, ou seja, a porcentagem de células CD34+ nas células CD133+ selecionadas, por sua vez, é determinada pela porcentagem de células CD34+/CD133+ (duplo positivas) presente na população total de células CD133+, através da fórmula  $B \cdot 100 / (A+B)$ , com médias igual a 99,6% para as amostras de SCU e 99,4% para as de MO.**

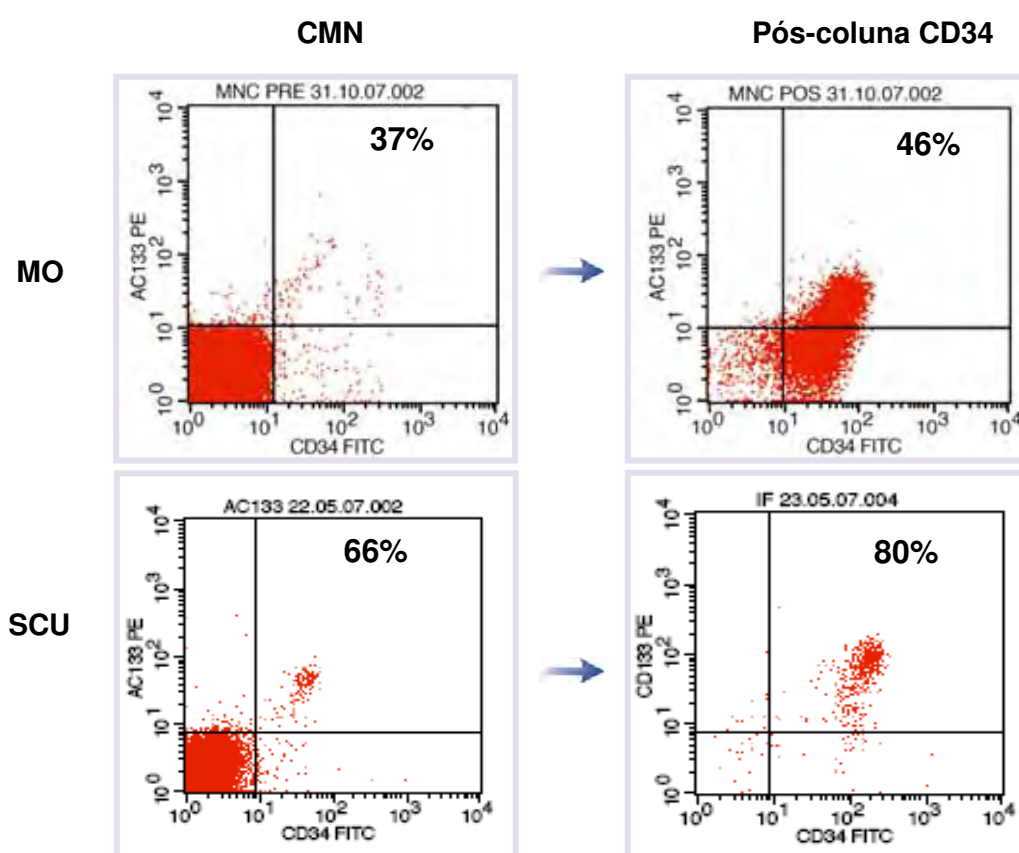
#### 4.1.2 Co-expressão de CD133 nas células CD34+

Vimos que a grande maioria das células CD133+ co-expressam o marcador CD34 independente da fonte. Com o intuito de melhor caracterizar as células CD34+, nós analisamos a expressão do marcador CD133 nas células CD34+ presentes na fração de células mononucleares de SCU e de MO. Nossos resultados revelaram uma diferença significativa na porcentagem de células CD133+ entre as células CD34+ de ambas as fontes, sendo que no SCU, cerca 70% das células CD34+ co-expressam o marcador CD133, enquanto na MO, cerca de 40% das células CD34+ o fazem (Figura 5).



**Figura 5: Porcentagem de células CD133+ nas células CD34+ presentes na fração mononuclear. UCB=sangue de cordão umbilical (SCU); BM=medula óssea. (MO).** As células CD34+ de SCU (n=9) apresentaram uma porcentagem significativamente maior (P=0.0010) de células CD133+ comparadas às células CD34+ de MO (n=5).

Posteriormente, com o objetivo de avaliar a influência do procedimento de seleção imunomagnética sobre a composição celular, nós avaliamos a expressão do marcador CD133 nas células CD34+ antes (na fração de células mononucleares) e após a seleção imunomagnética; onde pudemos observar um aumento das células CD133+ após o procedimento de seleção das células CD34+ tanto em MO como em SCU (Figura 6).



**Figura 6: Enriquecimento das subpopulação celular CD34+CD133+ após a seleção imunomagnética de células CD34+.** Os valores correspondem às médias das porcentagens de células CD34+CD133+ (duplo positivas) na população de células CD34+ antes e após a seleção em coluna magnética, variando de 37% para 46% na MO (n=2) e de 66% para 80% no SCU (n=7). **MO**=medula óssea; **SCU**=sangue de cordão umbilical. **CMN**=células mononucleares.



## 4.2 Seleção das amostras para os experimentos de microarrays

### 4.2.1 Células CD133+ de sangue de cordão umbilical

Foram selecionadas oito amostras de células CD133+ de SCU para a confecção dos *pools* e realização dos experimentos de *microarrays* (Tabela 1). Destas, obtivemos uma média de  $1,5 \times 10^6$  células CD133+, variando de 0,7 a  $4 \times 10^6$  por amostra e correspondendo a um total de  $13,4 \times 10^6$  células. A pureza das amostras variou entre 88 e 96%. Quinhentos nanogramas de RNA de cada amostra foram separados com o intuito de validarmos os resultados encontrados nas análises de *microarrays* por um método independente. O RNA restante de cada amostra, variando entre 2 a 6  $\mu\text{g}$  por amostra, foi agrupado em dois *pools*: 1 e 2 com um total 13,5 $\mu\text{g}$  e 14,0 $\mu\text{g}$  de RNA, respectivamente. A pureza final foi de 91% para o *pool* 1 de 94% para o *pool* 2 (Tabela 1).

**Tabela 1. Amostras utilizadas para confecção dos *pools* de células CD133+ de sangue de cordão umbilical.**

Amostra	Tipo Celular	Pool	Nº células( $10^6$ )	Pureza	Pureza Pool	RNA Pool( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )
1	SCU CD133+	1	1,9	91%	91%	2,0	13,5
2			0,7	94%		4,5	
3			2,3	88%		4,0	
4			0,9	96%		3,0	
5		2	0,9	89%	94%	2,5	14,0
6			1,0	95%		3,5	
7			1,7	94%		2,0	
8			4,0	94%		6,0	

**SCU**=sangue de cordão umbilical.

#### 4.2.2 Células CD133+ de medula óssea

Para a confecção dos *pools* e realização dos experimentos de *microarrays* das amostras CD133+ de MO, 10 amostras foram selecionadas, com uma média de  $1,0 \times 10^6$  células por amostra, correspondendo a um total de  $9,7 \times 10^6$  células totais. O número de células selecionadas por amostra variou de  $0,4$  a  $3,0 \times 10^6$ . A pureza das amostras variou entre 87 e 99% (Tabela 2). Da mesma forma que para o SCU, 500 ng de cada amostra foi separado para posterior validação e o RNA restante, com uma variação entre 2,5 a 5,0  $\mu\text{g}$  por amostra, foi agrupado em dois *pools*. O total de RNA foi de 17,0  $\mu\text{g}$  e 15,5  $\mu\text{g}$ , para o *pool* 1 e para o *pool* 2, respectivamente. Em relação à pureza, o resultado foi de 90% para o *pool* 1 e 94% para o *pool* 2 (Tabela 2).

**Tabela 2. Amostras utilizadas para confecção das dos *pools* de células CD133+ de medula óssea.**

Amostra	Tipo Celular	Pool	N <sup>o</sup> células( $10^6$ )	Pureza	Pureza Pool	RNA Pool( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )
1	MO CD133+	1	1,0	93%	90%	3,0	17,0
2			0,7	91%		3,0	
3			0,4	93%		3,0	
4			0,4	99%		3,0	
5			3,0	87%		5,0	
6		2	0,6	91%	94%	2,5	15,5
7			0,6	92%		3,0	
8			0,7	95%		3,0	
9			1,0	92%		4,0	
10			1,3	97%		3,0	

MO=medula óssea

### 4.2.3 Células CD34+ de sangue de cordão umbilical

Em relação às células CD34+ de SCU, foram utilizadas 6 amostras para a confecção dos *pools* e realização dos experimentos de *microarrays*. Obtivemos uma média de  $2,9 \times 10^6$  células CD34+, com variação entre 0,6 a  $4,8 \times 10^6$  por amostra, correspondendo a um total de  $16,3 \times 10^6$  células. A pureza das amostras variou entre 77 e 99% (Tabela 3). Da mesma forma que para as amostras de células CD133+, 500 ng de cada amostra CD34+ de SCU foi inicialmente separado para posterior validação. O restante também foi agrupado em dois *pools*, os quais tiveram amostras variando entre 3 a  $10,5 \mu\text{g}$ . O total de RNA para o *pool* 1 foi de  $17 \mu\text{g}$  e para o *pool* 2 de  $23,5 \mu\text{g}$ . Já a pureza para o *pool* 1 e para o *pool* 2 foi de 92% e 91%, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3. Amostras utilizadas para confecção dos *pools* de células CD34+ de sangue de cordão umbilical.**

Amostra	Tipo Celular	Pool	N <sup>o</sup> células( $10^6$ )	Pureza	Pureza Pool	RNA Pool ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )
1	SCU CD34	1	3,2	99%	92%	3,0	17,0
2			3,1	85%		9,0	
3			0,6	96%		5,0	
4		2	4,9	90%	91%	10,0	23,5
5			4,8	96%		10,5	
6			1,0	77%		3,0	

**SCU**=sangue de cordão umbilical.

### 4.2.4 Células CD34+ de medula óssea

Como citado anteriormente, os resultados das análises dos *microarrays* das células CD34+ de MO foram obtidos de um estudo anterior no qual foram

utilizadas duas amostras distintas, ambas com 97% de pureza final, para a confecção das lâminas (realizadas em duplicatas).

### 4.3 Amostras utilizadas no PCR em tempo real

Um total de 29 amostras CD34+ (18 de MO+ e 11 de SCU) e 25 amostras CD133+ (11 de MO e 14 de SCU) foram avaliadas por PCR em tempo real a fim de validar os genes selecionados nos experimentos de *microarrays* bem como avaliar a expressão de genes relacionados aos mesmos. Os valores das purezas das amostras CD133+ de SCU e de MO utilizadas nos experimentos de PCR em tempo real estão dispostos na Tabela 4.

**Tabela 4. Amostras de células CD133+ utilizadas para os estudos de expressão gênica por PCR em Tempo Real.**

ID	Nota *	Pureza	ID	Nota *	Pureza
SCU-1	Pool 1 microarray	91%	SCU-14		80%
SCU-2	Pool 1 microarray	94%	MO-1	Pool 1' microarray	93%
SCU-3		81%	MO-2		80,%
SCU-4		79%	MO-3		85%
SCU-5	Pool 1 microarray	88%	MO-4	Pool 1' microarray	91%
SCU-6	Pool 2 microarray	89%	MO-5	Pool 1' microarray	93%
SCU-7		87%	MO-6	Pool 1' microarray	98%
SCU-8	Pool 1 microarray	96%	MO-7	Pool 1' microarray	87%
SCU-9	Pool 2 microarray	95%	MO-8	Pool 2' microarray	91%
SCU-10		51%	MO-10	Pool 2' microarray	95%
SCU-11		43%	MO-11	Pool 2' microarray	92%
SCU-12	Pool 2 microarray	94%	MO-12	Pool 2' microarray	97%
SCU-13	Pool 2 microarray	94%			

MO=medula óssea, SCU=sangue de cordão umbilical.

\* Ver descrição no texto a seguir.

#### 4.3.1 Amostras CD133+ de SCU

As amostras SCU-1, SCU-2, SCU-5 e SCU-8 correspondem às amostras 1 a 4, utilizadas na confecção do *pool* 1 de células CD133+ de SCU, enquanto as amostras SCU-6, SCU-9, SCU-12 e SCU-13, correspondem às amostras 5 a 8, utilizadas na confecção do *pool* 2 de células CD133+ de SCU (Tabela 1).

#### 4.3.2 Amostras CD133+ de MO

As amostras MO-1 e MO-4 a MO-7 correspondem às amostras 1 a 5, utilizadas na confecção do primeiro *pool* de células CD133+ de MO. Já as amostras MO-8 e MO-11 a MO-13 correspondem às amostras 6 e 8 a 10, respectivamente, utilizadas na confecção do segundo *pool* de células CD133+ de MO. (Tabela 2).

A amostra MO-9 correspondente a amostra 7 que havia sido utilizada para confecção do *pool* 2 de CD133+ de MO foi excluída dos cálculos de expressão gênica por PCR em tempo real uma vez que apresentou alteração na expressão do gene endógeno indicando uma possível degradação do cDNA.

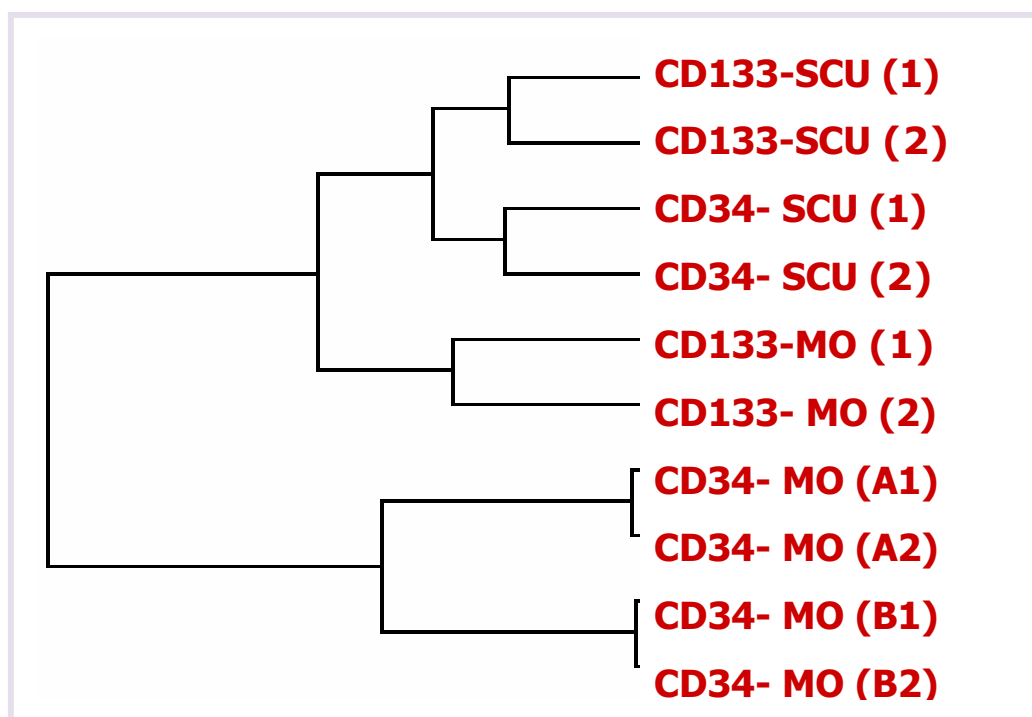
#### 4.3.3 Amostras CD34+ de MO e SCU

Como citado anteriormente todas as amostras de CD34+ de MO e de SCU, exceto aquelas utilizadas também para os experimentos de *microarrays*, foram derivadas de um estudo anterior com pureza variando entre 55% a 97% (PANEPUCCI et al., 2007).

## 4.4 Perfis de expressão gênica

### 4.4.1 Análise de Clusterização

Um total de 9925 genes foram utilizados para a geração dos perfis de expressão gênica das diferentes amostras (sob a forma *pools*) pela técnica de *microarray*. Após a normalização dos valores de expressão, estes foram utilizados em uma análise de clusterização hierárquica, a qual permite agrupar os perfis de expressão distintos de acordo com a similaridade entre os mesmos (Figura 7).



**Figura 7: Agrupamento obtido após análise de clusterização hierárquica** . As amostras foram agrupadas de acordo com a similaridade entre os perfis de expressão gênica. **MO**=medula óssea; **SCU**=sangue de cordão umbilical; **1**=pool1; **2**=pool 2; **A** (1e 2) e **B** (1 e 2)=amostras individuais realizadas em duplicatas experimentais.

Como podemos observar no dendograma apresentado (Figura 7), há em primeiro lugar um agrupamento direto entre as replicatas experimentais das amostras CD34+ de MO. Em seguida, os perfis de transcrição são agrupados de maneira independente, de acordo com o tipo (CD34 ou CD133) e a fonte (MO ou SCU). Ao ampliarmos a análise, verificamos que as amostras CD34+ de SCU e as CD133+ de SCU aparecem agrupadas juntas, enquanto as amostras CD34+ de MO e CD133+ de MO, não. Ao contrário, as amostras CD133+ de MO aparecem preferencialmente agrupadas com as amostras de SCU (CD34+ e CD133+). Assim, ao final temos, de uma maneira mais abrangente, a presença de dois grandes grupos ou *clusters* distintos. O primeiro, composto pelas amostras de SCU (CD133+ e CD34+) e pelas amostras CD133+ de MO e o segundo, composto pelas amostras CD34+ de MO, o qual aparece como um grupo distinto.

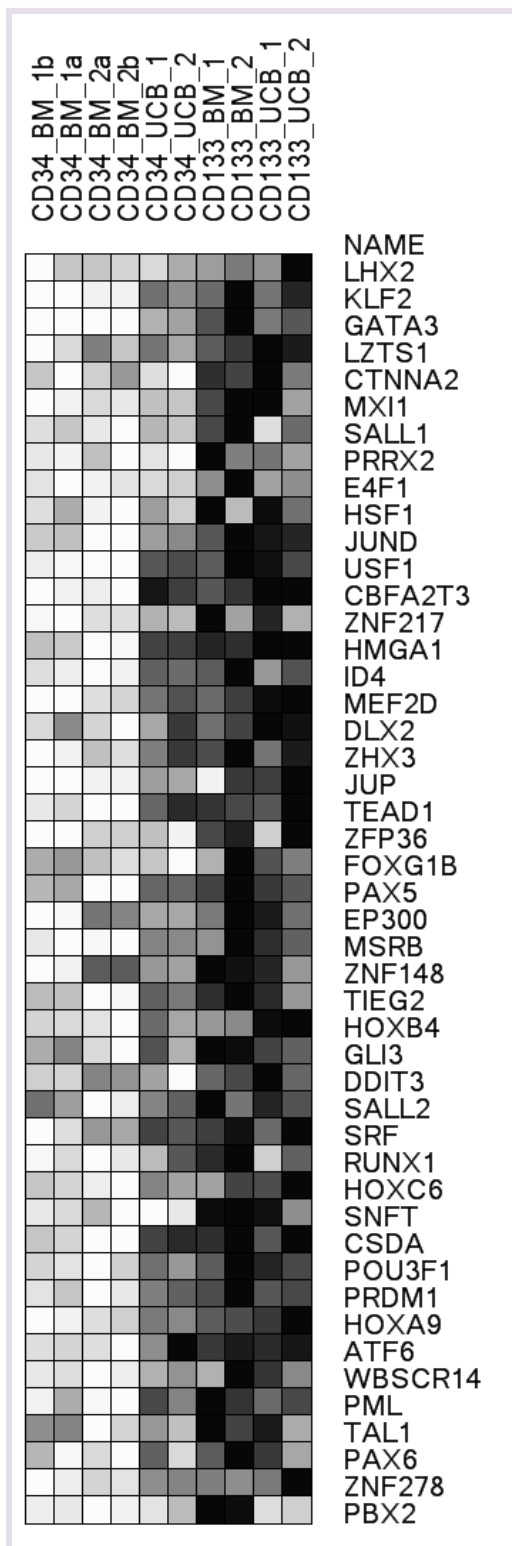
#### **4.4.2 Genes diferencialmente expressos entre as células CD34+ e as células CD133+ e seleção dos fatores de transcrição**

A comparação entre os perfis de expressão gênica das amostras CD34+ e das amostras CD133+ por SAM, revelou em um total de 1266 genes diferencialmente expressos, com uma média de *false discovery rate* (FDR) de 4,53% ( $\Delta=1.009$ ). Destes, 891 estavam hiper-expressos nas células CD133+, enquanto 375 estavam hiper-expressos nas células CD34+.

Revelado os genes diferencialmente expressos, nós optamos por selecionar os genes com atividade de fator de transcrição (FT), devido ao papel fundamental que estes exercem no controle da regulação gênica, uma vez que são essenciais para a ativação do complexo transcricional no núcleo, e

consequentemente nas características biológicas das células. Assim, com o intuito de identificar os mecanismos moleculares potencialmente envolvidos com a maior primitividade das células CD133+, nós realizamos uma busca por todos os FT presentes no conjunto de genes hiper-expressos nessas células (891). Um total de 47 FT foram encontrados, dentre eles muitos fatores conhecidos, relacionados à manutenção da primitividade (aumento da auto-renovação e expansão das CTH) e ao potencial de hemangioblasto, como o RUNX1/AML1, USF1, TAL1/SCL, HOXA9 e HOXB4 bem como com desenvolvimento e comprometimento com a linhagem T linfocítica, como o GATA3. (Figura 8). A lista completa com o nome, a descrição e a média dos valores de expressão desses genes está disponível em Apêndice (Apêndice A).

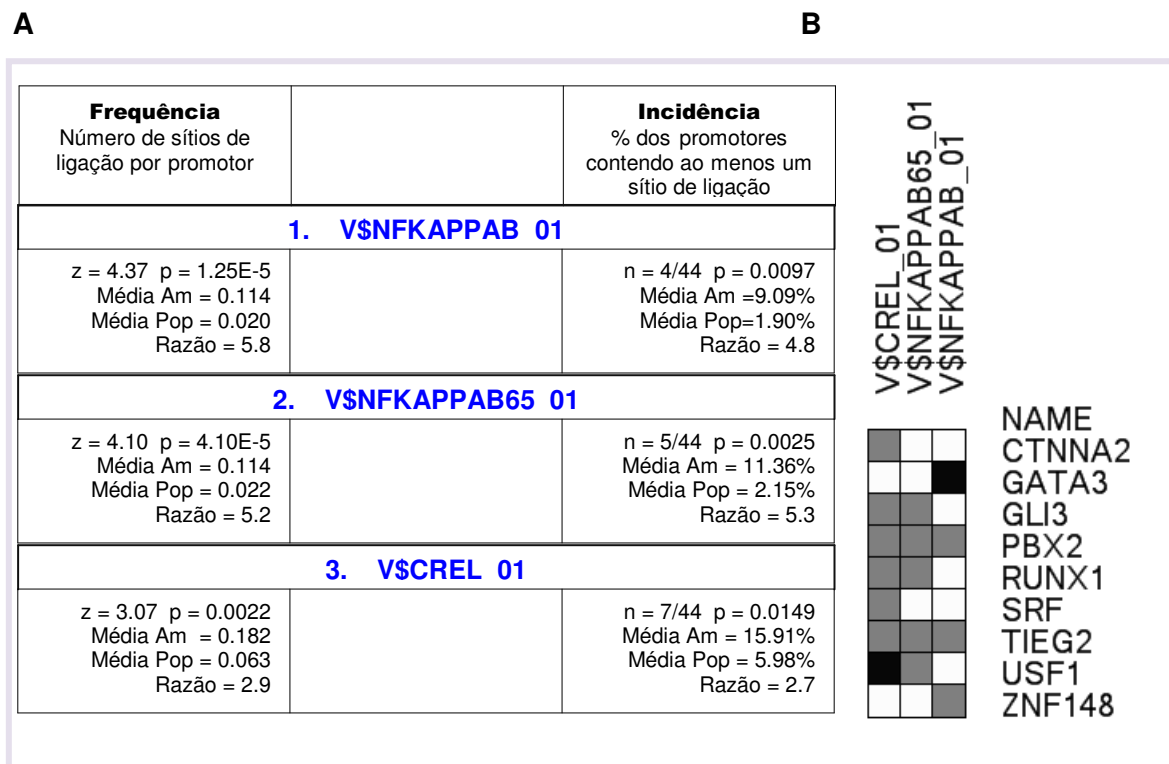




**Figura 8: Fatores de transcrição hiper-expressos nas células CD133+ comparadas às células CD34+.** Os genes encontram-se dispostos em ordem decrescente de *fold* (razão CD133+/CD34+) de acordo com a *heatmap*, onde os quadrados mais escuros correspondem aos maiores níveis de expressão enquanto os mais claro correspondem aos menores níveis. **CD133**=células CD133+. **CD34**=células CD34+. **BM**=medula óssea (MO), **UCB**=sangue de cordão umbilical (SCU).

#### ***4.5 Análise de promotores***

Com o objetivo de avaliar os mecanismos de regulação envolvidos com os FT que apareceram em maiores níveis nas células CD133+ e identificar a existência de um possível FT chave, que poderia ser responsável pela hiperexpressão dos mesmos, nós realizamos uma análise de promotores em 44 dos 47 genes selecionados. Após identificar os sítios de ligação para diferentes FT nos promotores desses genes, foi realizada uma análise para identificar entre estes quais eram estatisticamente mais freqüentes em relação ao esperado, com base nas freqüências determinadas para o conjunto total de promotores humanos. A análise revelou que três sítios de ligação de fatores da via NF-kB estavam entre os sítios mais significativamente representados, distribuídos entre os promotores de 9 dos 44 genes avaliados, dentre eles GATA3, USF1 e RUNX1 (Figura 9)

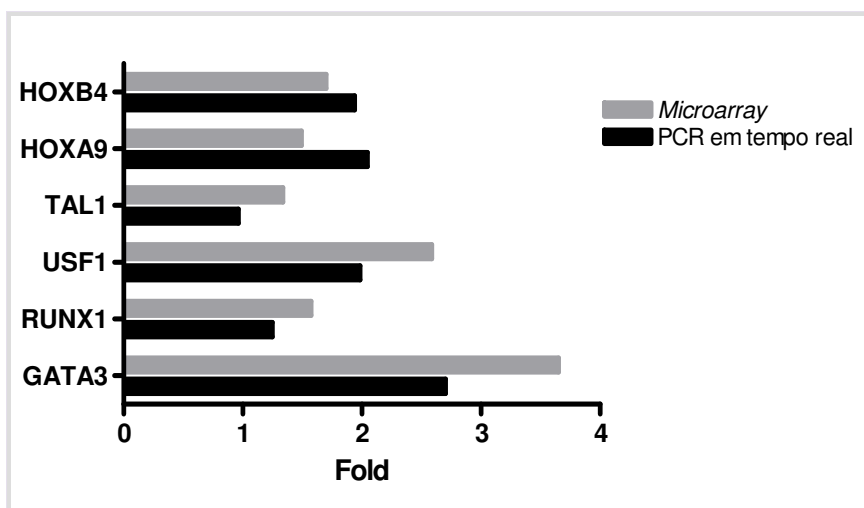


**Figura 9: Sítios de ligação para NFκB e os potenciais alvos transcricionais encontrados hiper-expressos nas células CD133+.** (A) A análise de promotores revelou três sítios de ligação, com frequência e incidência acima do esperado para fatores da via NF-κB, sendo eles: NFKAPPAB\_01 (equivalente ao complexo NFKB1/RELA), NFKAPPAB65\_01 (equivalente ao RELA) e CREL. (B) *Heatmap* ilustrando o número de ocorrências dos três sítios de ligação para NF-κB, sendo nenhum (branco), um (cinza) e dois (preto). A direita tem-se os potenciais alvos transcricionais de NFκB incluindo GATA3, USF1 e RUNX1. **AM**=amostras; **Pop**=população (amostragem definida por um amplo conjunto de promotores de mamíferos).

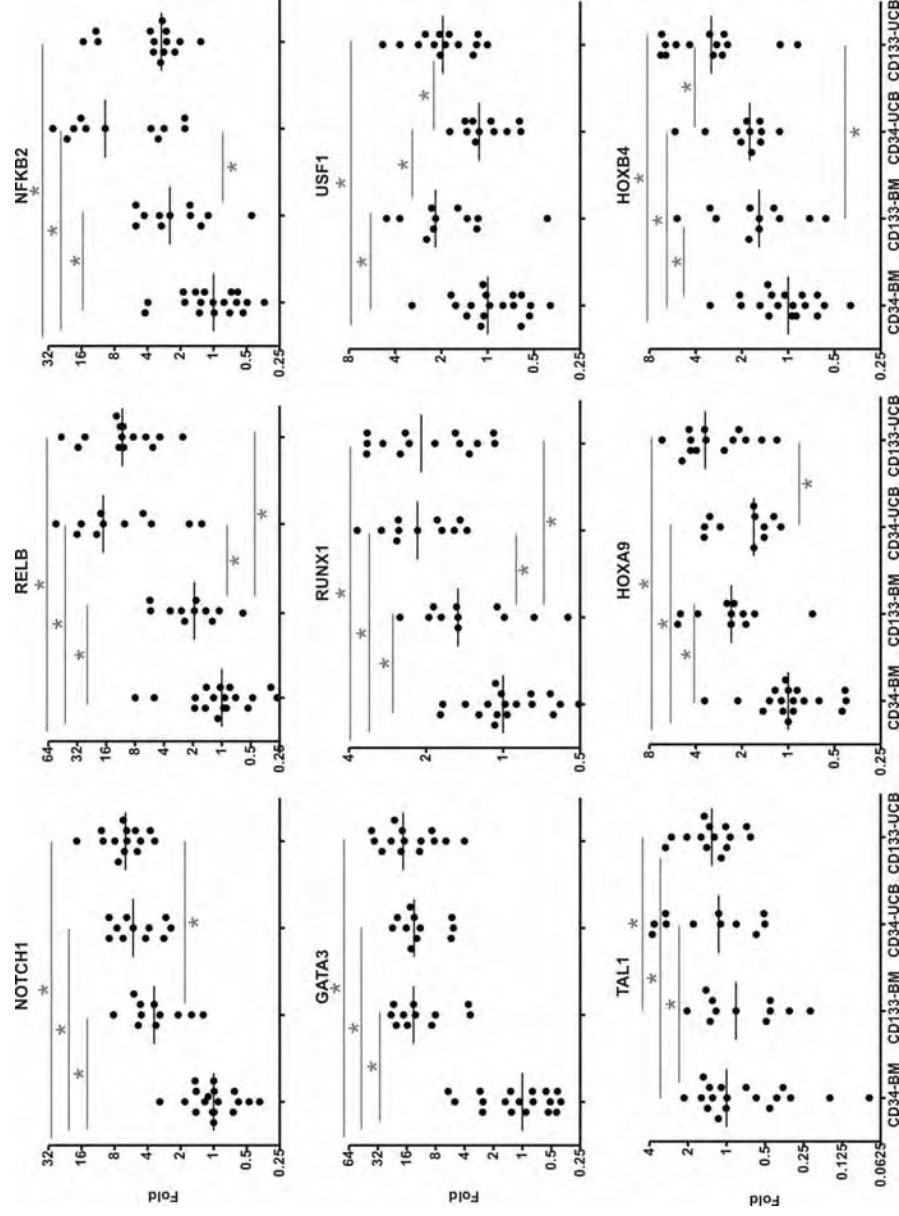
#### 4.6 PCR em tempo real

As diferenças de expressão dos genes RUNX1, GATA3, USF1, TAL1, HOXA9 e HOXB4, entre as células CD133+ e as células CD34+, observadas nas análises de *microarrays* foram validadas por PCR em tempo real (Figura 10).

Vimos que a análise de promotores revelou uma potencial regulação de diversos FT hiper-expressos nas células CD133+ por fatores da via NFκB, o que nos levou a avaliação adicional dos níveis expressão dos transcritos de NFKB2, RELB e também de NOTCH1 por PCR em tempo real. Os resultados obtidos para os 6 genes selecionados nos *microarrays*, bem como para os genes NOTCH1, RELB e NFKB2 são apresentados na Figura 11.



**Figura 10: Validação das diferenças encontradas nas análises de *microarrays* por PCR em tempo real.** A razão CD133+/CD34+ (*fold*), foi calculada utilizando a média dos valores expressão dos transcritos das amostras CD133+ (MO e SCU) e das amostras CD34+ (MO e SCU). Enquanto as barras em cinza representam os valores de *fold* obtidos nos *microarrays*, as barras em preto representam os valores obtidos por PCR em tempo real. Nota-se que embora os valores não sejam iguais entre as técnicas avaliadas; eles são equivalentes uma vez que todos são positivos, ou seja, estão de fato mais expressos nas células CD133+ comparadas às células CD34+.



**Figura 11: Níveis de expressão gênica avaliados por PCR em tempo real.** O PCR em tempo real foi realizado em amostras CD34+ de MO (n=18), CD133+ de MO (n=11), CD34+ de SCU (n=11) e CD133+ de SCU (n=14). A expressão gênica é mostrada como a razão (*Fold*) relativa à expressão gênica mediana das amostras de CD34+ de MO (em log de base 2). A análise de significância estatística (representada em asterisco para  $p < 0.05$ ) revelou que, exceto USF1, todos os transcritos estavam em maiores níveis nas células CD34+ de SCU do que nas células CD34+ de MO. Esses resultados também foram verdadeiros para a subpopulação de células CD133+, exceto para HOXA9 e GATA3, e NFKB2 em adição ao USF1. A comparação entre as células CD34+ de MO com as células CD133+ de MO, confirmou os resultados encontrados pelos *microarrays*, exceto para TAL1. Em contraste, exceto para USF1, HOXB4 e HOXA9, não havia diferença significativa entre as células CD34+ de SCU e CD133+ de SCU. Todos os p valores estão disponíveis em Apêndice (Apêndice B). **BM**=medula óssea (MO); **UCB**=sangue de cordão umbilical (SCU).

#### 4.6.1 Análise de Correlação entre os transcritos

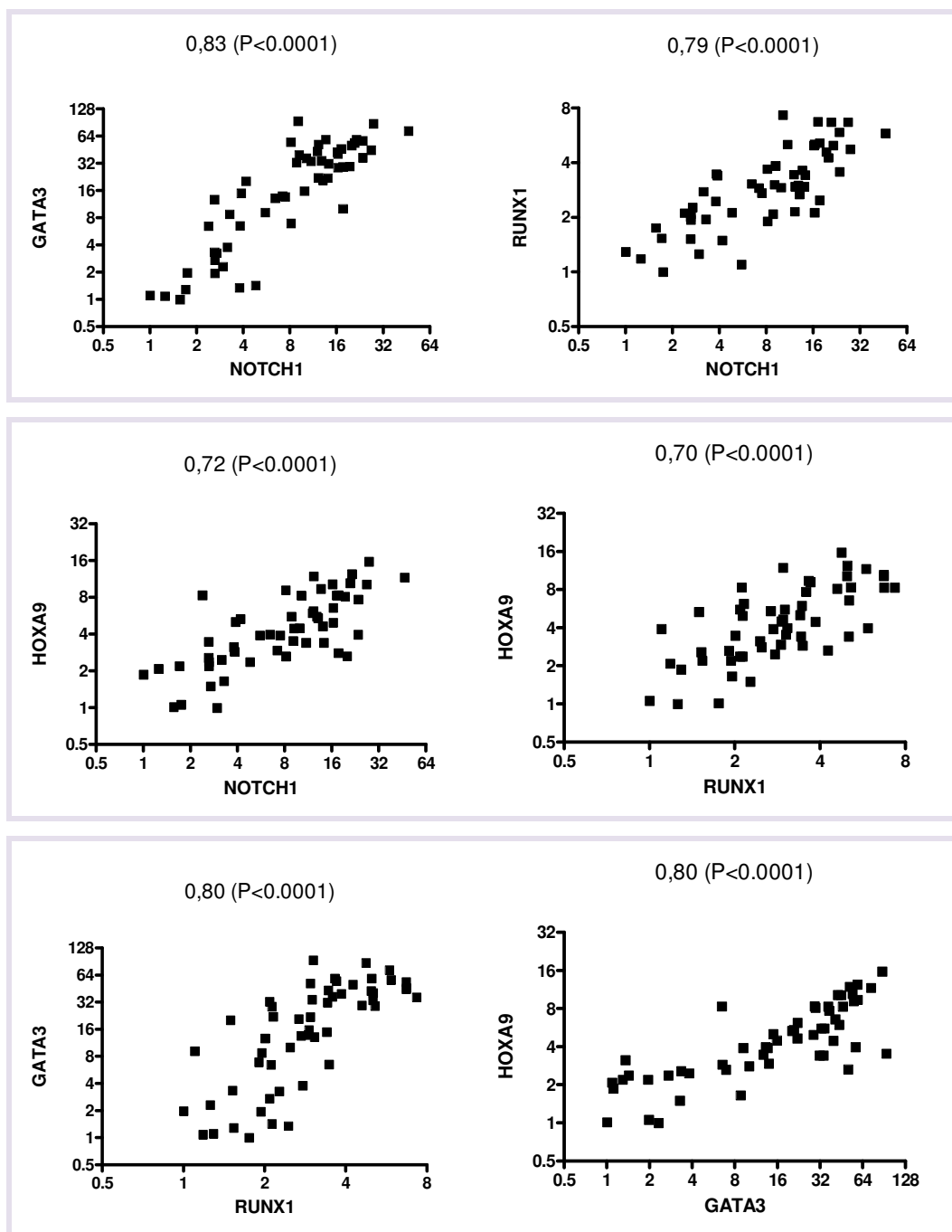
Finalmente, com o intuito de identificar potenciais inter-relações entre os fatores de transcrição, nós realizamos uma análise de correlação com os valores de expressão obtidos por PCR em tempo real onde pudemos observar uma correlação positiva estatisticamente significativa entre todos os transcritos avaliados (Tabela 5).

**Tabela 5: Coeficientes de correlação entre os transcritos avaliados.**

	NOTCH1	RELB	NFKB2	GATA3	RUNX1	HOXA9	HOXB4	USF1	TAL1
<b>NOTCH1</b>									
<b>RELB</b>	<b>0.80</b>								
<b>NFKB2</b>	<b>0.71</b>	<b>0.88</b>							
<b>GATA3</b>	<b>0.83</b>	<b>0.71</b>	0.62						
<b>RUNX1</b>	<b>0.79</b>	0.63	0.54	<b>0.80</b>					
<b>HOXA9</b>	<b>0.72</b>	0.51	0.40	<b>0.80</b>	0.70				
<b>HOXB4</b>	0.65	0.47	0.29	0.67	<b>0.75</b>	<b>0.87</b>			
<b>USF1</b>	0.53	0.46	0.42	0.60	0.40	0.69	0.53		
<b>TAL1</b>	0.41	0.42	0.26	0.47	0.61	0.55	<b>0.71</b>	0.44	

Valores dos coeficientes de correlação de Spearman ( $r$ ) apresentados a cada comparação entre os transcritos avaliados. Os valores acima de 0.7 estão destacados em negrito revelando as correlações mais expressivas.

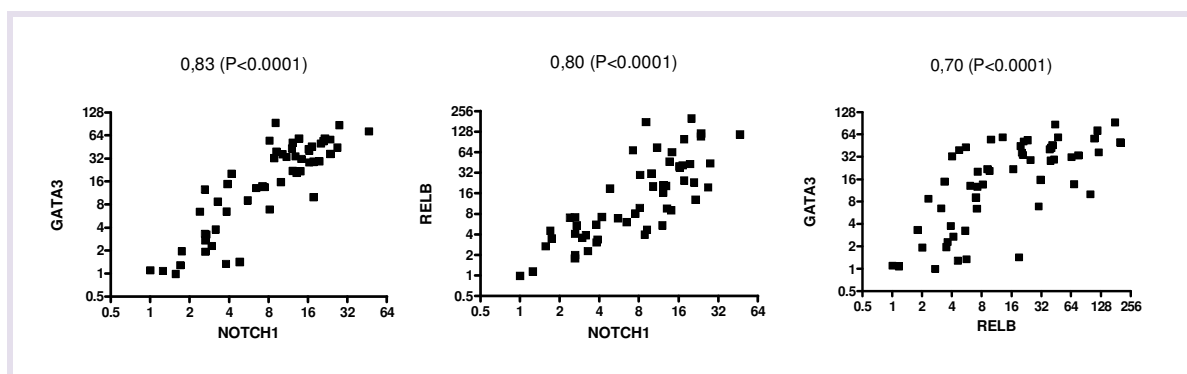
De acordo com a Tabela 5, NOTCH1, RUNX1, GATA3 e HOXA9 são todos relacionados entre si, com elevados coeficientes de correlação ( $r > 0.7$  e  $P < 0.0001$ ) (Figura 12). Da mesma maneira, NOTCH1, RELB e GATA3 são também correlacionados com altos coeficientes ( $r > 0.7$  e  $P < 0.0001$ ) (Figura 13).



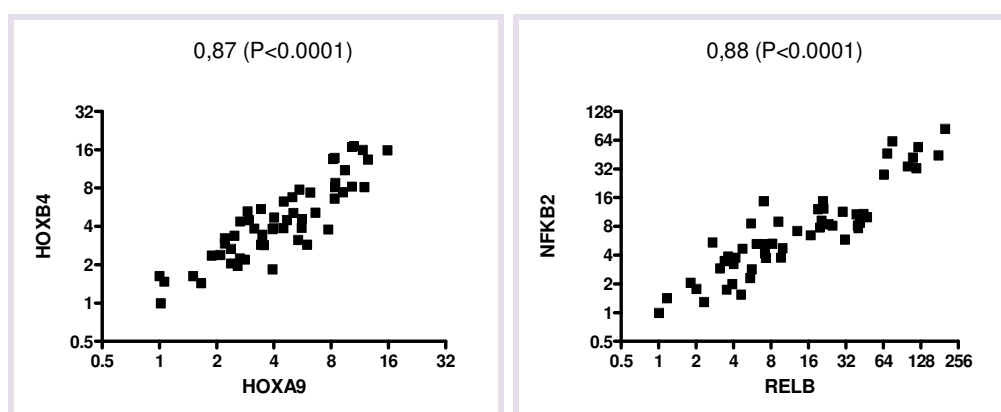
**Figura 12: Análise de correlação entre os transcritos NOTCH1, RUNX1, GATA3 e HOXA9.**

Os níveis de expressão obtidos por PCR em tempo real para NOTCH1, RUNX1, GATA3 e HOXA9 foram plotados nos gráficos para destacar a potencial correção dos transcritos avaliados. Os valores de *fold* foram calculados em relação à amostra que apresentou menor nível de expressão da série, permitindo a direta avaliação entre as mudanças apresentadas para cada transcrito. Os coeficientes de correlação e os p valores estão dispostos sobre os gráficos.

Adicionalmente, podemos verificar altos níveis de correlações para os transcritos de HOXB4 e HOXA9 ( $r=0.87$ ), pertencentes à mesma família de FT, bem como para RELB e NFKB2 ( $r=0.88$ ), que atuam em forma de dímeros na via de sinalização de NF $\kappa$ B não canônica. (Figura 14).



**Figura 13: Análise de correlação entre os transcritos NOTCH1, GATA3, RELB.** Os Níveis de expressão obtidos por PCR em tempo real para NOTCH1, GATA3 e RELB foram plotados nos gráficos para destacar a potencial correção dos transcritos avaliados. Os valores de *fold* foram calculados em relação à amostra que apresentou menor nível de expressão da série, permitindo a direta avaliação entre as mudanças proporcionais apresentada para cada transcrito. Os coeficientes de correlação e os p valores estão dispostos sobre os gráficos.



**Figura 14: Análise de correlação entre os transcritos HOXB4 e HOXA9 e entre os transcritos NFKB2 e RELB.** Os Níveis de expressão obtidos por PCR em tempo real para HOXB4 e HOXA9 bem como para NFKB2 e RELB. Os valores de *fold* foram calculados em relação à amostra que apresentou menor nível de expressão da série, permitindo a direta avaliação entre as mudanças proporcionais apresentada para cada transcrito. Os coeficientes de correlação e os p valores estão dispostos sobre os gráficos.



## **5. Discussão**

### **5.1 Diferenças na composição celular entre as CTH de MO e de SCU**

Quando avaliamos o perfil imunofenotípico das células, quanto à expressão dos marcadores CD34 e CD133, vimos que enquanto todas as células CD133+ expressam o CD34 independente da fonte avaliada (Figura 4), as células CD34+ presentes na fração mononuclear de MO e SCU, revelaram uma diferença significativa na porcentagem de células que co-expressam o marcador CD133, com um maior número de células CD133+ entre as CD34+ de SCU (Figura 5). Essas diferenças corroboram o estudo de Wynter e col, que observou a expressão do marcador CD133 em 35% das células CD34+ de MO, enquanto no SCU, essa porcentagem foi de 50% (DE WYNTER et al., 1998).

A presença de subpopulações de células-tronco no compartimento hematopoético, aliada às diferenças na composição celular desse compartimento, podem contribuir para a diversidade de comportamento das CTH em diferentes fontes (SIEBURG et al., 2006), como a maior atividade proliferativa das CTH de fígado fetal comparada as CTH de MO (REBEL et al., 1996) ou o maior potencial de *homing* das células CD34+ de SCU comparado às células CD34+ de MO em ensaios de transmigração (VOERMANS et al., 1999). Da mesma maneira, diferenças nos resultados de pacientes após o transplante de CTH de SCU ou de MO, como uma menor incidência da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e uma demora no enxertamento e restabelecimento de células do sistema imune nos pacientes transplantados com as CTH dos neonatos (ROCHA et al., 2004), também podem ser parcialmente explicadas por diferenças na composição celular dos enxertos. No entanto, a fim de explicar as diferenças funcionais entre as CTH de fontes

distintas, além da composição celular, devemos considerar as características moleculares intrínsecas da fonte, como discutiremos mais a frente.

De maneira geral, nossas análises imunofenotípicas, somadas à outros estudos, refletem uma grande heterogeneidade das células CD34+ de MO, enquanto as células de SCU apresentam, uma composição celular mais homogênea, com características mais primitivas (elevada expressão de CD133).

## **5.2 Similaridade entre as células CD133+ de MO e as células de SCU**

Após a obtenção dos perfis de expressão gênica das amostras distintas gerados pelos *microarrays*, nós realizamos, inicialmente, uma análise de clusterização a fim de determinar as similaridades e características específicas entre os grupos propostos (Figura 7). A qualidade das análises dos *microarrays* foi verificada pelo estreito agrupamento entre as replicatas experimentais das amostras CD34+ de MO, refletindo a reprodutibilidade experimental da plataforma utilizada. Ainda, o agrupamento independente dos perfis de transcrição de acordo com o marcador (CD34 ou CD133) e fonte (MO ou SCU), indicou que a estratégia de *pools* adotada por nós foi capaz de refletir, de modo geral, as similaridades e diferenças entre as células analisadas.

Uma vez constatada a qualidade e o potencial da técnica de análise global, nossos resultados revelaram que o estreito agrupamento entre as amostras CD34+ de SCU e CD133+ de SCU, seguido pelas amostras CD133+ de MO e finalmente pelas CD34+ de MO, pôde indicar que o marcador CD133, define, de fato, uma subpopulação mais primitiva dentro da população de

células CD34<sup>+</sup> de MO, com características moleculares mais próximas às células de SCU, ontologicamente mais primitivas.

Enquanto a diferença significativa na porcentagem de células CD133<sup>+</sup> entre as células CD34<sup>+</sup> de ambas as fontes, determinada por nossas análises imunofenotípicas, explica o agrupamento a parte das amostras CD34<sup>+</sup> de MO (mais heterogênea), o agrupamento preferencial entre as células CD133<sup>+</sup> de SCU com as células CD34<sup>+</sup> de SCU, ao invés das próprias células CD133<sup>+</sup> de MO, não é tão óbvio.

### ***5.3 Enriquecimento de células CD133<sup>+</sup> após seleção imunomagnética de células CD34<sup>+</sup>***

Uma vez que a maior parte das células CD133<sup>+</sup> são CD34<sup>bright</sup>, apresentando elevada expressão de CD34, e as células CD34<sup>dim</sup> (que apresentam baixa expressão de CD34) são CD133 negativas (GALLACHER et al., 2000; JAATINEN et al., 2006), em tese, o procedimento de seleção imunomagnética de células CD34<sup>+</sup> poderia resultar em um aumento da porcentagem de células duplo positivas (que expressam ambos os marcadores), já que as células com um maior número de epítomos CD34 (CD34<sup>bright</sup>) seriam preferencialmente selecionadas. Assim, decidimos avaliar a expressão do marcador CD133 antes e após o procedimento de seleção imunomagnética das células CD34<sup>+</sup> e vimos que, de fato, o procedimento de seleção positiva proporcionou um aumento na porcentagem de células CD133<sup>+</sup> nas células CD34<sup>+</sup> selecionadas tanto de SCU como de MO (Figura 6).

O enriquecimento de células CD133<sup>+</sup> após seleção das células CD34<sup>+</sup> de SCU observado por nós (de cerca de 66% para de 80%), explica a elevada

porcentagem relatada em outros estudos (POMYJE et al., 2003; HE et al., 2005; OKAMOTO et al., 2007) e determina que, apesar do uso de diferentes marcadores na seleção das células de SCU, as populações obtidas são muito similares. Assim, essa semelhança imunofenotípica explicaria parcialmente o agrupamento obtido por nossa análise de clusterização, mais especificamente, a proximidade entre as amostras CD133+ de SCU e CD34+ de SCU.

Adicionalmente, a separação entre os perfis de expressão de células CD133+ de MO e SCU, obtidos de amostras altamente homogêneas, indica que mesmo esta subpopulação de células difere em função da origem. Uma conclusão em linha com os estudos realizados com células CD34+CD38-, também definida como uma subpopulação de células mais primitivas (WEEKX et al., 1998). Mesmo essa subpopulação, possui propriedades distintas dependendo da idade ontológica (SHOJAEI et al., 2004). Embora outras subpopulações presentes nas células CD133+ (ou mesmo CD38-) possam ser responsabilizadas pelas diferenças observadas, o fenótipo de uma determinada população não é uma característica estática, mas sim, o resultado de uma sinalização contínua entre essas células e seu ambiente, e portanto, fortemente interconectados e de difícil distinção.

#### **5.4 Fatores de transcrição hiper-expressos nas células CD133+**

Com o intuito de identificar mecanismos moleculares relacionados à maior primitividade das células CD133+, comparamos os perfis de expressão gênica entre as células CD133+ e as células CD34+ e selecionamos dentre os genes diferencialmente expressos, todos os fatores de transcrição

apresentando maior expressão nas células CD133+. Um total de 47 FT foram encontrados, muitos deles, com papéis bem conhecidos, no surgimento da hematopoese no embrião e, portanto, relacionados com o proposto potencial de hemangioblasto destas células. A seguir, apresentamos uma breve descrição de alguns destes importantes fatores, selecionados e avaliados neste trabalho.

#### 5.4.1 TAL1

O TAL1, também denominado SCL é membro da família *helix-loop-helix* de fatores de transcrição (BEGLEY et al., 1989) e identificado como um dos principais reguladores da hematopoese nos estágios precoces do desenvolvimento. A ausência de TAL1 em camundongos ocasionou a morte de embriões entre os dias E9-10.5 por anemia (SHIVDASANI & MAYER ; ORKIN, 1995) e a diferenciação *in vitro* de células embrionárias deficientes desse gene demonstrou o completo bloqueio da hematopoese definitiva revelando que o gene TAL1 é essencial para o desenvolvimento de todas as linhagens sanguíneas (PORCHER et al., 1996).

Além da hematopoese definitiva, o TAL1 pode atuar no estabelecimento da hematopoese primitiva (BEGLEY & GREEN, 1999). Durante a embriogênese de camundongos, sua expressão precede ou ocorre paralelamente ao estabelecimento dos sítios hematopoéticos, podendo ser detectada na mesoderme extra e intra-embrionária no dia E7.5 , nas ilhas de sangue no saco vitelínico no dia E8.5 e em tecidos hematopoéticos adultos (KALLIANPUR; JORDAN ; BRANDT, 1994). Em células CD34+ de SCU a hiperexpressão de TAL1 foi capaz de promover a auto-renovação e aumentar o

potencial de reconstituição da hematopoese em camundongos irradiados. Adicionalmente esses resultados mostraram ser dependente da atividade de ligação desse fator ao DNA (REYNAUD et al., 2005).

Enquanto células originárias do saco vitelínico de embriões deficientes de TAL1 apresentaram capacidade de originar células hematopoéticas primitivas ou definitivas, não foram capazes de desenvolver uma rede vascular primária, indicando o papel principal desse fator de transcrição no comprometimento hematopoético mas não nos estágios iniciais de vasculogênese . (BEGLEY et al., 1989; ROBB et al., 1995; SHIVDASANI et al., 1995) Apesar de não ser essencial para o estabelecimento da linhagem endotelial, o TAL1 é requerido para a angiogênese embrionária, caracterizada pela proliferação e remodelamento das células endoteliais pré-existentes no plexo vascular primário (rede de capilares no saco vitelínico) em um complexo vascular maduro (VISVADER; FUJIWARA ; ORKIN, 1998). Dessa maneira, parece atuar na interface entre o desenvolvimento de células hematopoéticas e vascular com um papel dual tanto na regulação da hematopoese como no remodelamento e maturação vascular no embrião, conferindo uma possível função do TAL1 em células com potencial de hemangioblasto (PATTERSON et al., 2007; JAFFREDO et al., 2005).

#### **5.4.2 RUNX1**

Também conhecido como AML1, o RUNX1 possui um papel importante no estabelecimento da hematopoese definitiva, mas não na primitiva, uma vez que embriões deficientes de RUNX1 desenvolvem normalmente as ilhas de sangue no saco vitelínico, mas morrem entre os dias E11 e E12.5. Antes da

morte, o fígado rudimentar apresenta eritrócitos nucleares primitivos, mas ausência de células eritróides, mielóides, megacarióides, indicando o bloqueio da hematopoese definitiva no embrião (OKUDA; VAN; HIEBERT; GROSVELD ; DOWNING, 1996; WANG et al., 1996).

Apesar da maioria dos trabalhos definirem o papel de RUNX1 no estabelecimento e expansão do programa hematopoético definitivo, alguns estudos de expressão gênica sugerem que ele possa atuar em estágios anteriores do desenvolvimento. Neste sentido, North e col demonstraram a expressão de RUNX1 em subpopulações de células endoteliais no saco vitelínico, artérias vitelínica e umbilical e na parede ventral da aorta dorsal (NORTH et al., 1999). Adicionalmente a expressão desse gene foi detectada em eritrócitos primitivos emergentes no saco vitelínico. A presença de transcritos de RUNX1 nesses eritrócitos e em subpopulações de células endoteliais sugere, assim, a atuação desse gene em estágios precoces do desenvolvimento. Em linha com essa idéia, Lacaud e col, demonstraram a funcionalidade do gene RUNX1 em corpos embrióides (*EB- embryoid bodies*), células equivalentes ao hemangioblasto *in vitro*, bem como o papel essencial do mesmo no comprometimento hematopoético durante a ontogenia (LACAUD et al., 2002).

### 5.4.3 Genes HOX

Os genes Hox (*homeobox genes*) constituem uma família de fatores de transcrição altamente conservados durante a evolução e são organizados em 4 grupos ou *clusters* genômicos (A-D) (ARGIROPOULOS & HUMPHRIES, 2007). Estudos de expressão gênica em amostras de MO, tanto de humanos como de



camundongos, revelaram que a maioria dos genes HOX dos grupos A, B e C são expressos em células hematopoéticas, preferencialmente em subpopulações enriquecidas com CTH mais primitivas, enquanto são negativamente regulados durante o processo de diferenciação e maturação (GIAMPAOLO et al., 1994; GIAMPAOLO et al., 1995; MORETTI et al., 1994; SAUVAGEAU et al., 1994; KAWAGOE; HUMPHRIES; BLAIR; SUTHERLAND ; HOGGE, 1999; PINEAULT; HELGASON; LAWRENCE ; HUMPHRIES, 2002). Essas observações levaram à hipótese de que os genes Hox poderiam ter funções cruciais em CTH mais primitivas, e que a expressão desregulada dos mesmos poderiam ter impacto em transformações leucêmicas.

No entanto, enquanto inúmeros estudos demonstram o envolvimento dos genes HOX na regulação da hematopoese, as funções precisas e os mecanismos regulatórios envolvidos com esses fatores não são tão evidentes (ARGIROPOULOS & HUMPHRIES, 2007). A fim de elucidar esses mecanismos, diversos estudos de modificação gênica envolvendo o *knockout* (ausência) ou a expressão forçada dos genes Hox em CTH foram desenvolvidos; de modo que a maioria deles têm destacado o importante papel desses genes na auto-renovação e expansão das CTH. Entre os principais envolvidos com essas propriedades, estão os genes Hox encontrados em nossos estudos: HOXB4 e HOXA9 (ARGIROPOULOS& HUMPHRIES, 2007).

#### **5.4.3.1 HOXB4**

A expressão de HOXB4 em células hematopoéticas humanas e murinas foi detectada em diversos estudos (SAUVAGEAU et al., 1994; PINEAULT; HELGASON; LAWRENCE; HUMPHRIES, 2002) e a hiperexpressão do mesmo

ou a distribuição de sua proteína, demonstrou ser suficiente para estimular a expansão de CTH *in vivo* e *ex vivo* sem, no entanto, promover transformação leucêmica (SAUVAGEAU et al., 1995; ANTONCHUK; SAUVAGEAU ; HUMPHRIES, 2001; ANTONCHUK; SAUVAGEAU ; HUMPHRIES, 2002; AMSELLEM et al., 2003; SCHIEDLMEIER et al., 2007).

A expansão das CTH pela expressão constitutiva de HOXB4 pode ocorrer devido ao aumento da auto-renovação da população de células-tronco ou pelo aumento da sobrevivência do *pool* dessas células e pode estar relacionada à transcrição de alvos específicos, a fim de permitir a manutenção das características primitivas das CTH (BESLU et al., 2004). De maneira interessante, a expressão ectópica de HOXB4 confere a células hematopoéticas primitivas, derivadas do saco vitelínico de camundongos, a habilidade em reconstituir ambas as linhagens mielóide e linfóide em recipientes letalmente irradiados, conferindo a esses progenitores um potencial de CTH definitiva (KYBA; PERLINGEIRO ; DALEY, 2002). No entanto, esses resultados são controversos, uma vez que a elevada expressão de HOXB4 em células CD34+ de SCU, levou a uma redução dos progenitores eritróides, mielóides e linfócitos B *in vitro* embora tenha promovido, *in vivo*, um aumento na capacidade de enxertamento em ensaios de competição (SCHIEDLMEIER et al., 2003).

#### 5.4.3.2 HOXA9

Considerado o mais expresso dentre os genes HOX no compartimento hematopoético, o fator de transcrição HOXA9 pode ser o principal determinante da auto-renovação em CTH (ARGIROPOULOS & HUMPHRIES, 2007). Assim

como o HOXB4, o HOXA9 é preferencialmente expresso em progenitores hematopoéticos primitivos e tem sua expressão diminuída durante a diferenciação dessas células, sugerindo ter um papel funcional importante nos estágios precoces da hematopoese (SAUVAGEAU et al., 1994; PINEAULT et al., 2002). De fato, camundongos deficientes de HOXA9 exibem falhas no desenvolvimento de múltiplas linhagens (LAWRENCE et al., 1997; IZON et al., 1998) e ensaios de repopulação competitivos, *in vivo*, revelaram que o principal defeito apresentado por esses camundongos foi uma diminuição na capacidade de repopulação após o transplante de CTH de MO. (LAWRENCE et al., 2005).

Por outro lado, a capacidade de reconstituição da hematopoese e o potencial de expansão das CTH sob elevada expressão de HOXA9, foi demonstrada em modelo de transplante de MO em camundongos (THORSTEINSDOTTIR et al., 2002). Esses resultados, somados à expressão preferencial de HOXA9 em células hematopoéticas primitivas (SAUVAGEAU et al., 1994) e à redução do número de CTH na ausência de HOXB9 (LAWRENCE et al., 1997), indicam que esse FT possa ser um dos principais reguladores de CTH mais primitivas (THORSTEINSDOTTIR et al., 2002).

De maneira geral, os genes HOXB4 e HOXA9 têm demonstrado um importante efeito na expansão das CTH e um possível papel no programa de transição da hematopoese primitiva para a definitiva. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais esses genes iniciam ou intensificam o processo de auto-renovação bem como os potenciais genes alvos envolvidos ainda necessitam de uma maior elucidação (ARGIROPOULOS & HUMPHRIES, 2007).

#### **5.4.4 USF1**

Os fatores de transcrição USF têm sido considerados reguladores-chave de um gama de programas de regulação gênica, incluindo resposta imune e ao estresse, ciclo celular e controle da proliferação (CORRE & GALIBERT, 2005). De maneira interessante, o USF1 é identificado como um fator de transcrição estimulador que se liga ao promotor do gene HOXB4 em situações envolvendo auto-renovação nas CTH (GIANNOLA et al., 2000; ZHU et al., 2003).

#### **5.4.5 GATA-3**

Membro da família GATA de fatores de transcrição (WEISS; ORKIN, 1995) e junto com GATA-1 e GATA-2, são predominantemente expressos em células hematopoéticas. Considerado um fator de transcrição específico de células Th2, tem uma função primária no controle da diferenciação da subpopulação linfocitária Th no sistema imune (SZABO; SULLIVAN; PENG; GLIMCHER, 2003; MOWEN; GLIMCHER, 2004; SAKAGUCHI et al., 2006; WEAVER; HARRINGTON; MANGAN; GAVRIELI ; MURPHY, 2006). Além de ser crucial para a diferenciação e função das células Th2, o GATA-3 apresenta importantes funções regulatórias durante o comprometimento de progenitores linfóides na linhagem T e em etapas específicas do desenvolvimento tímico (HENDRIKS et al., 1999; HATTORI; KAWAMOTO; FUJIMOTO; KUNO ; KATSURA, 1996; TING; OLSON; BARTON ; LEIDEN, 1996). Adicionalmente tem se atribuído ao GATA-3 um papel na sobrevivência de linfócitos CD4+, embora esse mecanismo ainda não seja completamente elucidado (HO & PAI, 2007).

Além do sistema hematopoético, é também expresso em tecidos e órgãos não hematopoéticos, como o sistema nervoso central, pele, glândulas mamárias e fígado, durante a embriogênese (OOSTERWEGEL; TIMMERMAN; LEIDEN ; CLEVERS, 1992; GEORGE et al., 1994; LABASTIE; CATALA; GREGOIRE ; PEULT, 1995; DEBACKER; CATALA ; LABASTIE, 1999; RIVOLTA ; HOLLEY, 1998), cujo papel na ontogenia é enfatizado pela morte de camundongos deficientes de GATA3 no dia E11.5 (PANDOLFI et al., 1995).

No entanto, o completo mecanismo de ação e os alvos transcricionais, (que não as citocinas do padrão Th2, tais como IL-5 e IL13) de GATA-3, cujas funções parece ir além do controle da diferenciação de linfócitos Th2, ainda permanecem elusivos (KISHIKAWA; SUN; CHOI; MIAW ; HO, 2001; LAVENU-BOMBLED; TRAINOR; MAKEH; ROMEO ; MAX-AUDIT, 2002; YAMASHITA et al., 2002;HO & PAI, 2007).

Dessa maneira, enquanto o enriquecimento de todos esses fatores de transcrição nas células CD133+ *per se* define mecanismos regulatórios biologicamente significantes, algumas relações entre eles, descritas na literatura ou exploradas por nós, contribuem para a melhor compreensão do controle genético envolvido na manutenção de um estado mais primitivo das CTH.

### **5.5 Análise de promotores e a participação da via NFκB**

Com o objetivo de compreender os mecanismos regulatórios envolvidos no controle dos fatores de transcrição encontrados hiper-expressos nas células CD133+, realizamos uma busca por sítios de ligação (*binding sites*, BS) para

FT nos promotores desse conjunto de genes. O resultado dessa análise revelou uma frequência e incidência de BS, significativamente maior do que o esperado, para os fatores da via NF- $\kappa$ B, incluindo como potenciais alvos de NF $\kappa$ B os fatores RUNX1, GATA3 e USF1.

A participação da via de sinalização NF $\kappa$ B, especialmente a maior ativação da via não canônica (mediada pelas subunidades NF $\kappa$ B2 e RELB) nas células CD34+ de SCU, quando comparadas às células CD34+ de MO, já havia sido anteriormente descrita por Panepucci e col, que destacou a possível relação da mesma com os estados mais primitivos das CTH dos neonatos. (PANEPUCCI et al., 2007). Em linha com o trabalho anterior, no presente estudo, a via NF $\kappa$ B aparece com um potencial papel regulatório na transcrição de importantes FT encontrados em níveis elevados nas células CD133+.

### **5.6 Avaliação dos transcritos por PCR em tempo real e análise de correlação**

A avaliação dos níveis de expressão de RUNX1, GATA3, USF1, TAL1, HOXA9 e HOXB4 por PCR em tempo real nas amostras utilizadas para a confecção dos *pools* e em amostras adicionais, permitiu a validação dos resultados obtidos pela técnica de *microarray*.

Consistente com o proposto papel de NF $\kappa$ B no envolvimento com um estado mais primitivo das CTH (PANEPUCCI et al., 2007), as amostras CD133+ de MO apresentaram maiores níveis de NF $\kappa$ B2 e RELB do que as amostras CD34+ de MO. Ainda, as amostras de SCU apresentaram níveis significativamente maiores desses transcritos quando comparadas com as de

MO, para ambas populações (CD34+ e CD133+), exceto para NFKB2 quando comparado entre as células CD133+ de MO e SCU ( $p=0.0992$ ). Assim, mesmo as subpopulações CD133+ consideradas mais homogêneas e primitivas, revelaram uma influência do microambiente do SCU em seu padrão de expressão gênica.

Fortes evidências sugerem que maiores níveis de NOTCH1 em CTH mais primitivas, podem estar relacionado à via de sinalização NF- $\kappa$ B. Por exemplo, NOTCH1 facilita a retenção nuclear dos complexos de NF- $\kappa$ B (SHIN et al., 2006) e uma grande quantidade de estudos indicam uma ativação coordenada da sinalização de NOTCH e NF $\kappa$ B em processos patológicos e normais (RAMDASS et al., 2007; WANG; ZHANG; BANERJEE; LI; SARKAR, 2006; WANG et al., 2006. Esses achados nos levaram a investigar os níveis de NOTCH1 nos grupos de células estudados.

A quantificação de todos os transcritos dos fatores de transcrição mencionados, por PCR em tempo real, em um grande número de amostras independentes, nos permitiu avaliar a significância estatística da correlação entre os mesmos e, posteriormente, explorar potenciais mecanismos regulatórios envolvidos no programa genético das CTH.

Desde que NFKB2 e RELB agem em conjunto (sob a forma de dímeros) para regular a transcrição de seus alvos, dentre eles o próprio RELB, a sua elevada correlação ( $r=0.88$ ) era esperada (BREN et al., 2001). No entanto, dentre todos os fatores de transcrição, NOTCH1 foi o transcrito mais correlacionado com os demais, incluindo GATA3 ( $r=0.83$ ), RELB ( $r=0.8$ ) e NFKB2 ( $r=0.71$ ), sugerindo ter uma participação importante na regulação transcricional desses genes. A estatística significativa ( $P<0.0001$ )

e o alto coeficiente de correlação ( $r > 0.7$ ) encontrado entre os transcritos de NOTCH1, RELB e NFkB2 pode refletir a *up*-regulação dos transcritos das subunidades de NF-kB por NOTCH1 (CHENG et al., 2001) bem como o mecanismo de de-repressão do promotor de NFkB2 mediado por NOTCH1 (NAKAZAWA et al., 2001; OSWALD et al., 1998). Interessantemente, trabalhos publicados durante o curso do presente estudo, descreveram a direta regulação de GATA3 por NOTCH1, o que pode contar para a forte correlação entre esses fatores encontradas por nós. (AMSEN et al., 2007; FANG et al., 2007; KUBO, 2007).

Apesar da conhecida regulação de GATA3 por NOTCH1, nossa análise de promotores revelou a existência de BS para fatores da via NFkB no promotor de GATA3, bem como de RUNX1 e USF1, os quais poderiam ser novos alvos transcricionais de NFkB. A avaliação de RUNX1, GATA3 e USF1 por PCR em tempo real confirmaram os níveis mais elevados desses transcritos nas células CD133+ de MO, comparadas às células CD34+ de SCU (seguindo o mesmo padrão de NFkB2 e RELB).

De maneira interessante, NOTCH1 e RUNX1 também apresentaram altamente correlacionados entre si ( $r = 0.79$ ), em linha com a proposta regulação de RUNX1 por NOTCH1 (BURNS; TRAVER; MAYHALL; SHEPARD ; ZON, 2005; KUMANO et al., 2003).

Adicionalmente, a elevada correlação dos transcritos de RUNX1 com GATA3 (0.80) e também de RUNX1 com TAL1 ( $r = 0.60$ ) observada por nós, corrobora a recente descrição da regulação de RUNX1 por TAL1 e por membros da família GATA (NOTTINGHAM et al., 2007; LANDRY et al., 2008).



As células de SCU apresentaram uma expressão dos transcritos de TAL1 e RUNX1 significativamente maior, quando comparadas às células de MO, para ambas as populações, CD133+ e CD34+. No entanto, os transcritos de TAL1 não apresentaram diferenças entre as amostras de CD34+ de MO e CD133+ de MO, embora os elevados níveis de TAL1 nas células CD133+ de SCU tenham contribuído para as diferenças encontradas nos *microarrays* na comparação entre as amostras CD133+ e as amostras de CD34+ (figura 10).

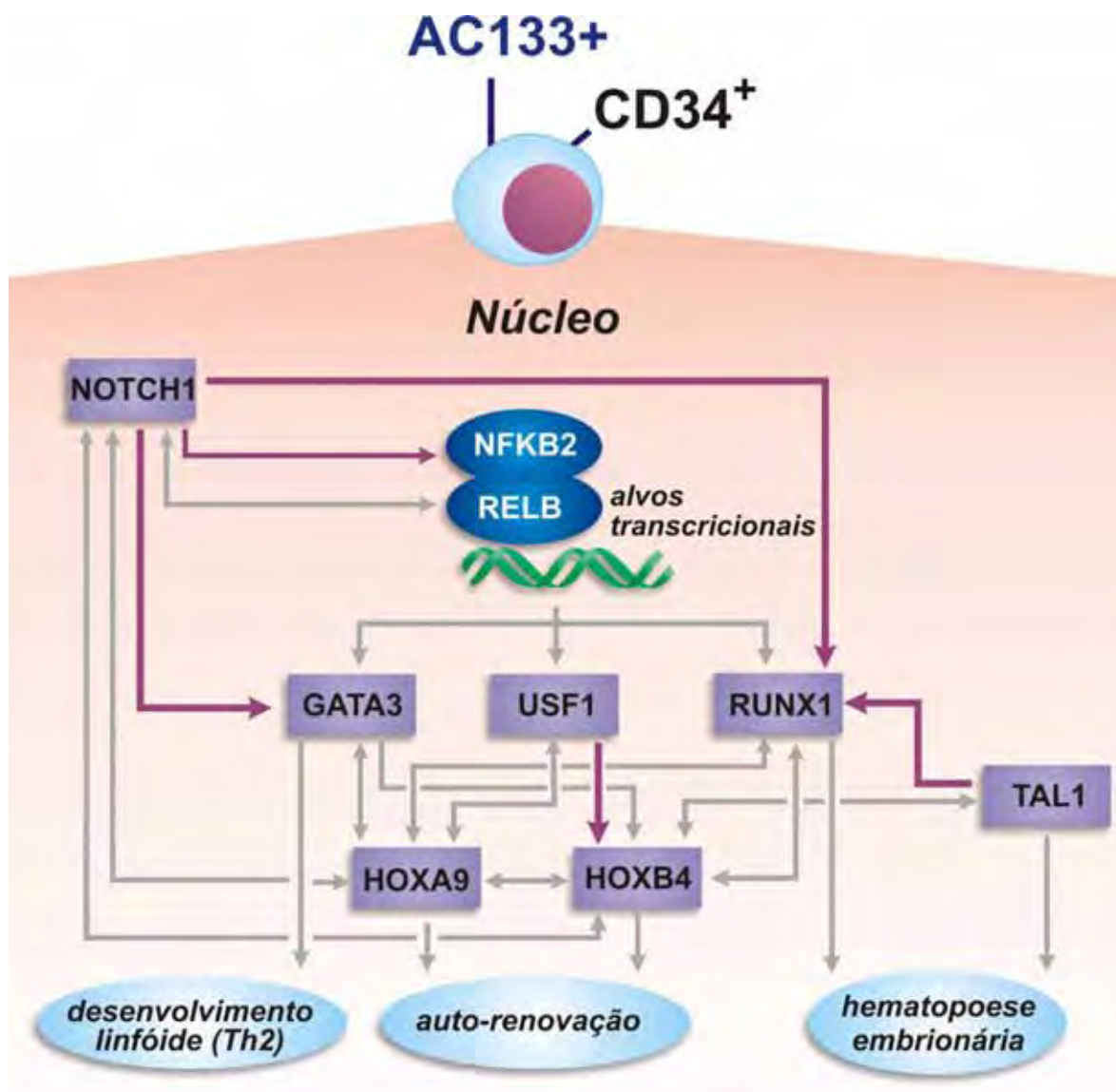
Enquanto a maioria dos transcritos apresentaram níveis de expressão significativamente maior nas células CD133+ de MO, comparados às células CD34+ de MO, somente USF1, HOXB4 e HOXA9 seguiram o mesmo padrão nas células de SCU, ou seja, apresentaram-se significativamente mais elevados nas células CD133+ de SCU quando comparadas às células CD34+ de SCU. Assim, apesar das populações celulares selecionadas por ambos os marcadores (CD34 e CD133) no SCU serem muito semelhantes, os fatores USF1, HOXB4 e HOXA9 assumem um padrão de expressão distinto, determinado pelo fenótipo celular.

Nossos resultados corroboram outros estudos que demonstram a regulação de HOXB4 por USF1 (GIANNOLA et al., 2000; ZHU et al., 2003) e acrescenta que, considerando a maior correlação entre USF1 com HOXA9 do que entre USF1 e HOXB4 ( $r = 0.69$  e  $0.53$ , respectivamente), bem como entre ambos os genes HOX com RUNX1, GATA3 e NOTCH1 e, finalmente, entre HOXB4 e TAL1 ( $0.71$ ), outros fatores, além do USF1, poderiam ter importantes papéis na regulação de HOXB4 nas CTH. No entanto, é importante ressaltar que a correlação entre os transcritos pode evidenciar

tanto a regulação de um fator de transcrição pelo outro, ou vice-versa, como de ambos por um terceiro fator que estaria acima (ou *up-stream*) dos mesmos.

### ***5.7 Evidências de uma potencial rede de regulação transcricional nas CTH***

A revelação de elevadas correlações entre todos os FT avaliados, aliadas às recentes descrições da regulação entre alguns desses fatores apresentados pela literatura, somam evidências para a existência de uma rede de regulação transcricional interconectando importantes FT relacionados às características mais primitivas das CTH. As corregulações entre esses fatores poderiam ser parcialmente responsáveis pela manutenção de um estado mais primitivo das células CD133+ e das células de SCU em geral (Figura 15).



**Figura 15: Rede de regulação gênica interconectando diferentes fatores de transcrição relacionados à primitividade das CTH.** As ligações entre os fatores de transcrição propostas é baseada na análise de correlação entre os níveis de expressão dos transcritos avaliados. Desse modo, as setas em violeta e com único sentido, representam as regulações que corroboram a literatura, enquanto as setas em cinza, de mão dupla, representam as co-regulações evidenciadas por nossos resultados, de modo que o sentido da regulação, bem como a possibilidade de ambos os fatores ligados, serem regulados por um terceiro fator, necessitam de maior investigação.

## **6. Conclusões**

Em nosso trabalho, comparamos subpopulações distintas de CTH definidas pela expressão dos marcadores de superfície clássicos: CD34 e CD133. A caracterização da composição celular das CTH de SCU e MO, baseadas na expressão desses marcadores, revelou uma maior heterogeneidade das células CD34+ de MO quando comparadas às células CD34+ de SCU, as quais apresentam uma composição mais homogênea e primitiva, como um todo (maior porcentagem de células CD133+).

O marcador CD133, foi capaz de definir uma subpopulação de células mais primitivas na MO, com características moleculares mais próximas às células de SCU. No entanto, mesmo essa população de células mais primitivas (CD133+) apresentaram diferenças no perfil transcricional entre MO e SCU, refletindo, assim, características moleculares intrínsecas relacionadas à fonte de origem. Essas características estariam intimamente ligadas ao fenótipo da população, sendo este o resultado de uma sinalização contínua entre as células e o seu ambiente (MO ou SCU).

A comparação dos perfis de expressão gênica entre as células CD133+ e as células CD34+, revelou elevados níveis de importantes fatores de transcrição relacionados à primitividade das CTH nas células CD133+, dentre os quais, potenciais alvos da via NFκB. Nossos resultados confirmam a importância de NFκB na primitividade das CTH, uma vez que seus níveis se encontraram elevados não apenas em células ontogeneticamente mais primitivas (como as do cordão umbilical), mas também, em células adultas mais primitivas, com base em seu fenótipo (CD133+). A correlação positiva significativa entre NFκB, NOTCH1 e os demais fatores de transcrição avaliados, evidenciam uma potencial co-regulação entre os mesmos nas CTH. Assim, a

maior porcentagem de células primitivas no SCU, e conseqüentemente, a maior primitividade deste, seriam, o resultado de mecanismos regulatórios coordenados por níveis mais elevados de diferentes fatores transcricionais, entre eles, os destacados neste trabalho.

Em suma nossos resultados inferem a existência de uma rede transcricional altamente interconectada, caracterizada pela expressão coordenada de NOTCH, NFκB e outros importantes fatores de transcrição. O potencial mecanismo regulatório proposto no presente estudo contribui, assim, com os esforços atuais para a compreensão dos programas genéticos responsáveis pela manutenção da primitividade das CTH e serve como base para futuros estudos funcionais, a fim de validar os mecanismos de regulação e os alvos transcricionais específicos de cada um dos fatores apresentados.

## **Referências**

AMSELLEM, S.; PFLUMIO, F.; BARDINET, D.; IZAC, B.; CHARNEAU, P.; ROMEO, P. H. et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. **Nat.Med.**, v. 9, n. 11, p. 1423-1427, 2003.

AMSEN, D.; ANTOV, A.; JANKOVIC, D.; SHER, A.; RADTKE, F.;SOUABNI, A. et al. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. **Immunity.**, v. 27, n. 1, p. 89-99, 2007.

ANTONCHUK, J.; SAUVAGEAU, G.;HUMPHRIES, R. K. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. **Cell**, v. 109, n. 1, p. 39-45, 2002.

ARGIROPOULOS, B. ; HUMPHRIES, R. K. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 47, p. 6766-6776, 2007.

BEGLEY, C. G.; APLAN, P. D.; DENNING, S. M.; HAYNES, B. F.; WALDMANN, T. A.;KIRSCH, I. R. The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 86, n. 24, p. 10128-10132, 1989.

BAILEY, A. S.; JIANG, S.; AFENTOULIS, M.; BAUMANN, C. I.; SCHROEDER, D. A.; OLSON, S. B. et al. Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 13-19, 2004.

BEGLEY, C. G.; APLAN, P. D.; DENNING, S. M.; HAYNES, B. F.; WALDMANN, T. A.;KIRSCH, I. R. The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 86, n. 24, p. 10128-10132, 1989.

BEGLEY, C. G. ; GREEN, A. R. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. **Blood**, v. 93, n. 9, p. 2760-2770, 1999.

BEINKE, S.; LEY, S. C. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. **Biochem.J.**, v. 382, n. Pt 2, p. 393-409, 2004.

BESLU, N.; KROSL, J.; LAURIN, M.; MAYOTTE, N.; HUMPHRIES, K. R.;SAUVAGEAU, G. Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2307-2314, 2004.

BHATIA, M. AC133 expression in human stem cells. **Leukemia**, v. 15, n. 11, p. 1685-1688, 2001.



BREN, G. D.; SOLAN, N. J.; MIYOSHI, H.; PENNINGTON, K. N.; POBST, L. J.; PAYA, C. V. Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB. **Oncogene**, v. 20, n. 53, p. 7722-7733, 2001.

BURNS, C. E.; TRAVER, D.; MAYHALL, E.; SHEPARD, J. L.; ZON, L. I. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. **Genes Dev.**, v. 19, n. 19, p. 2331-2342, 2005.

BURT, R. K. Clinical utility in maximizing CD34+ cell count in stem cell grafts. **Stem Cells**, v. 17, n. 6, p. 373-376, 1999.

BUSKE, C.; FEURING-BUSKE, M.; ABRAMOVICH, C.; SPIEKERMANN, K.; EAVES, C. J.; COULOMBEL, L. et al. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 862-868, 2002.

CHENG, P.; ZLOBIN, A.; VOLGINA, V.; GOTTIPATI, S.; OSBORNE, B.; SIMEL, E. J. et al. Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells. **J.Immunol.**, v. 167, n. 8, p. 4458-4467, 2001.

CIVIN, C. I.; STRAUSS, L. C.; BROVALL, C.; FACKLER, M. J.; SCHWARTZ, J. F.; SHAPER, J. H. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. **J.Immunol.**, v. 133, n. 1, p. 157-165, 1984.

COLE, S. W.; YAN, W.; GALIC, Z.; AREVALO, J.; ZACK, J. A. Expression-based monitoring of transcription factor activity: the TELiS database. **Bioinformatics.**, v. 21, n. 6, p. 803-810, 2005.

CORRE, S. ; GALIBERT, M. D. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. **Pigment Cell Res.**, v. 18, n. 5, p. 337-348, 2005.

DE SMEDT, M.; REYNVOET, K.; KERRE, T.; TAGHON, T.; VERHASSELT, B.; VANDEKERCKHOVE, B. et al. Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. **J.Immunol.**, v. 169, n. 6, p. 3021-3029, 2002.

DE WYNTER, E. A.; BUCK, D.; HART, C.; HEYWOOD, R.; COUTINHO, L. H.; CLAYTON, A. et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. **Stem Cells**, v. 16, n. 6, p. 387-396, 1998.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Exp. Hematol.**, v.28, n 8, p. 875-884,2000.

DEBACKER, C.; CATALA, M.;LABASTIE, M. C. Embryonic expression of the human GATA-3 gene. **Mech.Dev.**, v. 85, n. 1-2, p. 183-187, 1999.

DORSAM, S. T.; FERRELL, C. M.; DORSAM, G. P.; DERYNCK, M. K.; VIJAPURKAR, U.; KHODABAKHSH, D. et al. The transcriptome of the leukemogenic homeoprotein HOXA9 in human hematopoietic cells. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1676-1684, 2004.

DZIERZAK, E. Embryonic beginnings of definitive hematopoietic stem cells. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v. 872, p. 256-262, 1999.

FANG, T. C.; YASHIRO-OHTANI, Y.; DEL, B. C.; KNOBLOCK, D. M.; BLACKLOW, S. C.;PEAR, W. S. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. **Immunity.**, v. 27, n. 1, p. 100-110, 2007.

FERRELL, C. M.; DORSAM, S. T.; OHTA, H.; HUMPHRIES, R. K.; DERYNCK, M. K.; HAQQ, C. et al. Activation of stem-cell specific genes by HOXA9 and HOXA10 homeodomain proteins in CD34+ human cord blood cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 5, p. 644-655, 2005.

FRASSONI, F.; PODESTA, M.; MACCARIO, R.; GIORGIANI, G.; ROSSI, G.; ZECCA, M. et al. Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 1138-1141, 2003.

GALLACHER, L.; MURDOCH, B.; WU, D. M.; KARANU, F. N.; 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**, v. 95, n. 9, p. 2813-2820, 2000.

GAO, Z.; FACKLER, M. J.; LEUNG, W.; LUMKUL, R.; RAMIREZ, M.; THEOBALD, N. et al. Human CD34+ cell preparations contain over 100-fold greater NOD/SCID mouse engrafting capacity than do. **Exp.Hematol.**, v. 29, n. 7, p. 910-921, 2001.

GEHLING, U. M. Hemangioblasts and their progeny. **Methods Enzymol.**, v. 419, p. 179-193, 2006.

GEORGE, K. M.; LEONARD, M. W.; ROTH, M. E.; LIEUW, K. H.; KIOUSSIS, D.; GROSVELD, F. et al. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. **Development**, v. 120, n. 9, p. 2673-2686, 1994.

GIAMPAOLO, A.; PELOSI, E.; VALTIERI, M.; MONTESORO, E.; STERPETTI, P.; SAMOGGIA, P. et al. HOXB gene expression and function in differentiating purified hematopoietic progenitors. **Stem Cells**, v. 13 Suppl 1, p. 90-105, 1995.

GIAMPAOLO, A.; STERPETTI, P.; BULGARINI, D.; SAMOGGIA, P.; PELOSI, E.; VALTIERI, M. et al. Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. **Blood**, v. 84, n. 11, p. 3637-3647, 1994.

GIANNOLA, D. M.; SHLOMCHIK, W. D.; JEGATHESAN, M.; LIEBOWITZ, D.; ABRAMS, C. S.; KADESCH, T. et al. Hematopoietic expression of HOXB4 is regulated in normal and leukemic stem cells through transcriptional activation of the HOXB4 promoter by upstream stimulating factor (USF)-1 and USF-2. **J.Exp.Med.**, v. 192, n. 10, p. 1479-1490, 2000.

GLUCKMAN, E.; BROXMEYER, H. E.; AUERBACH, A. D.; FRIEDMAN, H. S.; DOUGLAS, G. W.; DEVERGIE, A. et al. Hematopoietic Reconstitution in A Patient with Fanconis Anemia by Means of Umbilical-Cord Blood from An Hla-Identical Sibling. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, n. 17, p. 1174-1178, 1989.

GRANT, M. B.; MAY, W. S.; CABALLERO, S.; BROWN, G. A.; GUTHRIE, S. M.; MAMES, R. N. et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. **Nat.Med.**, v. 8, n. 6, p. 607-612, 2002.

GRONTHOS, S.; GRAVES, S. E.; OHTA, S.; SIMMONS, P. J. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. **Blood**, v. 84, n. 12, p. 4164-4173, 1994.

HATTORI, N.; KAWAMOTO, H.; FUJIMOTO, S.; KUNO, K.; KATSURA, Y. Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus. **J.Exp.Med.**, v. 184, n. 3, p. 1137-1147, 1996.

HE, X.; GONZALEZ, V.; TSANG, A.; THOMPSON, J.; TSANG, T. C.; HARRIS, D. T. Differential gene expression profiling of CD34+ CD133+ umbilical cord blood hematopoietic stem progenitor cells. **Stem Cells Dev.**, v. 14, n. 2, p. 188-198, 2005.

HEALY, L.; MAY, G.; GALE, K.; GROSVELD, F.; GREAVES, M.; ENVER, T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 92, n. 26, p. 12240-12244, 1995.

HENDRIKS, R. W.; NAWIJN, M. C.; ENGEL, J. D.; VAN, D. H.; GROSVELD, F.; KARIS, A. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. **Eur.J.Immunol.**, v. 29, n. 6, p. 1912-1918, 1999.

HIRAI, H.; SAMOKHVALOV, I. M.; FUJIMOTO, T.; NISHIKAWA, S.; IMANISHI, J.; NISHIKAWA, S. Involvement of Runx1 in the down-regulation of fetal liver kinase-1 expression during transition of endothelial cells to hematopoietic cells. **Blood**, v. 106, n. 6, p. 1948-1955, 2005.

HO, I. C. ; PAI, S. Y. GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. **Cell Mol.Immunol.**, v. 4, n. 1, p. 15-29, 2007.

JAATINEN, T.; HEMMORANTA, H.; HAUTANIEMI, S.; NIEMI, J.; NICORICI, D.; LAINE, J. et al. Global gene expression profile of human cord blood-derived CD133+ cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 3, p. 631-641, 2006.

JAFFREDO, T.; BOLLEROT, K.; SUGIYAMA, D.; GAUTIER, R.; DREVON, C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. **Int.J.Dev.Biol.**, v. 49, n. 2-3, p. 269-277, 2005.

KALLIANPUR, A. R.; JORDAN, J. E.; BRANDT, S. J. The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. **Blood**, v. 83, n. 5, p. 1200-1208, 1994

KAWAGOE, H.; HUMPHRIES, R. K.; BLAIR, A.; SUTHERLAND, H. J.; HOGGE, D. E. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. **Leukemia**, v. 13, n. 5, p. 687-698, 1999. yogenesis. **Blood**, v. 83, n. 5, p. 1200-1208, 1994.

KISHIKAWA, H.; SUN, J.; CHOI, A.; MIAW, S. C.; HO, I. C. The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3. **J.Immunol.**, v. 167, n. 8, p. 4414-4420, 2001.

KRAUSE, D. S.; FACKLER, M. J.; CIVIN, C. I.; MAY, W. S. CD34: structure, biology, and clinical utility. **Blood**, v. 87, n. 1, p. 1-13, 1996.

KUBO, M. Notch: filling a hole in T helper 2 cell differentiation. **Immunity.**, v. 27, n. 1, p. 3-5, 2007.

KUMANO, K.; CHIBA, S.; KUNISATO, A.; SATA, M.; SAITO, T.; NAKAGAMI YAMAGUCHI, E. et al. Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. **Immunity**, v. 18, n. 5, p. 699-711, 2003.

KURITA, R.; SASAKI, E.; YOKOO, T.; HIROYAMA, T.; TAKASUGI, K.; IMOTO, H. et al. Tal1/Scl gene transduction using a lentiviral vector stimulates highly efficient hematopoietic cell differentiation from common marmoset (*Callithrix jacchus*) embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 9, p. 2014-2022, 2006.

KYBA, M.; PERLINGEIRO, R. C.; DALEY, G. Q. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. **Cell**, v. 109, n. 1, p. 29-37, 2002.

IZON, D. J.; ROZENFELD, S.; FONG, S. T.; KOMUVES, L.; LARGMAN, C.; LAWRENCE, H. J. Loss of function of the homeobox gene Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. **Blood**, v. 92, n. 2, p. 383-393, 1998.

LABASTIE, M. C.; CATALA, M.; GREGOIRE, J. M.; PEULT, B. The GATA-3 gene is expressed during human kidney embryogenesis. **Kidney Int.**, v. 47, n. 6, p. 1597-1603, 1995.

LACAUD, G.; GORE, L.; KENNEDY, M.; KOUSKOFF, V.; KINGSLEY, P.; HOGAN, C. et al. Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro. **Blood**, v. 100, n. 2, p. 458-466, 2002.

LANDRY, J. R.; KINSTON, S.; KNEZEVIC, K.; DE BRUIJN, M. F.; WILSON, N.; NOTTINGHAM, W. T. et al. Runx genes are direct targets of Scl/Tal1 in the yolk sac and fetal liver. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 3005-3014, 2008.

LAVENU-BOMBLED, C.; TRAINOR, C. D.; MAKEH, I.; ROMEO, P. H.; MAX-AUDIT, I. Interleukin-13 gene expression is regulated by GATA-3 in T cells: role of a critical association of a GATA and two GATG motifs. **J.Biol.Chem.**, v. 277, n. 21, p. 18313-18321, 2002.

LAWRENCE, H. J.; CHRISTENSEN, J.; FONG, S.; HU, Y. L.; WEISSMAN, I.; SAUVAGEAU, G. et al. Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3988-3994, 2005.

LAWRENCE, H. J.; HELGASON, C. D.; SAUVAGEAU, G.; FONG, S.; IZON, D. J.; HUMPHRIES, R. K. et al. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 1922-1930, 1997.

MAYANI, H. ; LANSDORP, P. M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. **Stem Cells**, v. 16, n. 3, p. 153-165, 1998.

MORETTI, P.; SIMMONS, P.; THOMAS, P.; HAYLOCK, D.; RATHJEN, P.; VADAS, M. et al. Identification of homeobox genes expressed in human haemopoietic progenitor cells. **Gene**, v. 144, n. 2, p. 213-219, 1994.

MOWEN, K. A. ; GLIMCHER, L. H. Signaling pathways in Th2 development. **Immunol.Rev.**, v. 202, p. 203-222, 2004.

NAKAZAWA, M.; ISHII, H.; NAKAMURA, H.; YOSHINO, S. I.; FUKAMIZU, A.; NISHIOKA, K. et al. NFkappaB2 (p52) promoter activation via Notch signaling pathway in rheumatoid synoviocytes. **Int.J.Mol.Med.**, v. 7, n. 1, p. 31-35, 2001.

NORTH, T.; GU, T. L.; STACY, T.; WANG, Q.; HOWARD, L.; BINDER, M. et al. Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. **Development**, v. 126, n. 11, p. 2563-2575, 1999.

NOTTINGHAM, W. T.; JARRATT, A.; BURGESS, M.; SPECK, C. L.; CHENG, J. F.; PRABHAKAR, S. et al. Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4188-4197, 2007.

OKAMOTO, O. K.; CARVALHO, A. C.; MARTI, L. C.; VENCIO, R. Z.; MOREIRA-FILHO, C. A. Common molecular pathways involved in human CD133+/CD34+ progenitor cell expansion and cancer. **Cancer Cell Int.**, v. 7, p. 112007.

OKUDA, T.; VAN, D. J.; HIEBERT, S. W.; GROSVELD, G.; DOWNING, J. R. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. **Cell**, v. 84, n. 2, p. 321-330, 1996.

OOSTERWEGEL, M.; TIMMERMAN, J.; LEIDEN, J.; CLEVERS, H. Expression of GATA-3 during lymphocyte differentiation and mouse embryogenesis. **Dev.Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 1992.

OSWALD, F.; LIPTAY, S.; ADLER, G.;SCHMID, R. M. NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. **Mol.Cell Biol.**, v. 18, n. 4, p. 2077-2088, 1998.

PALIS, J.; YODER, M. C. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. **Exp.Hematol.**, v. 29, n. 8, p. 927-936, 2001.

PANDOLFI, P. P.; ROTH, M. E.; KARIS, A.; LEONARD, M. W.; DZIERZAK, E.; GROSVELD, F. G. et al. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. **Nat.Genet.**, v. 11, n. 1, p. 40-44, 1995.

PANEPUCCI, R. A.; CALADO, R. T.; ROCHA, V.; PROTO-SIQUEIRA, R.; SILVA, W. A., Jr.;ZAGO, M. A. Higher expression of transcription targets and components of the nuclear factor-kappaB pathway is a distinctive feature of umbilical cord blood CD34+ precursors. **Stem Cells**, v. 25, n. 1, p. 189-196, 2007.

PATTERSON, L. J.; GERING, M.; ECKFELDT, C. E.; GREEN, A. R.; VERFAILLIE, C. M.; EKKER, S. C. et al. The transcription factors Scl and Lmo2 act together during development of the hemangioblast in zebrafish. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2389-2398, 2007.

PEICHEV, M.; NAIYER, A. J.; PEREIRA, D.; ZHU, Z.; LANE, W. J.; WILLIAMS, M. et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Blood**, v. 95, n. 3, p. 952-958, 2000.

PINEAULT, N.; HELGASON, C. D.; LAWRENCE, H. J.;HUMPHRIES, R. K. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. **Exp.Hematol.**, v. 30, n. 1, p. 49-57, 2002.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p. e452001.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

POMYJE, J.; ZIVNY, J.; SEFC, L.; PLASILOVA, M.; PYTLIK, R.;NECAS, E. Expression of genes regulating angiogenesis in human circulating hematopoietic cord blood CD34+/CD133+ cells. **Eur.J.Haematol.**, v. 70, n. 3, p. 143-150, 2003.

PORCHER, C.; SWAT, W.; ROCKWELL, K.; FUJIWARA, Y.; ALT, F. W.; ORKIN, S. H. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. **Cell**, v. 86, n. 1, p. 47-57, 1996.

PYATT, D. W.; STILLMAN, W. S.; YANG, Y.; GROSS, S.; ZHENG, J. H.; IRONS, R. D. An essential role for NF-kappaB in human CD34(+) bone marrow cell survival. **Blood**, v. 93, n. 10, p. 3302-3308, 1999.

QUANDT, K.; FRECH, K.; KARAS, H.; WINGENDER, E.; WERNER, T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, n. 23, p. 4878-4884, 1995.

RAMDASS, B.; MALIEKAL, T. T.; LAKSHMI, S.; REHMAN, M.; REMA, P.; NAIR, P. et al. Coexpression of Notch1 and NF-kappaB signaling pathway components in human cervical cancer progression. **Gynecol.Oncol.**, v. 104, n. 2, p. 352-361, 2007.

REBEL, V. I.; MILLER, C. L.; EAVES, C. J.; LANSDORP, P. M. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. **Blood**, v. 87, n. 8, p. 3500-3507, 1996.

REYNAUD, D.; RAVET, E.; TITEUX, M.; MAZURIER, F.; RENIA, L.; DUBART-KUPPERSCHMITT, A. et al. SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2318-2328, 2005.

RIVOLTA, M. N. ; HOLLEY, M. C. GATA3 is downregulated during hair cell differentiation in the mouse cochlea. **J.Neurocytol.**, v. 27, n. 9, p. 637-647, 1998.

ROBB, L.; LYONS, I.; LI, R.; HARTLEY, L.; KONTGEN, F.; HARVEY, R. P. et al. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 92, n. 15, p. 7075-7079, 1995.

ROCHA, V.; SANZ, G.; GLUCKMAN, E. Umbilical cord blood transplantation. **Curr.Opin.Hematol.**, v. 11, n. 6, p. 375-385, 2004.

SAKAGUCHI, S.; ONO, M.; SETOGUCHI, R.; YAGI, H.; HORI, S.; FEHERVARI, Z. et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunol.Rev.**, v. 212, p. 8-27, 2006.



SAUVAGEAU, G.; LANSDORP, P. M.; EAVES, C. J.; HOGGE, D. E.; DRAGOWSKA, W. H.; REID, D. S. et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 91, n. 25, p. 12223-12227, 1994.

SAUVAGEAU, G.; THORSTEINSDOTTIR, U.; EAVES, C. J.; LAWRENCE, H. J.; LARGMAN, C.; LANSDORP, P. M. et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. **Genes Dev.**, v. 9, n. 14, p. 1753-1765, 1995.

SCHIEDLMEIER, B.; KLUMP, H.; WILL, E.; RMAN-KALCEK, G.; LI, Z.; WANG, Z. et al. High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. **Blood**, v. 101, n. 5, p. 1759-1768, 2003.

SCHIEDLMEIER, B.; SANTOS, A. C.; RIBEIRO, A.; MONCAUT, N.; LESINSKI, D.; AUER, H. et al. HOXB4's road map to stem cell expansion. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 104, n. 43, p. 16952-16957, 2007.

SHIN, H. M.; MINTER, L. M.; CHO, O. H.; GOTTIPATI, S.; FAUQ, A. H.; GOLDE, T. E. et al. Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention. **EMBO J.**, v. 25, n. 1, p. 129-138, 2006.

SHIVDASANI, R. A.; MAYER, E. L.; ORKIN, S. H. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. **Nature**, v. 373, n. 6513, p. 432-434, 1995.

SHMELKOV, S. V.; ST, C. R.; LYDEN, D.; RAFII, S. AC133/CD133/Prominin-1. **Int.J.Biochem.Cell Biol.**, v. 37, n. 4, p. 715-719, 2005.

SHOJAEI, F.; GALLACHER, L.; BHATIA, M. Differential gene expression of human stem progenitor cells derived from early stages of in utero human hematopoiesis. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2530-2540, 2004.

SIEBURG, H. B.; CHO, R. H.; DYKSTRA, B.; UCHIDA, N.; EAVES, C. J.; MULLER-SIEBURG, C. E. The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2311-2316, 2006.

STIER S., CHENG T., DOMBKOWSKI D., CARLESSO N., SCADDEN D.T. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. **Blood**, v. 99, n.7, p. 2369-2378, 2002.

SUTHERLAND, D. R. ; KEATING, A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. **J.Hematother.**, v. 1, n. 2, p. 115-129, 1992.

SPITS, H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 2, n. 10, p. 760-772, 2002.

SZABO, S. J.; SULLIVAN, B. M.; PENG, S. L.;GLIMCHER, L. H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 21, p. 713-758, 2003.

TERSTAPPEN, L. W.; HUANG, S.; SAFFORD, M.; LANSDORP, P. M.;LOKEN, M. R. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+. **Blood**, v. 77, n. 6, p. 1218-1227, 1991.

THOMAS, E. D.; LOCHTE, H. L.; CANNON, J. H.; SAHLER, O. D.;FERREBEE, J. W. Supralethal Whole Body Irradiation and Isologous Marrow Transplantation in Man. **J. Clin. Invest.**, v. 38, n. 10, p. 1709-1716, 1959.

THOMAS, E. D.; LOCHTE, H. L., Jr.; LU, W. C.;FERREBEE, J. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **N.Engl.J.Med.**, v. 257, n. 11, p. 491-496, 1957.

THORSTEINSDOTTIR, U.; MAMO, A.; KROON, E.; JEROME, L.; BIJL, J.; LAWRENCE, H. J. et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. **Blood**, v. 99, n. 1, p. 121-129, 2002.

TING, C. N.; OLSON, M. C.; BARTON, K. P.;LEIDEN, J. M. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. **Nature**, v. 384, n. 6608, p. 474-478, 1996.

TSUZUKI, S.; HONG, D.; GUPTA, R.; MATSUO, K.; SETO, M.;ENVER, T. Isoform-specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by AML1/RUNX1. **PLoS Med.**, v. 4, n. 5, p. e1722007.

TUSHER, V. G.; TIBSHIRANI, R.;CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 98, n. 9, p. 5116-5121, 2001.

VISVADER, J. E.; FUJIWARA, Y.;ORKIN, S. H. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. **Genes Dev.**, v. 12, n. 4, p. 473-479, 1998.

VOERMANS, C.; GERRITSEN, W. R.; VON DEM BORNE, A. E.; VAN DER SCHOOT, C. E. Increased migration of cord blood-derived CD34+ cells, as compared to bone marrow and mobilized peripheral blood CD34+ cells across uncoated or fibronectin-coated filters. **Exp.Hematol.**, v. 27, n. 12, p. 1806-1814, 1999.

WAGNER, J. E.; BROXMEYER, H. E.; COOPER, S. Umbilical cord and placental blood hematopoietic stem cells: collection, cryopreservation, and storage. **J.Hematother.**, v. 1, n. 2, p. 167-173, 1992.

WAGNER, W.; ANSORGE, A.; WIRKNER, U.; ECKSTEIN, V.; SCHWAGER, C.; BLAKE, J. et al. Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 675-686, 2004.

WANG, Q.; STACY, T.; BINDER, M.; MARIN-PADILLA, M.; SHARPE, A. H.; SPECK, N. A. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 93, n. 8, p. 3444-3449, 1996.

WANG, Z.; BANERJEE, S.; LI, Y.; RAHMAN, K. M.; ZHANG, Y.; SARKAR, F. H. Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells. **Cancer Res.**, v. 66, n. 5, p. 2778-2784, 2006.

WANG, Z.; ZHANG, Y.; BANERJEE, S.; LI, Y.; SARKAR, F. H. Inhibition of nuclear factor kappaB activity by genistein is mediated via Notch-1 signaling pathway in pancreatic cancer cells. **Int.J.Cancer**, v. 118, n. 8, p. 1930-1936, 2006.

WEAVER, C. T.; HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; GAVRIELI, M.; MURPHY, K. M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**, v. 24, n. 6, p. 677-688, 2006.

WEEKX, S. F.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; PLUM, J.; MOULIJN, A.; RODRIGUS, I.; LARDON, F. et al. CD34++ CD38- and CD34+ CD38+ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source. **Exp.Hematol.**, v. 26, n. 11, p. 1034-1042, 1998.

WEISS, M. J. ; ORKIN, S. H. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. **Exp.Hematol.**, v. 23, n. 2, p. 99-107, 1995.

WINGENDER, E.; CHEN, X.; FRICKE, E.; GEFFERS, R.; HEHL, R.; LIEBICH, I. et al. The TRANSFAC system on gene expression regulation. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 1, p. 281-283, 2001.

YAMASHITA, M.; UKAI-TADENUMA, M.; KIMURA, M.; OMORI, M.; INAMI, M.; TANIGUCHI, M. et al. Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus. **J.Biol.Chem.**, v. 277, n. 44, p. 42399-42408, 2002.

YIN, A. H.; MIRAGLIA, S.; ZANJANI, E. D.; MEIDA-PORADA, G.; OGAWA, M.; LEARY, A. G. et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 5002-5012, 1997.

ZHU, J.; GIANNOLA, D. M.; ZHANG, Y.; RIVERA, A. J.; EMERSON, S. G. NF-Y cooperates with USF1/2 to induce the hematopoietic expression of HOXB4. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2420-2427, 2003.

ZIEGLER, B. L.; VALTIERI, M.; PORADA, G. A.; DE, M. R.; MULLER, R.; MASELLA, B. et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. **Science**, v. 285, n. 5433, p. 1553-1558, 1999.

## **Apêndices**

**APÊNDICE A: Fatores de transcrição hiper-expressos nas células CD133+ quando comparadas às células CD34+**

gene	UniGene	Descrição	CD34+	CD133+	*Fold
LHX2	Hs.445265	LIM homeobox 2	0,03	0,10	3,84
KLF2	Hs.107740	Kruppel-like factor 2 (lung)	1,95	7,36	3,77
GATA3	Hs.524134	GATA binding protein 3	0,87	3,19	3,65
LZTS1	Hs.521432	leucine zipper, putative tumor suppressor 1	0,04	0,13	3,53
CTNNA2	Hs.167368	catenin (cadherin-associated protein), alpha 2	0,03	0,11	3,53
MXI1	Hs.501023	MAX interactor 1	0,34	1,20	3,48
SALL1	Hs.135787	sal-like 1 (Drosophila)	0,04	0,14	3,39
PRRX2	Hs.555950	paired related homeobox 2	0,05	0,16	3,17
E4F1	Hs.513268	E4F transcription factor 1	0,04	0,13	3,14
HSF1	Hs.530227	heat shock transcription factor 1	0,05	0,13	2,75
JUND	Hs.2780	jun D proto-oncogene	0,35	0,94	2,65
USF1	Hs.414880	upstream transcription factor 1	1,12	2,90	2,59
CBFA2T3	Hs.513811	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3	0,83	2,12	2,55
ZNF217	Hs.518805	zinc finger protein 217	0,63	1,60	2,54
HMGA1	Hs.518805	high mobility group AT-hook 1	0,40	1,02	2,53
ID4	Hs.519601	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	0,37	0,85	2,31
MEF2D	Hs.314327	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide D (myocyte enhancer factor 2D)	0,54	1,21	2,26
DLX2	Hs.419	distal-less homeo box 2	0,12	0,28	2,24
ZHX3	Hs.380133	zinc fingers and homeoboxes 3	0,37	0,79	2,13
JUP	Hs.514174	junction plakoglobin	15,99	33,80	2,11
TEAD1	Hs.546308	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	0,77	1,56	2,03
ZFP36	Hs.534052	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	36,46	73,67	2,02
FOXP1B	Hs.525266	forkhead box G1B	0,16	0,31	2,00
PAX5	Hs.126365	paired box gene 5 (B-cell lineage specific activator)	2,16	4,23	1,96
EP300	Hs.517517	E1A binding protein p300	3,19	5,92	1,86
MSRB	Hs.461420	methionine sulfoxide reductase B	7,75	14,31	1,85
ZNF148	Hs.380334	zinc finger protein 148 (pHZ-52)	0,62	1,12	1,81
TIEG2	Hs.12229	TGFB inducible early growth response 2	1,91	3,35	1,76
HOXB4	Hs.532669	homeo box B4	1,43	2,43	1,70
GLI3	Hs.199338	GLI-Kruppel family member GLI3	0,24	0,40	1,68
DDIT3	Hs.505777	DNA-damage inducible transcript 3	3,72	6,16	1,66
SALL2	Hs.416358	sal-like 2 (Drosophila)	0,53	0,86	1,62
SRF	Hs.520140	serum response factor	0,40	0,64	1,59
RUNX1	Hs.149261	runt-related transcription factor 1	2,31	3,64	1,58

		(acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene)			
HOXC6	Hs.820	homeo box C6	0,74	1,16	1,56
SNFT	Hs.62919	Jun dimerization protein p21SNFT	0,41	0,63	1,53
CSDA	Hs.221889	cold shock domain protein A	3,33	5,10	1,53
POU3F1	Hs.1837	POU domain, class 3, transcription factor 1	7,86	11,98	1,53
PRDM1	Hs.436023	PR domain containing 1, with ZNF domain	1,47	2,22	1,51
HOXA9	Hs.127428	homeo box A9	0,52	0,78	1,49
ATF6	Hs.492740	activating transcription factor 6	10,97	16,27	1,48
WBSCR14	Hs.520446	Williams Beuren syndrome chromosome region 14	2,33	3,40	1,46
PML	Hs.526464	promyelocytic leukemia	0,56	0,81	1,44
TAL1	Hs.73828	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	3,17	4,24	1,34
PAX6	Hs.591993	paired box gene 6 (aniridia, keratitis)	0,81	1,08	1,33
ZNF278	Hs.517557	zinc finger protein 278	1,40	1,85	1,32
PBX2	Hs.509545	pre-B-cell leukemia transcription factor 2	10,53	13,57	1,29

Os valores correspondem á média dos valores de expressão obtidos nos microarrays de cada tipo celular e estão ordenados em ordem decrescente de *Fold*.

\**Fold*=razão CD133+/CD34+.

**APÊNDICE B: P valores obtidos da análise estatística entre os diferentes grupos.**

	NOTCH1	RELB	NFKB2	GATA3	RUNX1	USF1	TAL1	HOXA9	HOXB4
<b>CD34+BM Vs CD133+BM</b>	p<0.0001	p=0.0103	p=0.0092	p<0.0001	p=0.024	p=0.0033	Ns	p=0.0004	p=0.0379
<b>CD34+BM Vs CD34+UCB</b>	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	Ns	p=0.0438	p=0.0004	p=0.0012
<b>CD34+BM Vs CD133+UCB</b>	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p=0.0003	p=0.0276	p<0.0001	p<0.0001
<b>CD133+BM Vs CD34+UCB</b>	Ns	p=0.0013	p=0.0076	Ns	p=0.0128	p=0.0108	Ns	Ns	Ns
<b>CD133+BM Vs CD133+UCB</b>	p=0.0024	p<0.0001	Ns	Ns	p=0.0423	Ns	p=0.0295	Ns	p=0.01
<b>CD34+UCB Vs CD133+UCB</b>	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	p=0.0012	Ns	p=0.0143	p=0.0133

Valores obtidos de teste não-paramétrico de Mann-Whitney com uma cauda.