

*Perfil imunofenotípico e cultura de células
CD34⁺ de sangue de cordão umbilical humano*

Patricia Pranke

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do
grau de Doutor em Ciências

Orientadora: Dra. Nance Beyer Nardi

Colaborador: Dr. Jan W. M. Visser

Porto Alegre
Fevereiro de 2002

Tese realizada no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no New York Blood Center (New York, EUA), com financiamento da FAPERGS, CNPq e CAPES.

“ Living in another culture is like seeing the world through a new pair of glasses”

AGRADECIMENTOS

A complementação de uma tese de doutorado demora aproximadamente 4 anos. Durante 4 anos muitas mudanças acontecem, várias pessoas conhecemos. Muitas pessoas passam por toda uma vida conosco. Outras, convivemos por um certo período de nossa vida. Muitas destas pessoas vêm para nos ensinar algo, ou ajudar em algum momento importante, seja com uma observação, um conselho ou uma crítica.

Agora, esta tese está finalizada. Obviamente que isso é fruto de trabalho árduo, dedicação e estudo. Mas é fruto, também, de pessoas importantes que percorreram este caminho comigo e que, de uma forma ou de outra, ajudaram a tornar o objetivo inicial em uma realização. Minha eterna gratidão a todas estas pessoas:

Dra. Nance Bayer Nardi, por sua orientação, apoio e confiança. Por seu exemplo como profissional séria e de caráter, por sua amizade e compreensão. Mas, principalmente, pelo ser humano que ela é. Como dizia uma aluna nossa: “ela é tudo aquilo que a gente quer ser quando crescer”.

Dr. Jan Visser, meu profundo reconhecimento pelos ensinamentos em citometria e por ter me dado a oportunidade de viver a experiência de pesquisar e aprender em seu laboratório. Por sua postura profissional acessível, exemplo como pesquisador e por sua contribuição para minha formação científica.

Dr Pablo Rubinstein, por ter aberto as portas do banco de sangue de cordão umbilical para mim, o que tornou possível o muito que aprendi em banco de cordão. Sua sabedoria, seu exemplo de integridade profissional e como pesquisador, onde o objetivo primordial de seu trabalho é o Paciente.

Dra. Carmelita Carrier, que foi a pessoa que tornou possível realizar o meu doutorado no New York Blood Center (NYBC). Por toda sua ajuda antes e durante minha estada em NY, mas acima de tudo, pelo exemplo de ser humano que ela é.

Dr Jan Hendrikx, meus sinceros agradecimentos por tudo o que ensinou-me em citometria e pelo desenvolvimento do Hendrikx & Pranke Plot program. Dra Gargi Debnath, por sua ajuda no desenvolvimento das culturas, Gabriel Alespeiti, que com sua paciência e simplicidade, ensinou-me, também, muito sobre citometria e a todos os colegas do Stem Cell Lab – NYBC.

Aos amigos do NYBC: Susana Albano, Jill Storry, Maria Rios, Wilson, Don Lee, Raymond, Linda, Manlio, Karine, pelos agradáveis momentos durante este doutorado. `A Ludy e a toda tão amigável equipe do laboratório de criopreservação do “Placental Blood Program-NYBC”. A todo o gentil grupo do HLA por estarem sempre dispostos a ajudar. Raquel, por sua sempre tão atenciosa colaboração. Eu tenho muitas pessoas para agradecer no New York Blood Center.

Letícia, Alessandra, Zeca, Marion, Ida, Lenice, Andrez, Zeni, Christiane, Renata e todos as ótimas pessoas que conheci e os amigos que fiz durante meu doutorado no Departamento de Genética e Biologia Molecular - UFRGS, que tornaram as tardes de aula e os dias de trabalho em laboratório, um lugar e um momento especial e muito agradável para aprender.

Elmo, além de realizar seu trabalho com competência e boa vontade, por sua amizade.

Minhas amigas deste minha infância, as quais têm compartilhado comigo todos os momentos importantes: Silvia e Andressa, minha afilhada (minha “meio irmã” e minha “meio filha” também), Carla (por toda a ajuda em resolver qualquer problema enquanto estive fora do Brasil, sem o qual não teria “sobrevivido” em NY) e Lisiane (minha “sempre presente amiga `a distância”).

Helena Romanowsky (minha parceira de todas as horas), Sandra Beck, Simone, Sandrine, Adonai e muitos outros amigos que eu gostaria de agradecer por sua sincera amizade, mas cujos nomes não estão aqui devido a uma limitação de espaço.

Meus amigos brasileiros nos USA: Valder Arruda, Eneida Mendonça, por sua camaradagem e apoio de todas as horas, bem como meus amigos de New Rochelle, Connecticut e Queens. Minha amiga canadense, Linda Bouchard (e seus “diamantes na neve”).

Meus amigos Alan, Richard, Steven, Steven, Lucia, Cathe, Linda e tantos outros amigos cujos nomes não caberiam nesta página: pelas tardes de domingo de “roller-blader” no Central Park e pelas noites de sábado de Karaokê em Manhattan, que fizeram da vida em New York, um momento tão especial. Como dizem: “os amigos são a família que escolhemos”.

Aos meus alunos da UFRGS e da PUC que sempre foram minha fonte de inspiração e onde o reconhecimento que tenho recebido pelo meu trabalho tem um valor imensurável.

Minha profunda gratidão `a minha família. Agradeço meus pais e minha avó (Cecília), in *memorian*: pelos ensinamentos que me deram durante sua efêmera existência em minha vida, mas que foram suficientes por estarem sempre vivos dentro de mim. Meus irmãos, sobrinhas e meus tios: Carlos e Nelson e suas famílias: por sempre apoiarem, encorajarem e acreditarem em mim.

A todas as mães e seus bebês, de Porto Alegre e de New York, que tornaram possível a realização deste doutorado.

`A Porto Alegre e o Rio Guaíba com o seu especial e mais lindo pôr-do-sol.

`A Manhattan, New York: por ter sido o meu novo “par de óculos” (I ♥ NY)

A Deus: pela vida!

ACKNOWLEDGEMENTS

The completion of a doctoral thesis takes approximately 4 years. In the space of 4 years many changes take place, we can meet many people. Some people may spend a lifetime with us. Others, we may share for a certain period of our lives. Many of these people come to teach us something, or help in some important moment; they may offer an observation, advice or helpful criticism.

Now, this thesis is finished. Obviously, this is the fruit of hard work, dedication and study. But, it is also the fruit of those important people that traveled the road with me and that, in one way or another, helped turn the initial objective into reality. I would like to express my eternal gratitude to these people:

Dr. Nance Bayer Nardi, for her guidance, support and trust. As well as for her serious professional example, strength of character, friendship and understanding. But mainly for being the human being that she is. As one of our students often said: “she is everything that we want to be when we grow up.”

Dr. Jan Visser, my deepest gratitude for your teachings in relation to cytometry and for giving me the opportunity of studying and learning in your laboratory. For your accessible professional posture, example as researcher and contribution to my scientific formation.

Dr Pablo Rubisntein, for having opened the doors of the umbilical cord blood bank for me which allowed me to learn so much. His wisdom, example of professional integrity and as a researcher, where the primary consideration of his work is the Patient.

Dr. Carmelita Carrier, who it was that made it possible for to complete my doctorate at the New York Blood Center (NYBC). For all her help, before and during my stay in NY, but above all, for the example of a human being that she is.

Dr Jan Hendrikx, my sincere thanks for everything that he taught me about cytometry and the development of Hendrikx & Pranke Plot program. Dr. Gargi Debnath, for her help in developing the cultures, Gabriel Alespeiti, who, with patience and simplicity taught me so much about cytometry and to all the colleagues at the Stem Cell Lab – NYBC.

To my friends at the NYBC: Susana Albano, Jill Storry, Maria Rios, Wilson, Don Lee, Raymond, Linda, Manlio, Karine, for the pleasant moments of this doctorate. To Ludy and all the friendly team at the cryopreservation laboratory of Placental Blood Program from NYBC. To all the HLA group for kindly always being prepared to help. Raquel, for her attentive collaboration. I have so many people to thank at the New York Blood Center.

Letícia, Alessandra, Zeca, Marion, Ida, Lenice, Andrez, Zeni, Christiane, Renata and all the wonderful people I met and friends I made during my doctoral studies at the Departamento de Genética e Biologia Molecular - UFRGS (Department of Molecular Genetics and Biology – UFRGS), that made the evenings in the class and the days in the laboratory so special and enjoyable for me.

To Elmo, who, as well as performing his work with great competency and good will, offered his friendship.

My lifelong friends, who have shared all my important moments: Silvia and Andressa, my Goddaughter (my “soul sister” and my “soul daughter”), Carla (for all the times she sorted things out for while I have been out of Brazil and without whose help I would not have “survived” in NY) and Lisiane (my ever-present long distance friend).

Helena Romanowsky (my ever-present partner), Sandra Beck, Simone, Sandrine, Adonai and so many other friends. I would like to express my eternal thanks to all those people who offered me their kind sincere friendship, but whose names are not here due to the limitations of space.

My Brazilian friends in the USA: Valder Arruda, Eneida Mendonça, for their camaraderie and permanent support, as well as my friends from New Rochelle, Connecticut and Queens. My Canadian friend Linda Bouchard (and her “diamonds in the snow”).

My friends Alan, Richard, Steven, Steven, Lucia, Cathe, Linda and so many other friends whose names do not fit on this page: for the Sunday afternoons roller-blading in Central Park and the Saturday Karaoke nights in Manhattan, that made my time in New York so special. As they say, “your friends are the family you chose”.

To my students at UFRGS and PUC that have been a permanent source of inspiration and by whom the recognition that I have received for my work is so highly valued.

I want to express the deepest gratitude to my family. I am grateful to my parents and my grandmother (Cecília), in *memoriam*: for all they taught me during their ephemeral, though highly meaningful passage through my life, they will remain with me forever. My siblings, my nieces and my uncles: Carlos and Nelson and their families for supporting encouraging and believing in me.

To all the mothers and their babies in Porto Alegre and New York, who made this doctorate possible.

To Porto Alegre and the River Guaíba: with its special and most beautiful sunset.

To Manhattan, New York: for having been my “new pair of glasses” (I ♥ NY!)

To God: for life!

SUMÁRIO

Introdução	10
A célula tronco hematopoética.....	10
O sangue de cordão umbilical humano como fonte de células tronco hematopoéticas	11
Perfil hematológico do sangue de cordão umbilical	14
Moléculas de adesão e outros antígenos expressos em células tronco e progenitoras hematopoéticas	15
Fatores de crescimento hematopoéticos	18
Sistemas de cultura	19
Objetivos	20
Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood	21
Culture and immunophenotype of CD34⁺ cells from placental/umbilical cord blood	29
Discussão	70
Resumo e conclusões	82
Summary and conclusions.....	84
Referências bibliográficas	86

ABREVIATURAS UTILIZADAS

CSF - fatores estimulantes de colônias (*colony-stimulating factors*)

ECM - moléculas da matriz extracelular (*extracellular matrix*)

EPO - eritropoetina

FCH - fator de crescimento hematopoético

GVHD - doença do enxerto contra o hospedeiro (*graft versus host disease*)

HUCB - sangue de cordão umbilical humano (*human umbilical cord blood*)

IL - interleucina

MNC - células mononucleares (*mononuclear cells*)

MO - medula óssea

SCF - *steel factor* ou *stem cell factor*

SCFR - *stem cell factor receptor*

TCN - número total de células nucleadas (*total cell number*)

TMO - transplante de medula óssea

TNF - fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

TPO - trombopoetina

INTRODUÇÃO

A hematopoese é um fascinante sistema no qual células tronco proliferam e diferenciam-se em células altamente especializadas (Lee & Dang, 2000). A medula óssea (MO), um dos maiores órgãos do corpo humano, é o principal sítio de formação das células sanguíneas do adulto. Em um indivíduo adulto normal, a MO produz, por dia, ao redor de 6 bilhões de células por quilograma de peso corporal: 2,5 bilhões de eritrócitos, 2,5 bilhões de plaquetas e 1,0 bilhão de granulócitos, por quilograma de peso, são produzidos diariamente (Abboud & Lichtman, 2001). Uma única célula tronco hematopóética é capaz de mais de 50 divisões durante a vida celular e tem a capacidade de gerar mais de 10^{15} células hematopóéticas durante 60 anos. A proliferação e diferenciação celular são controladas por um grupo de proteínas chamadas fatores de crescimento hematopóéticos (FCHs). Se nós pudermos replicar esta amplificação celular *in vitro* com FCHs, poderia ser possível gerar um grande número de células para utilização em uma variedade de aplicações clínicas (McNiece & Briddell, 2001). Além dos fatores de crescimento hematopóéticos, a auto-renovação, proliferação, diferenciação, *homing* e mobilização dos progenitores hematopóéticos são regulados por um complexo mecanismo que envolve o microambiente da medula óssea. As moléculas de adesão, expressas nos progenitores hematopóéticos, exercem um importante papel nestes processos. A expressão destas moléculas tem atraído especial atenção nos estudos com sangue de cordão umbilical.

A célula tronco hematopóética

A célula tronco hematopóética é definida como uma célula com grande capacidade de auto-renovação e proliferação. Possui também a capacidade de diferenciar-se em progenitores hematopóéticos de todas as linhagens celulares. A auto-renovação refere-se ao potencial de produzir células-filhas com características idênticas. Certas proteínas estão presentes nas classes primitivas da células tronco (Quesenberry & Colvin, 2001). A glicoproteína CD34 é expressa nas células tronco hematopóéticas primitivas, nas células progenitoras (Jin *et al.*,

2000), bem como em células endoteliais (Verfaillie, 2000). As células tronco hematopoéticas co-expressam c-kit, FLT3 e Thy 1. Outra característica das células tronco pmitivas inclui a não expressão de HLA-DR, CD38 e de marcadores de linhagem específica (Bühning, 1998; Williams, 2000; Quesenberry & Colvin, 2001). A expressão da molécula CD38 identifica uma célula CD34⁺ já comprometida, enquanto que o fenótipo CD34⁺CD38⁻ identifica uma subpopulação de células tronco hematopoéticas mais primitivas (Malangone *et al.*, 2001). A célula tronco hematopoética parece ser quiescente, em estágio G₀ ou em prolongado G₁ (Morrison *et al.*, 1997).

Embora o antígeno CD34 seja a molécula indicadora clássica de célula tronco hematopoética, há evidências de que os progenitores de uma população de células tronco ainda não comprometida não expressam este marcador. Dependendo do estágio de diferenciação, a célula tronco CD34⁻ pode gerar não apenas progenitores hematopoéticos, mas também precursores mesenquimais mais específicos, tais como osteoclastos, condrócitos, miócitos, adipócitos e outros. Estudos recentes têm demonstrado a surpreendente plasticidade da população de célula tronco primitiva, constituindo-se de células com função de célula estromal, bem como progenitores hematopoéticos e mesenquimais (Huss, 2000).

As células tronco hematopoéticas têm sido usadas em transplantes no tratamento de inúmeras doenças, hematológicas ou não. As principais fontes de células hematopoéticas utilizadas em transplantes são a medula óssea, o sangue periférico, após mobilização dos precursores hematopoéticos através do uso de citocinas e, mais recentemente, o sangue de cordão umbilical humano (Yamaguchi *et al.*, 2001).

O sangue de cordão umbilical humano como fonte de células tronco hematopoéticas

O sangue de cordão umbilical humano (HUCB, *human umbilical cord blood*) é rico em progenitores hematopoéticos e tem sido usado para o tratamento de doenças hematológicas malignas ou não-malignas (Malangone *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2001), bem como em tumores sólidos (Yamaguchi *et al.*, 2001).

O primeiro relato de uso de células de HUCB em transplante foi em 1988. Gluckman *et al.* (1989) utilizaram o sangue de cordão umbilical da irmã de um paciente com anemia de Fanconi para realizar o transplante. Após este, diversos pacientes foram beneficiados com o uso deste órgão como fonte de células progenitoras hematopoéticas. Nos últimos 10 anos, o sangue de cordão umbilical tem sido clinicamente investigado como uma fonte alternativa de transplante alogênico em pacientes que não apresentam doadores HLA-compatíveis (McNiece & Briddell, 2001), uma vez que estas células parecem induzir com menor frequência a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD, *graft versus host disease*) (Bühring, 1998). O sucesso do uso destas células em transplantes culminou com a necessidade de armazenamento do sangue de cordão umbilical. Desta forma, o primeiro banco de cordão umbilical humano foi estabelecido em 1993 pelo Dr. Pablo Rubinstein no *New York Blood Center* (Rubinstein *et al.*, 1995). Este procedimento encorajou o estabelecimento de outros bancos de cordão umbilical humano em diversas partes do mundo e o número de transplantes, utilizando células do sangue de cordão, aumentou surpreendentemente desde 1997 (McNiece *et al.*, 2000).

Embora o transplante de medula óssea (TMO) esteja sendo usado com sucesso há vários anos para tratar pacientes com doenças hematológicas, sua maior limitação é a disponibilidade de doador. O Programa Nacional de Doador de Medula dos Estados Unidos, por exemplo, tem identificado 2 milhões de doadores em potencial e tem facilitado desde dezembro de 1995, aproximadamente 4.000 TMO a partir de doadores não-relacionados. Contudo, a disponibilidade de doadores de MO não-relacionados é ainda limitada devido a inúmeros fatores: 1) o tempo gasto no processo de procura de doador pode variar de 1 mês a 6 anos; 2) a disponibilidade do doador no momento em que é solicitado e 3) a limitada disponibilidade de doadores em uma dada população étnica ou grupo racial. Devido a estes fatores, menos de 40% dos pacientes que poderiam ser beneficiados por um TMO têm identificado um doador adequado e, destes que têm um doador identificado, menos que 40% recebem o transplante (McNiece & Briddell, 2001).

Muitas são as vantagens do uso de HUCB como fonte de células tronco hematopoéticas sobre a medula óssea ou sangue periférico: 1) a ilimitada oferta de sangue de cordão, uma vez que o mesmo é descartado após o parto; 2) a disponibilidade imediata do mesmo uma vez que as células encontram-se prontas para o uso, armazenadas nos bancos de

cordão umbilical humano e 3) a menor incidência de GVHD (Bühring, 1998; McNiece *et al.*, 2000; McNiece & Briddell, 2001), uma vez que estas células são mais “imaturas” imunologicamente. Devido ao volume de sangue de cordão umbilical ser um fator limitante, as células tronco de sangue de cordão são suficientes para reconstituir a MO de crianças, mas geralmente não a reconstitui em adultos. Sendo assim, a grande maioria dos pacientes beneficiados por esta fonte de células tronco, tem sido crianças com um peso médio de 20 kg (McNiece *et al.*, 2000; McNiece & Briddell, 2001).

A quantidade de células nucleadas dos produtos derivados de sangue de cordão é um fator crucial para a “pega” do enxerto e, portanto, a sobrevivência do paciente e sucesso do transplante. Recomenda-se que somente unidades de sangue de cordão onde a dose de células nucleadas seja maior ou igual a $3,7 \times 10^7/\text{kg}$ sejam usadas em transplantes (Gluckman *et al.*, 1997). O número absoluto de células CD45^+ , marcador leucocitário, no sangue de cordão, de acordo com Campagnoli *et al.* (2000), é de $11,9 \pm 1,3 \times 10^6/\text{mL}$.

Se, por um lado, há grandes evidências de que a “verdadeira” célula tronco hematopoética apresenta o fenótipo $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$, por outro lado o número destas células é baixo e difícil de determinar, encontrando-se divergências na literatura. Segundo Bühring (1998), aproximadamente 1% das células da medula óssea expressam o antígeno CD34 e geralmente menos que 1% destas são CD38-negativas. De acordo com Kipps (2001), 1 a 4% das células da medula óssea, incluindo células tronco hematopoéticas e células endoteliais, são CD34^+ . No sangue de cordão estes números parecem ser diferentes. De acordo com Campagnoli *et al.* (2000), a concentração de células CD34^+ em amostras de sangue de cordão umbilical em crianças nascidas a termo é de $5,6 \pm 3,9 \times 10^4/\text{mL}$ e, entre estas, $3,9 \pm 0,9\%$ são negativas para CD38. Em estudo realizado por Hao *et al.* (1995), a frequência encontrada de células CD34^+ em sangue de cordão foi $0,36 \pm 0,33\%$ do total das células mononucleares (intervalo: 0,02% a 1,43%), com um total de $0,05\% \pm 0,08\%$ de células $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$. Logo, se entre as células mononucleares, ao redor de 0,36% são CD34^+ e cerca de 0,05% são $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$, podemos concluir que, de acordo com os estudos de Hao *et al.*, 13,9% das células CD34^+ seriam CD38^- , diferente dos $3,9 \pm 0,9\%$ apresentado por Campagnoli *et al.* (2000). Estes dados mostram a dificuldade em determinar estes números e a grande controvérsia encontrada na literatura.

Perfil hematológico do sangue de cordão umbilical

Os valores de referência relacionados à contagem completa em sangue de recém-nascido ou de cordão umbilical datavam de 1982 e a maioria destes dados foram baseados em parâmetros medidos manualmente. Uma vez que os contadores automáticos utilizados em hematologia foram principalmente desenvolvidos para as contagens sangüíneas em adultos, estes valores não são satisfatórios para amostras de sangue perinatal. Nos últimos anos, os contadores automáticos apresentaram um grande avanço tecnológico. Muitos são os trabalhos que se referem aos valores de referência para a população adulta, entretanto Walka *et al.* (1998) encontraram apenas um trabalho com os novos contadores automáticos utilizando a população neonatal e nenhum com sangue de cordão umbilical.

Walka *et al.* (1998) estudaram amostras de sangue de cordão umbilical de 123 indivíduos saudáveis e nascidos a termo e realizaram a completa contagem dos parâmetros hematológicos, comparativamente, utilizando 2 aparelhos de automação em hematologia: Cell-Dyn 3500 (Abbott) e H*3 (Bayer-Technicon). Os resultados encontrados foram: leucócitos: 14,2 (7,8-24,3) x 10⁹/L, plaquetas: 265 (174-363) x 10⁹/L, eritrócitos: 4,6 (3,9-5,5) x 10¹²/L, hemoglobina: 15,7 (12,5-18,2) g/dl, VCM (volume corpuscular médio): 106 (95-113) fl, HCM (hemoglobina corpuscular média): 33,8 (30,3-36,4) pg, reticulócitos: 149 (95-212) x 10⁹/L ou 3,3 (2,0-4,7)% e eritroblastos: 5 (0-24) por 100 leucócitos ou 0,53 (0,00-3,20) x 10⁹/L.

Os valores de referência para as subpopulações de linfócitos T em sangue de cordão foram analisados em citômetro de fluxo por Garcia *et al.* (1995). Os valores de referência encontrados foram: CD3: 45,5 a 91,3 %, CD4: 26,2 a 69,4 %, CD8: 16,2 a 24,1% e NK: 2,0 a 8,5 %.

Moléculas de adesão e outros antígenos expressos em células tronco e progenitoras hematopoéticas

As moléculas de adesão permitem a interação com vários elementos regulatórios presentes no microambiente, os quais incluem células do estroma, moléculas da matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) e fatores regulatórios solúveis, tais como as citocinas ou fatores de crescimento e diferenciação celular (Nardi & Costa, 1999).

As células tronco e progenitoras hematopoéticas, a maioria expressando o antígeno CD34, têm múltiplos receptores de adesão. Esses receptores permitem a ligação das células tronco ou progenitoras aos componentes da matriz extracelular dentro dos sinusóides medulares, facilitando, com isso, seu “homing” na medula óssea e promovendo um íntimo contato célula-célula necessário para a sobrevivência da célula e regulação da proliferação celular. Vários são os receptores de adesão e seus ligantes, presentes nas células tronco e progenitoras e componentes do microambiente hematopoético (Abboud & Lichtman, 2001).

Alguns dos subgrupos de receptores são: integrinas (como CD49e), moléculas da superfamília das imunoglobulinas (como CD31 e CD117), lectinas ou selectinas (como CD62L), sialomucinas (tal como CD34) hialaderina e outros receptores, entre eles CD38. Alguns entre os principais receptores envolvidos nas interações com as células CD34 positivas e progenitoras hematopoéticas (Abboud & Lichtman, 2001) são descritos a seguir.

CD11c

Nomes alternativos: cadeia alfaX integrina, antígeno de superfície leucocitária p150,95 (Nancy Hogg, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow)

Expressão celular: encontrada em monócitos, neutrófilos polimorfonucleares (Kipps, 2001), macrófagos, células NK, subpopulação de células T e B (Nancy Hogg, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow)

Função celular: Apresenta função semelhante ao CD11b. Está associado com CD18 para formar o complexo CD11c/CD18, podendo exercer papel como molécula de adesão que se liga a receptores sobre o endotélio estimulado (Nancy Hogg, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow)

CD31

Nomes alternativos: PECAM-1: *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (Abboud & Lichtman, 2001; Kipps, 2001; William A. Muller, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Expressão celular: presente em células mielóides, leucócitos e seus precursores, células endoteliais, células CD34⁺, monócitos, neutrófilos (Abboud & Lichtman, 2001; Kipps, 2001), plaquetas, células NK, subgrupos de células T, mas não sobre células B circulantes (William A. Muller, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Função celular: interage com a integrina $\alpha V/\beta 3$ e glicosaminoglicanos. A ligação de CD31 ativa integrinas de leucócitos (Kipps, 2001). A molécula participa da adesão entre células que expressam CD31, tais como célula endotelial-célula endotelial e leucócito-célula endotelial (William A. Muller, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

CD38

Nomes alternativos: T10, ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase (Fabio Malavasi & Enza Ferrero, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow)

Expressão celular: esta molécula é expressa em variáveis níveis pela maioria das células hematopoéticas, principalmente durante a diferenciação precoce e ativação celular (Fabio Malavasi & Enza Ferrero, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow). É expressa também em subgrupos de células CD34⁺, células T e B primitivas ou ativadas, plasmócitos e timócitos (Abboud & Lichtman, 2001), monócitos, células NK, e progenitores mielóides (Kipps, 2001), bem como em células do cérebro, músculo, rins e outros tecidos (Fabio Malavasi & Enza Ferrero, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Função celular: pode exercer um papel na ativação celular, proliferação ou sobrevivência celular (Kipps, 2001). Regula positiva e negativamente a ativação e proliferação celular, dependendo do microambiente celular. É envolvida ainda na adesão entre linfócitos humanos e células endoteliais (Fabio Malavasi & Enza Ferrero, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

CD49e

Nomes alternativos: cadeia alfa da VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$ -VLA-5) (Abboud & Lichtman, 2001; Kipps, 2001), cadeia alfa-5 de integrinas, cadeia alfa FNR (www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Expressão celular: encontrada em tímócitos, células T, monócitos, plaquetas ativadas e células B primitiva (Kipps, 2001) e em células CD34⁺ (Abboud & Lichtman, 2001).

Função celular: une-se a CD29 para formar um receptor para a fibronectina (Kipps, 2001).

CD61

Nomes alternativos: CD61A, GPIIb/IIIa, cadeia beta 3 de integrinas, integrina beta-3, beta 3 (www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Expressão celular: presente em plaquetas, megacariócitos, monócitos, macrófagos e células endoteliais. (Kipps, 2001).

Função celular: associa-se com CD41 para formar o heterodímero GPIIIa-IIIa que facilita a agregação plaquetária. (Kipps, 2001).

CD62L

Nomes alternativos: L-selectina, LAM-1 (*leukocyte adhesion molecule-1*), LECAM-1, Leu-8 (Abboud & Lichtman, 2001; Kipps, 2001; Greenberg *et al.*, 2000; McEver, 2000; Kiyoshi Goda, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Expressão celular: encontrada em estroma e células CD34⁺ (Abboud & Lichtman, 2001).

Presente em células B, células T, monócitos, neutrófilos polimorfo nucleares, tímócitos, eosinófilos, basófilos, progenitores eritróides e mielóides e células NK (Kipps, 2001; Kiyoshi Goda, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow). A molécula é ainda presente em alguns linfócitos do baço e da medula óssea e em células mielóides da medula, bem como em certas células malignas hematopoéticas (Kiyoshi Goda, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Função celular: a molécula está envolvida na redistribuição e *homing* das células hematopoéticas (Dercksen *et al.*, 1995). Participa do *homing* dos linfócitos e facilita a ligação celular ao endotélio junto aos sítios inflamatórios (Kipps, 2001).

CD117

Nomes alternativos: c-kit, receptor de fator de crescimento de célula tronco (SCFR: *stem cell factor receptor*) (Kipps, 2001; Leonie K. Ashman, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Expressão celular: é expressa em células tronco e progenitoras hematopoéticas (Abboud & Lichtman, 2001; Kipps, 2001; Leonie K. Ashman, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow), mastócitos,

melanócitos, espermatogônia, oócitos e algumas células NK (Kipps, 2001; Leonie K. Ashman, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow). Presente, também, nas células do cérebro embrionário e nas células da leucemia mielóide aguda (Leonie K. Ashman, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Função celular: receptor de fator de crescimento de célula tronco (SCFR, *stem cell factor receptor*), c-kit. Induz sua atividade tirosina quinase, conduzindo para a proliferação e/ou diferenciação celular (Kipps, 2001; Leonie K. Ashman, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

HLA-DR

Molécula de HLA - Classe II

Expressão celular: expressa em diversos tipos celulares como em monócitos, macrófagos e linfócitos.

Função celular: apresentação de antígenos exógenos a linfócitos Th (CD4).

Fatores de crescimento hematopoéticos

Fatores de crescimento hematopoéticos são fatores solúveis que influenciam o crescimento ou diferenciação das células progenitoras hematopoéticas. Esses fatores podem agir direta ou indiretamente sobre as células, ligando-se aos receptores celulares (Bagby & Heinrich, 2000). A interação destes fatores e seus receptores nas membranas celulares é um importante mecanismo de regulação da sobrevivência, proliferação e diferenciação das células hematopoéticas (Xiao *et al.*, 1999).

Inúmeros são os fatores que regulam a hematopoese. Os fatores de crescimento hematopoéticos podem ser os chamados CSFs (*colony-stimulating factors* - fatores estimulantes de colônias, tais como GM-CSF, G-CSF, M-CSF), SF ou SCF (*steel factor* ou *stem cell factor* ou também chamado *kit ligand*), EPO (eritropoetina), TPO (trombopoetina), TNF (fator de necrose tumoral, *tumor necrosis factor*), FLT-3 *ligand*, interleucinas (IL-1 a IL-18) e outros (Bagby & Heinrich, 2000; Quesenberry & Colvin, 2001). A função de alguns destes fatores sobre as células hematopoéticas é descrita a seguir.

SCF, SF, Kit ligand (KL) ou mast cell growth factor: estimula a sobrevivência e crescimento de células tronco primitivas em sinergismo com muitos fatores (Broudy, 1997; Quesenberry & Colvin, 2001).

FLT-3 ligand ou FL: co-estimula as células tronco multipotentes, especialmente com trombopoetina e kit-ligand. Estimula geração de células dendríticas e induz regressão de tumores *in vivo* (Quesenberry & Colvin, 2001).

TPO: maior regulador da proliferação e diferenciação de megacariócitos. Co-estimula as células tronco multipotentes em combinação com *kit ligand* e IL-11 e promove a eritropoese em sinergismo com eritropoetina (Quesenberry & Colvin, 2001).

Sistemas de cultura

As células do sangue de cordão umbilical parecem ser mais interessantes que as células tronco da MO por serem mais “imaturas” imunologicamente e, portanto, “melhores células tronco”, por apresentarem uma menor frequência de GVHD após o transplante e, aparentemente, serem mais suscetíveis à transfecção gênica (Bühring, 1998). No entanto, como já citado, o maior problema é que o número de células tronco hematopoéticas no sangue de cordão umbilical é limitado (Yamaguchi *et al.*, 2001). Se, por um lado, as células tronco do sangue de cordão umbilical são “melhores” que as células da MO e são suficientes para reconstituir a medula de crianças, as mesmas células não promovem o enxertamento em adultos, necessitando manipulação *ex vivo* (Piacibello *et al.*, 1997).

Vários sistemas de cultura foram desenvolvidos na tentativa de expandir a “verdadeira” célula tronco hematopoética (Koller *et al.*, 1992; Shah *et al.*, 1996; Piacibello *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1997; Matsunaga *et al.*, 1998; Schipper *et al.*, 1998). Diferentes concentrações e combinações de fatores de crescimento estão sendo testadas. Piacibello *et al.* (1997) estudaram o efeito de FL, TPO, KL e IL-3, sozinhos ou combinados, para sustentar os diferentes estágios da hematopoeese em sistemas de cultura de longo termo (LTC - *long term culture*) livre de estroma usando células de sangue de cordão umbilical. A expansão de células tronco humanas através de cultura *ex vivo* provavelmente terá importantes aplicações clínicas em transplante e terapia gênica (Piacibello *et al.*, 1999).

Objetivos

Buscando contribuir para o conhecimento da biologia da célula tronco hematopoética presente no sangue de cordão umbilical humano e sua manipulação *ex vivo*, o presente estudo teve como objetivos:

- determinar, por automação, os parâmetros hematológicos do sangue de cordão umbilical humano;
- verificar o perfil imunofenotípico de monócitos, linfócitos e células CD34⁺ de sangue de cordão com relação a marcadores representantes das principais famílias de moléculas de adesão e a outras proteínas importantes da célula tronco;
- analisar o crescimento das células CD34⁺, purificadas do sangue de cordão, durante o cultivo *in vitro* com diferentes combinações de fatores de crescimento hematopoéticos, buscando estabelecer condições mais propícias à expansão desta população e da população de células CD34⁺CD38⁻;
- estudar a expressão das moléculas de adesão e outras moléculas de superfície após o cultivo com fatores de crescimento hematopoéticos.

*Hematologic and immunophenotypic
characterization of human umbilical cord blood*

Patrícia Pranke^a, Renato R. Failace^b, Waldir F. Allebrandt^c, Gustavo Steibel^d, Francisco Schmidt^a, Nance Beyer Nardi^a

^aDepartamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ^bLaboratório Faillace, ^cHospital Nossa Senhora da Conceição, and ^dHospital São Lucas PUCRS, Porto Alegre, Brazil

Acta Haematologica 2001; 105: 71-76.

*Culture and immunophenotype of CD34⁺ cells
from placental/umbilical cord blood*

Patricia Pranke^{1,2}, Jan Hendrikx², Gargi Debnath², Gabriel Alespeiti², Pablo Rubinstein³, Nance Nardi⁴ and Jan Visser².

1. Fac Farmacia, UFRGS and PUC-RS, Porto Alegre, Brazil.
2. Stem Cell Biology, New York Blood Center, New York, NY, 10021, USA
3. Immunogenetics, New York Blood Center, New York, NY, 10021, USA
4. Dep Genetica, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

SUMMARY

Assaying human hemopoietic stem cells remains problematic, since in vitro and in vivo stem cell assays give different outcomes particularly after culture. We tested if altered expression of adhesion molecules during stem cell expansion could be a reason for this. CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺ cells from umbilical cord blood were analyzed before and after culture with three different combinations of the growth factors thrombopoietin (TPO), FLT-3 ligand (FL,) and kit ligand (KL): TPO+FL+KL, TPO+FL and TPO alone. We examined their immunophenotype by four-color fluorescence using antibodies against CD11c, CD31, CD49e, CD61, CD62L and CD117 as well as HLA-DR. Low-density cord blood presented 1.4% CD34⁺ cells, 2.6±2.1% of which were CD38⁻. CD34⁺ cells were isolated with magnetic beads and cultured for up to 7 days. The total cell number increased 4.3±1.8 fold after culture with TPO+FL+KL, but the number of viable CD34⁺ cells decreased by 46±25%. On the other hand, the fraction of CD34⁺CD38⁻ cells became 52.0±29% of all CD34⁺ cells. In cultures with TPO+FL and TPO alone the fraction of CD34⁺CD38⁻ cells was only 9.1±8.6 % and 2.5±2.4%, respectively. In conclusion, the CD34⁺CD38⁻ cell compartment was expanded on average 15±12 fold when CD34⁺ cells were cultured with TPO+FL+KL for 7 days. The expression of the cell adhesion molecules CD11c, CD31, CD49e, CD61 on CD34⁺CD38⁻ cells did not change significantly during culture (7 day TPO+FL+KL). CD11c and CD61 expression was always low, whereas most of the cells were CD49e⁺⁺ and CD31⁺⁺⁺ before and after culture. Fresh cord blood samples were heterogeneous with respect to their labeling with CD62L. Around 43±17% and 27±17% of CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻, respectively, showed intermediate fluorescence for CD62L. The number of CD62L⁺ cells and their fluorescence intensity increased significantly during culture, particularly with TPO+FL+KL, indicating that their L-selectin dependent adhesion changed with implications for their homing and engraftment. Heterogeneous numbers of cells were positive for HLA-DR in fresh cord blood with intermediate fluorescence. When CD34⁺ cells were cultured with TPO+FL+KL the number of positive cells and the intensity of the fluorescence increased up to the fourth day in culture, but decreased somewhat from day 4 to day 7.

Heterogeneous results were observed for CD34⁺ cells (0.4–4.9% among mononuclear cells), as well as for CD34⁺CD38⁻, CD62L and HLA-DR cells. This variation can be explained by an intrinsic heterogeneity of the cord blood CD34⁺ population. On the other hand, several studies have suggested that variables such as gestational age, mode of delivery, duration of delivery stress, cesarean sections and volume collected determine this variation. The expression of c-kit in fresh CD34⁺CD38⁺ cells showed two populations in all samples: 80±10% of the cells with intermediate fluorescence, and the remaining cells bright or very bright. Among the CD34⁺CD38⁻ cells 56±24% presented regular fluorescence, and bright cells were not observed.

When cultured with TPO+FL+KL, the number of the c-kit positive cells decreased among CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells and the bright cells disappeared. Although the population with the phenotype CD34⁺CD38⁻kit⁻ has been shown to contain the most primitive stem cells, the presence of KL in the culture medium was essential to expand CD34⁺CD38⁻ cells. This suggests that these stem cells are c-kit⁺, and that the downregulation of c-kit is probably due to the presence of KL in the growth factor combination. In conclusion, culture of CD34⁺ cells in the presence of TPO+FL+KL results in a significant increase in the number of candidate stem cells with the CD34⁺CD38⁻ phenotype. However, some of their homing and engraftment properties are affected by the culture as the expression of L-selectin, HLA-DR and c-kit are modulated.

INTRODUCTION

Hematopoietic tissues contain a small population of primitive and totipotent stem cells (SCs). These cells are defined by their ability of self-renewal as well as to differentiate into all of the blood cell lineages, generating committed progenitors of the different myeloid and lymphoid compartments (Piacibello *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2000). The complexity of this system is enormous, since as many as $1-5 \times 10^9$ erythrocytes and $1-5 \times 10^9$ white blood cells are produced each hour each day during the lifetime of the individual (Williams, 2000). Over the past 10 years, umbilical cord blood (HUCB) has been clinically investigated as an alternative source of hematopoietic tissue for allogeneic transplantation of patients lacking a human leukocyte antigen-matched marrow donor (McNiece *et al.*, 2000). It is an attractive alternative source of hematopoietic stem cells to bone marrow (BM) or mobilized peripheral blood (MPB) and is being used increasingly to restore the formation of blood cells not only in patients with hematologic disorders and malignancies but also those with solid tumors. One problem, however, is that the number of hematopoietic stem cells in HUCB samples often is limited (Yamaguchi *et al.*, 2001). Identification of conditions that support the self-renewal and expansion of human hematopoietic stem cells remains a major goal of experimental and clinical hematology (Conneally *et al.*, 1997). The expansion of human stem cells *ex vivo* culture will likely have important applications in transplantation, stem cell marking, and gene therapy (Piacibello *et al.*, 1999; Ramsfjell *et al.*, 1999; Dorrell *et al.*, 2000).

The CD34⁺ protein is a surface glycoprotein expressed on developmentally early hematopoietic SCs and progenitor cells in HUCB, bone marrow (BM) (Jin *et al.*, 2000) as well as endothelial cells (Verfaillie, 2000). The most primitive human hematopoietic progenitor cells have been shown to express CD34, little or no CD38 and to be negative for lineage markers (Ramsfjell *et al.*, 1997; Bühring, 1998). The CD34⁺CD38⁻ immunophenotype defines a primitive subpopulation of progenitor cells in fetal liver, fetal BM, and adult BM (Hao *et al.*, 1995; Malangone *et al.*, 2001). About 1% of bone marrow cells express CD34, and generally less than 1% of these cells are CD38-negative. Hence, the frequency of this population is about 1 in 10,000, or even lower. Phenotypic analysis of several cell surface markers reveals that even this rare population is highly heterogeneous,

and transplantation studies in NOD-SCID immunodeficient mice have shown that only about 1 in 30 of these cells are functional stem cells (Bühring, 1998).

Ex vivo culture is a crucial component of several clinical applications currently in development including gene therapy, and stem/progenitor cell expansion (Bhatia et al, 1997). By a way cord blood cells seem to be more interesting than bone marrow cells for being more immature, and thus "better stem cells", for presenting a lower frequency of graft versus host disease after transplantation, and for apparently being more susceptible to gene transfer (Bühring, 1998). On the other hand, cord blood hematopoietic stem cells are enough to reconstitute children, but not to engraft an adult, requiring ex vivo manipulations (Piacibello *et al.*, 1997).

A single stem cell has been proposed to be capable of more than 50 cell divisions or doublings and has the capacity to generate up to 10^{15} cells, or sufficient cells for up to 60 years (McNiece & Briddell, 2001). The proliferation and differentiation of cells is controlled by a group of proteins called hematopoietic growth factors (HGFs) and interleukins (Bagby & Heinrich, 2000; McNiece & Briddell, 2001). If we could replicate this cell amplification in vitro with HGFs, it might be possible to generate large numbers of cells that could be used for a variety of clinical applications (McNiece & Briddell, 2001).

Several culture system were developed to try to expand hematopoietic stem cells (Koller *et al.*, 1992; Shah *et al.*, 1996; Piacibello *et al.*, 1997). The study of Piacibello *et al.* (1997) showed the differential ability of FL, TPO, KL, and IL-3, alone or combined, to support different stages of hematopoiesis in long term stroma-free cultures suspension cultures of CD34⁺ HUCB cells. Several studies showed the effects of thrombopoietin alone in culture, where it can stimulate the early proliferation, survival (Yoshida et al, 1997) or differentiation of progenitor cell in cord blood (Schipper et al 1998) or bone marrow (Matsunaga et al 1998).

The proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells is controlled not only by soluble growth factors, but also by adhesion to stromal cells and matrix molecules (McEver, 2000). The expression of adhesion molecules has attracted special attention in the cord blood cells assay. Self-renewal, proliferation, differentiation, homing, and mobilization of hematopoietic progenitor cells (HPCs) are regulated by a complex mechanism that involves the bone marrow microenvironment. Cell adhesion molecules expressed on HPCs

and on endothelial and stromal cells play a pivotal role in this process (Timeus, 1998a). These molecules permit the interaction with various regulatory elements present in the microenvironment, which includes stromal cells, extracellular matrix molecules (ECM) and soluble regulatory factors such as cytokines and growth/differentiation factors (Nardi & Alfonso, 1999). Adhesion molecules include integrins, selectins and molecules from the immunoglobulin superfamily (Abboud & Lichtman, 2001).

This work aimed at the investigation of the behaviour of umbilical cord blood $CD34^+D38^+$ and $CD34^+CD38^-$ cultivated with different combinations of growth factors, as to their viability, immunophenotype and self-renewal and differentiation capacities. Adhesion molecules representing the integrins (CD11c or integrin α chain, CD49e or alpha-5 chain and CD61 or beta-3 chain), selectins (CD62L or LECAM-1) and the immunoglobulin superfamily (CD31 or PECAM-1) were analysed. The expression of HLA-DR and CD117 (c-kit or stem cell factor receptor), which represent differentiation markers for $CD34^+$ cells, was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Human umbilical cord blood cells

A total of 27 cord blood samples were used in this study. Umbilical cord blood samples obtained after deliveries were collected in sterile bags containing citrate-phosphate-dextrose. Samples were obtained at Placental Blood Program (PBP) from New York Blood Center (NYBC) (New York, NY, USA). Blood is collected according to an IRB (Institutional Review Board)-approved protocol. Units that are not used to Placental Blood Program are used for research. Because the collection is performed on delivered placentas, the blood is considered discarded tissue. Blood not used for clinical transplants is not identified and is used without informed consent. Gestational age of the UCB units in this present study can be expected to be within the average range of units collected for the PBP (39.5 ± 1.6 , $N=12,835$)

Isolation of CD34⁺ cells

Low density cells were isolated using density gradient centrifugation on Ficoll-Paque 1.077 g/cm² (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ), modified by the addition of a 1 M phosphate buffer, pH 7.6 to the PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline – GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) used to dilute the blood (Hendrikx *et al.*, 2001). Using this modification improved the isolation of the mononuclear fraction, since the harvested cell population contained 50% less reticulocytes and better than 50% less erythrocytes. After centrifugation at 2600 rpm for 20 minutes, the mononuclear cells (MNCs) at the interface were removed and washed twice with PBS. The CD34⁺ cells were harvested from the MNCs using MACS High Gradient Magnetic Separation Columns for positive selection (Miltenyi Biotec, Germany). The magnetically labelled cells were enriched by passing them twice through positive selection columns.

Antibodies

For the analysis of CD34⁺ cells, the following monoclonal antibodies (Pharmingen/Becton Dickinson, San Jose, CA) were used: anti-human CD34/FITC, anti-human CD38/APC, anti-human CD11c/PE, anti-human CD31/PE, anti-human CD49e/PE, anti-human CD61/PE, anti-human CD62L/PE, anti-human CD117/PE and anti-human HLA-DR/PE, as well as isotype control antibodies: mouse IgG1,k/FITC, mouse IgG1,k/PE, mouse IgG1,k/APC.

Flow cytometric analyses

Processing for four-colour fluorescence flow cytometry was done within 36 hours of collection in at least 10,000 CD34⁺ cells, before culture. After 4 and 7 days culture, the same processing was done. Isolated cells were incubated with anti-CD34/FITC and anti-CD38/APC antibodies combined with PE-conjugated antibodies specific for CD11c, CD31, CD49e, CD61, CD62L, CD117 or HLA-DR. All incubations were done for 30 minutes at 4°C, and cells were washed with phosphate-buffered saline. 7-aminoactinomycin D (7AAD) (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA) at final concentration of 1 µg/mL was used to identify dead cells. Flow cytometry was performed on a FACScalibur (Becton Dickinson) equipped with an argon-ion laser tuned at 488 nm. The CELLQuest software (Becton Dickinson) was used. Between 5,000 and 50,000 events were collected for the analysis. The gate strategy used can be summarized as follows. Firstly, viable cells were gated, followed by a gating of the cluster cells in SSC and FCS and, using the FITC channel, of CD34⁺ cells. Among CD34⁺ cells, CD38-negative and CD38-positive cells were gated and the frequency of cells positive for the third antibody was analysed among CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺ cells.

The analysis of cell frequency among the different populations was done using the Hendrikx & Pranke Plot program, a novel method to facilitate visualization of complex flow cytometry datasets across four dimensions. The Hendrikx-Pranke plot was developed as a means to visualize the complexity of extensive flow cytometry datasets in just a few graphs.

Samples are divided into clusters, and the mean fluorescence of the cluster vs. frequency of the cluster are plotted per cluster. In addition, date and cell suspension are shown as third and fourth dimensions, identified as symbol shape and symbol colour.

Ex vivo expansion cultures

The HUCB CD34⁺ cells were cultivated in 24-well plates (Multiwell™ Tissue Culture Plate - Becton Dickinson) in 2 mL IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium with L-glutamine and 25 mM HEPES buffer) (GIBCO BRL), supplemented with hydrocortisone (10⁻⁵ M, Sigma, St. Louis, MO), 2-mercaptoethanol (5.5 x 10⁻⁵ M, GIBCO BRL), penicillin G (100 units/mL, GIBCO BRL), streptomycin (0.1 mg/mL, GIBCO BRL) and 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma). Cell concentrations varied between 2.5 and 5.5 x 10⁵/well.

Human growth factors used were: thrombopoietin (TPO, Kirin Brewery, Japan), FLT-3 ligand (FL, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) and kit ligand (KL, Amgen Inc.), at concentrations of 50 ng/mL each. The combination of hematopoietic growth factors used were: TPO+FL+KL; TPO+FL and TPO. The cultures were maintained at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere and analysed on days 4 and 7.

RESULTS

CD34⁺ cells were isolated from a total of 27 cord blood samples, and the number of MNCs as well as CD34⁺ cells was analysed on a Neubauer chamber. As shown in Table 1, CD34⁺ cells presented a concentration of around 28 cells/mm³ of cord blood (yield after Ficoll and MACS procedure). The purity of this cell fraction was 93.2±3.6% (87-99%) (n= 10) and 22.2±11.3% (12.5-50.6%) (n= 10) of the CD34⁺ cells were dead, so that the average frequency of viable CD34⁺ among total cells was 71.0±13.1% (39.4–86.5%) (n= 10).

Table 1 - Volume of the umbilical cord blood samples and number of the mononuclear and CD34⁺ cells. N: 27. SD: standard deviation.

	Volume blood (mL)	MNCs (x 10 ⁷)	MNCs (/mm ³ blood)	CD34 ⁺ cells (x 10 ⁶)	CD34 ⁺ cells (/mm ³ blood)	%CD34 ⁺ cells among MNCs
Average	45.2	10.4	2,287	1.3	28.0	1.4
±SD	±5.6	±5.7	±1,132	±0.8	±16.7	±0.9
Range	(32–57)	(2.5–23.0)	(532–4,510)	(0.3–4.0)	(6.4–85.0)	(0.4–4.9)

CD34⁺ cells were cultivated with three combinations of growth factors, which presented different results when total cell proliferation was analysed. With TPO+FL+KL, the average increase in cell number in the nine samples studied was 3.55±1.6 fold after 7 days of culture. Only one sample (3a) showed a 0.56 fold decrease in cell number on day 4, but by day 7 the number of the cells in this sample had increased 3.36 fold. The observation of individual cultures (Figure 1) showed some heterogeneity among samples, particularly when TPO+FL were used. With this combination of growth factors, the total number of cells changed very little until day 4. From day 4 until day 7 of culture, however, in one sample the cell number decreased 0.65 fold, in two samples it showed no major variation, and in the remaining two a considerable increase (2.57±0.5 fold) in total number of cells was observed. Considering the total culture period, in two samples the cell number presented a 0.59±0.11 fold reduction and, in three samples, a 1.92±0.56 fold increase.

In all six samples cultivated with TPO, the total cell number decreased during the first four days. After that, in four of them there was an increase, not enough however to reach the original numbers. Taken as a whole, cell numbers decreased 0.55 ± 0.26 fold.

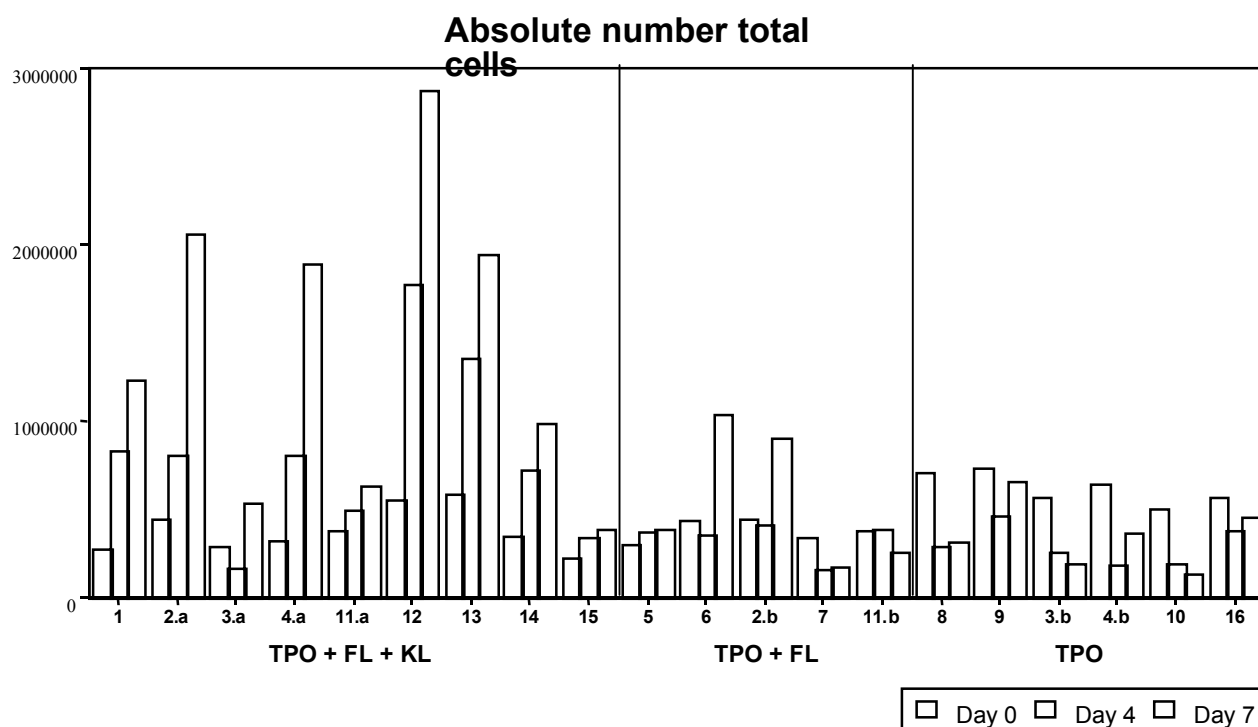


Figure 1 - Effect of different combinations of growth factors on cell proliferation after 4 and 7 days culture. Sixteen different units of cord blood were used, and samples 2, 3, 4 and 11 were split in two different cultures (*a* and *b*), using 2 combinations of growth factors. Samples 1, 2a, 3a, 4a, 11a, 12, 13, 14 and 15: TPO+FL+KL. Samples 5, 6, 2b, 7 and 11b: TPO+FL. Samples 8, 9, 3b, 4b, 10 and 16: TPO.

Further analyses, including flow cytometry, were done in ten of the samples. Three of them were split in two cultures, submitted to different treatments.

The analysis of cell viability during the period of culture (Table 2) showed that, when cultures were done in the presence of TPO+FL+KL, the absolute number of viable cells increased 4.27 ± 1.82 fold in the four samples studied. In one sample (3a) the number of viable cells decreased 0.5 fold from day 0 to day 4, but increased 3.4 fold from the 4th until the 7th day. In cultures done with TPO+FL, the number of viable cells increased 1.94 ± 0.56 fold in three samples, and decreased 0.76 fold in one sample. In the five samples cultivated with TPO, the number of viable cells decreased 0.35 ± 0.28 fold.

The viability of CD34⁺ cells was increased when culture was done with TPO+FL+KL and with TPO+FL, and maintained in the presence of TPO (Table 2). The frequency of viable CD34⁺ cells among total viable cells decreased, as presented in Table 2. As shown in Figure 2, the decrease in viable CD34⁺ cell numbers was homogeneous among different samples cultured under the same conditions.

The frequency of viable CD34⁺ cells among total viable cells is presented in Table 2. As shown in Figure 2, the decrease in viable CD34⁺ cell numbers was homogeneous among different samples cultured under the same conditions.

From the first day to 7th day culture, the number of the CD34⁺ cells viable when we used TPO+FL+KL decreased 0.46 ± 0.25 fold in the 4 samples studied. In TPO+FL, the number of the CD34⁺ cells viable decreased 0.30 ± 0.12 fold in the four samples. In TPO, the number of the CD34⁺ cells decreased 0.13 ± 0.08 fold in five samples.

Table 2 - Cell viability, CD34⁺ viability and frequency of CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells on day 0 and after cultivation with three different combinations of growth factors.

	Day 0	TPO+FL+KL (n = 4)		TPO+FL (n = 4)		TPO (n = 5)	
		Day 4	Day 7	Day 4	Day 7	Day 4	Day 7
Total cell viability (%) (n = 10)	76.1±13.0 (41.8-90.2)	81.7 ±6.0	78.6 ±5.8	68.9 ±17.6	72.2 ±8.1	54.2 ±14.9	52.9 ±13.0
Viability CD34 ⁺ cells (%) (n = 10)	76±12.7 (43.8 - 87.4)	90.2 ±4.0	92.3 ±5.9	83.2 ±7.5	87.7 ±7.0	78.6 ±11.0	79.8 ±14.0
Viable CD34 ⁺ cells among viable cells (%) (n = 10)	93.3±2.1	35.0 ±23.3	10.9 ±5.0	63.9 ±16.9	23.9 ±22.0	80.7 ±7.0	41.8 ±21.1
Viable CD38 ⁻ cells among CD34 ⁺ cells (%) (n = 8)	2.6±2.1 (0.55-5.57)	16.0 ±19.9	52.0 ±28.8	1.6 ±0.9	9.1 ±8.6	1.8 ±1.6	2.5 ±2.4

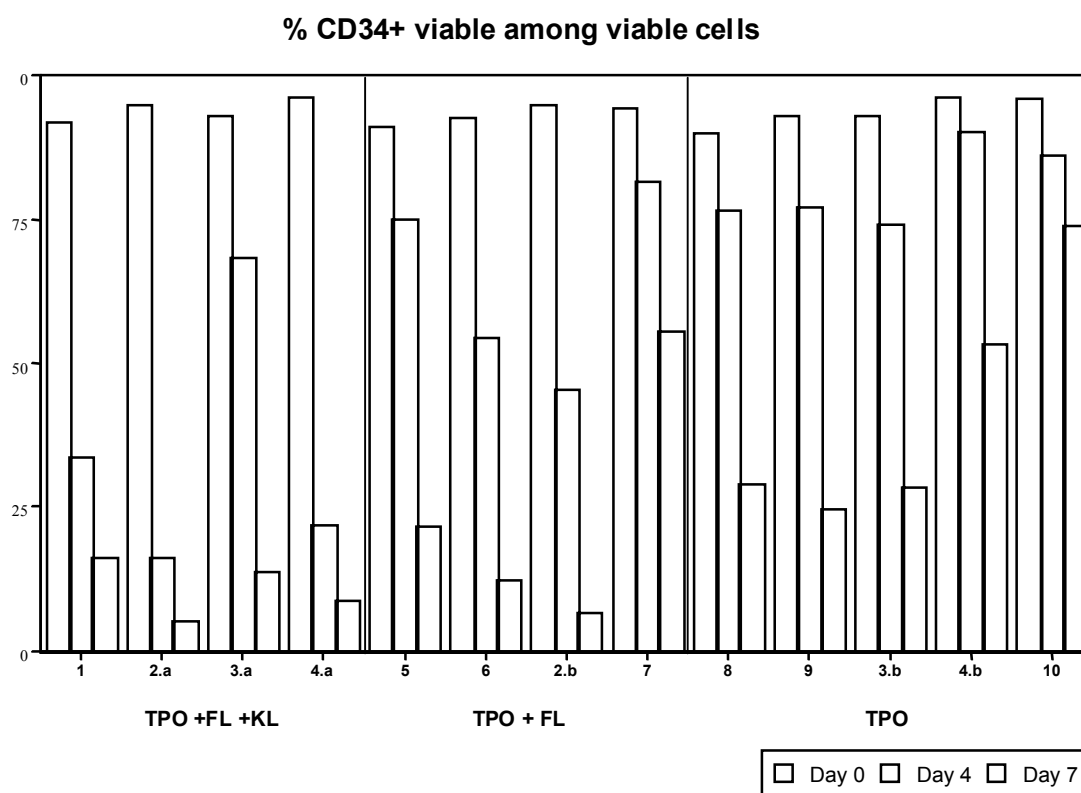


Figure 2 - Frequency of viable CD34⁺ cells among viable cells in culture. Samples 2, 3 and 4 were split in 2 cultures. Samples 1, 2a, 3a and 4a: TPO+FL+KL. Samples 5, 6, 2b and 7: TPO+FL. Samples 8, 9, 3b, 4b and 10: TPO.

Of particular interest are the results relative to the frequency of CD34⁺CD38⁻ cells during the culture period. As shown in Table 2, and presented for individual samples in Figure 3 (with a log scale for better visualization), the number of viable CD34⁺CD38⁻ cells increased in some of the culture conditions. With TPO+FL+KL, this increase was 14.59±11.81 fold in 3 samples studied from day 0 to day 7. In one sample, cell numbers were not determined on day 0, but from day 4 to day 7 the number of viable CD34⁺CD38⁻ cells increased 4.27 fold. In one sample (3a), the number of CD34⁺CD38⁻ cells decreased 0.23 fold from day 0 to day 4, but increased 23 fold until day 7. For cultures in the presence of TPO+FL, these cells increased 2.79±2.29 fold in the three samples studied from day 0 to day 7 and, in one sample for which the analysis was not done on day 0, 1.22 fold from day 4 to

day 7. In the presence of TPO, however, the number of viable $CD34^+CD38^-$ cells decreased 0.26 ± 0.31 fold in five samples.

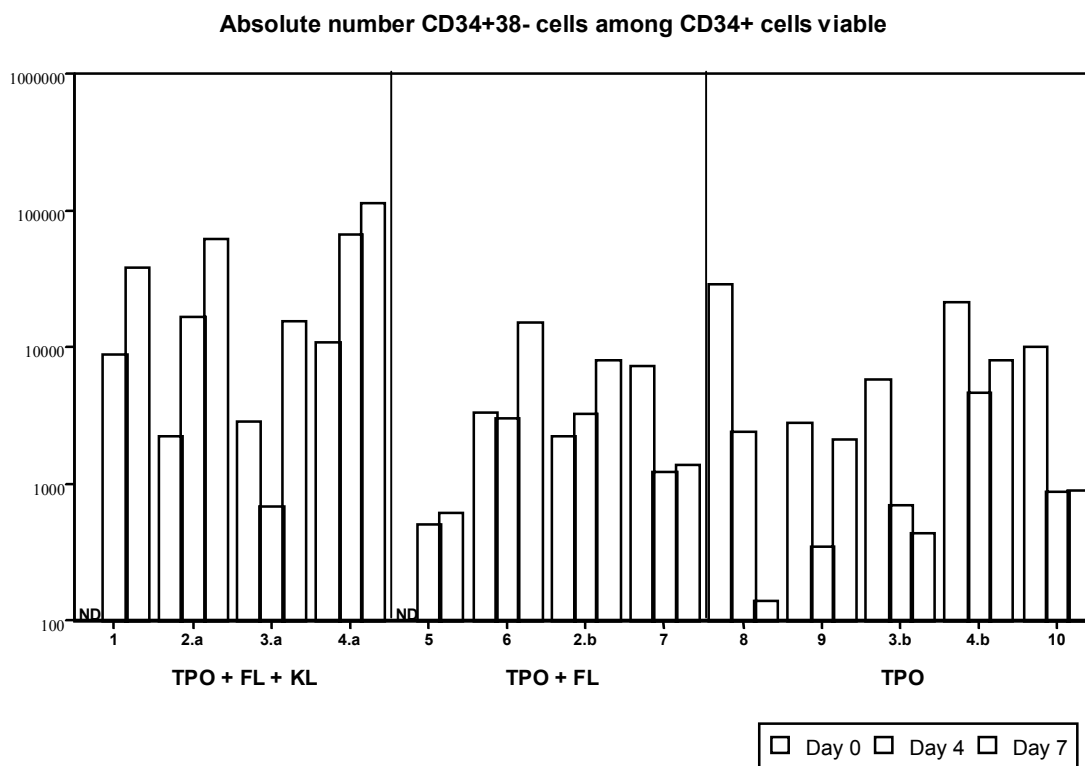


Figure 3 - Frequency of viable $CD38^-$ cells among viable $CD34^+$ cells in culture. The samples 2, 3 and 4 were split in 2 different cultures. Samples 1, 2a, 3a and 4a: TPO+FL+KL. Samples 5, 6, 2b and 7: TPO+FL. Samples 8, 9, 3b, 4b and 10: TPO. (ND: not determined)

The self-renewal and differentiation of $CD34^+CD38^-$ cells was significantly increased in the presence of TPO+FL+KL as compared to the other two combinations of growth factors. The increase in cell differentiation can be seen in Table 2, since the frequency of viable $CD34^+$ cells was lower after cultivation with TPO+FL+KL than with TPO+FL and, in this, higher than with TPO alone. When TPO+FL were used, cell differentiation increased in all samples and self renewal presented a small increase in half of the samples, after day 4. Finally, when cells were grown in TPO, differentiation increased in three of the five samples

and only after day 4, while a low rate of self renewal was seen in only two of the samples, after four days in culture.

An interesting correlation can be made between this effect and total increase in cell numbers, which is directly proportional to the increase or decrease in CD34⁺CD38⁻ cells (Figures 1 and 3). When TPO+FL+KL were used, in four samples, total cell numbers as well as CD34⁺CD38⁻ cells presented a gradual increase during cultivation. In Figure 1, it can be seen that total cell numbers increased from the first to the fourth day in eight of the nine samples cultured in presence of TPO+FL+KL. Only one sample (3a) showed a 0.6-fold decrease in cell number until the fourth day in culture, but this number increased around 3.4-fold from day 4 to day 7. The same pattern was observed for CD34⁺CD38⁻ cells (Figure 3), as well as in conditions where TPO+FL or TPO alone were used as growth factors. On the other hand, no correlation was observed between the initial number of CD34⁺CD38⁻ cells and total cell growth or with the expansion of the CD34⁺CD38⁻ cells. Similarly, no correlation was detected between the initial number of viable CD34⁺ cells and cell growth or number of CD34⁺CD38⁻ cells (results not shown).

The immunophenotypic profile of freshly isolated CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells was investigated. In seven of the eight samples analysed, the number of CD34⁺CD38⁺ cells positive for CD11c was low (less than 20%) and the fluorescence was dim or, alternatively, all cells were negative. Only one sample showed around 45% of positive cells with dim fluorescence. In only five samples the CD34⁺CD38⁻ population could be analysed, due to a low number of the events. The samples presented the same predominant pattern observed for CD34⁺CD38⁺ cells.

All eight samples analysed showed 100% of the cells positive for CD31, with a bright fluorescence. For CD49e, in all samples around 70-100% of the cells were positive, and the fluorescence was regular. For CD61, however, among CD34⁺CD38⁺ cells either the number of positive cells was low (less than 15%), with regular fluorescence, or 100% of the cells were negative. One sample showed double population in CD34⁺CD38⁺CD61⁺, but very few cells regular and bright. Because the number of the events was low in CD34⁺CD38⁻ cells, we could analyse only four of the eight samples.

Cells were heterogeneous for CD62L expression. Around 43±17% and 27±17% of CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells, respectively, were positive with a regular MFL (Mean

Fluorescence). In one sample, a second population of around 20%, among CD34⁺CD38⁺ cells, presented regular fluorescence. In two samples the number of events among CD34⁺CD38⁻ cells was too low to be analysed.

The pattern for HLA-DR was very heterogeneous among samples. HLA-DR was positive in around 54±28% and 34±31% of CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells, respectively, with a regular MFL. One sample showed double reactivity pattern of CD34⁺CD38⁺ cells, with a small population of the bright cells. Another sample showed two populations of very few positive cells with dim and bright cells.

The pattern of reactivity observed for CD117 was complex, and is presented in Figures 4 and 5. Among CD34⁺CD38⁺ cells, two clusters could be observed, one with a high frequency of cells (80±10%, range: 59-91%) with regular fluorescence and another composed of few cells (6±5%) with bright or very bright fluorescence. Among the CD34⁺CD38⁻ cells, 56±24% presented regular MFL, with no bright cells observed.

The immunophenotypic profile of umbilical cord blood CD34⁺ cells was analysed after 4 and 7 days culture with TPO+FL+KL, TPO+FL and TPO. In some of the samples, particularly among CD34⁺CD38⁻ cells, the analysis was not possible due to the very small number of the events. The culture with TPO+FL or TPO alone was also a factor which decreased the cell number to a level below analysis in some cases.

The patterns of reactivity for CD11c, CD31, CD49e and CD61 among CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells was not modified after the cultivation in all combinations of growth factors. For CD62L, however, the number of the positive cells and the fluorescence intensity increased from day 0 to day 4 and again from day 4 to day 7 in all culture conditions. In only one sample, cultivated with TPO alone, the number of positive cells increased from day 0 to day 4 but decreased a little from day 4 to day 7.

In cultures with TPO+FL+KL, the number of cells positive for HLA-DR and the intensity of fluorescence increased from the day 0 to day 4, but decreased a little from day 4 to day 7 among CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells. In cultures with TPO+FL, the reactivity pattern did not change among CD34⁺CD38⁺ cells, except for one sample in which the number of positive cells increased from day 0 to day 4 but remained unaltered until the end of the culture. Similar patterns were observed in CD34⁺CD38⁻ cells, but the number of

the events was very low. The results were heterogeneous in cells cultivated with TPO alone. Among CD34⁺CD38⁺ cells, the number of positive cells increased in three samples, whereas in the remaining two no modifications were observed. Among the four samples analysed for CD34⁺CD38⁻ cells, two did not show modifications and in two the number of positive cells increased.

Among CD34⁺CD38⁺ cells, the pattern of cells positive for CD117 observed in day 0 presented a decrease in fluorescence of the bright clusters after cultivation with TPO+FL or TPO alone. The presence of TPO+FL+KL, however, induced a decrease in CD117-positive cells (Figure 4). Among CD34⁺CD38⁻ cells (Figure 5), the results were more heterogeneous. When we used TPO+FL+KL, a cluster of few cells with dim or regular fluorescence could be observed, but no bright cells. The number of positive cells increased after culture with TPO+FL (Figure 5B) but no bright cells were seen. When we used TPO alone (Figure 5C), two clusters were observed: a high number of cells with mean fluorescence around 100 and another with few cells of mean fluorescence around 1000.

In some samples, after culture with TPO+FL (samples 5 and 6) or TPO alone (samples 9 and 3b) the number of CD34⁺CD38⁻ cells was too low to analyse for CD117 reactivity. On day 0, the average frequency of CD117-negative cells was $44.2 \pm 26.3\%$ (n= 5). After culture with TPO+FL+KL, $84.5 \pm 11.8\%$ of the cells were negative for CD117 on day 4 (n= 3) and $96.0 \pm 2.7\%$ (n = 4) on day 7. After culture with TPO+FL, 11.3 ± 5.1 and $7.5 \pm 9.2\%$ of the CD34⁺CD38⁻ cells were CD117-negative on day 4 (n=3) and day 7 (n=2) respectively, whereas cultivation with TPO resulted in 7.3 ± 2.1 and $7.5 \pm 6.4\%$ CD117-negative cells on days 4 (n = 3) and 7 (n= 2) respectively (Figure 6).

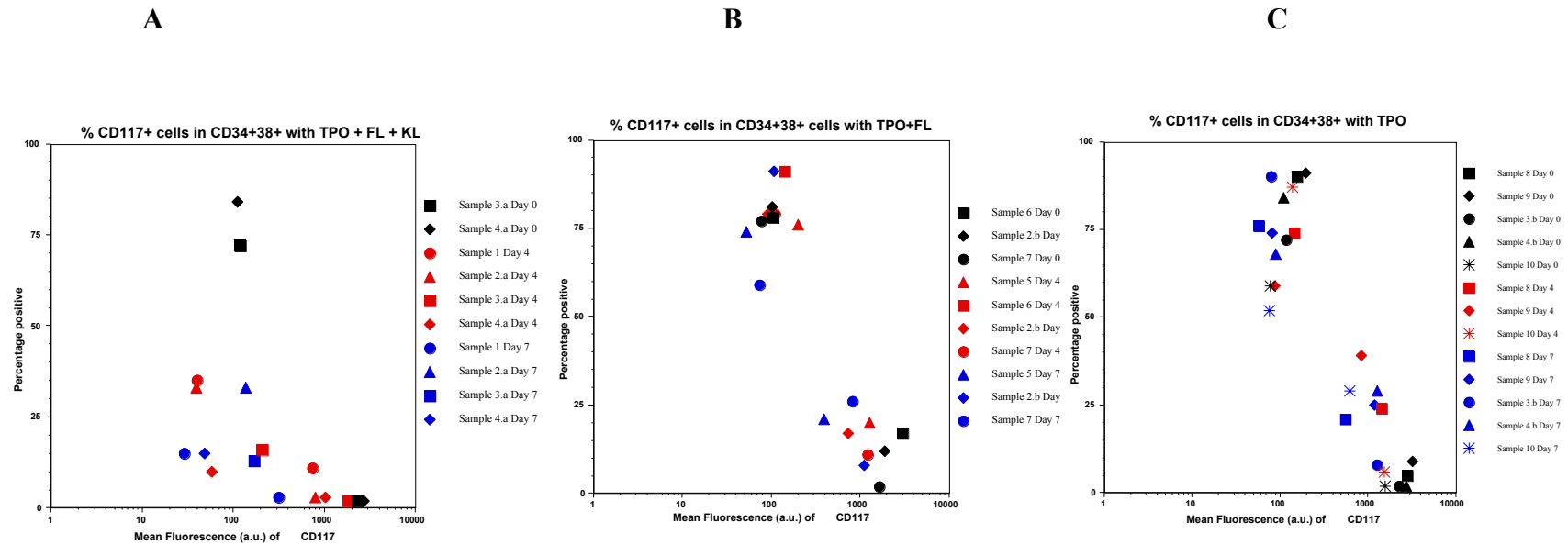


Figure 4 - Frequency of CD117⁺ cells among CD34⁺CD38⁺ cells with (A) TPO+FL+KL, (B) TPO+FL and (C) TPO in day 0 and after culture. Not determined: (A) Day 0: samples 1 and 2a. (B) Day 0: sample: 3. Day 7: sample: 6. (C) Day 0: samples: 3b and 4b.

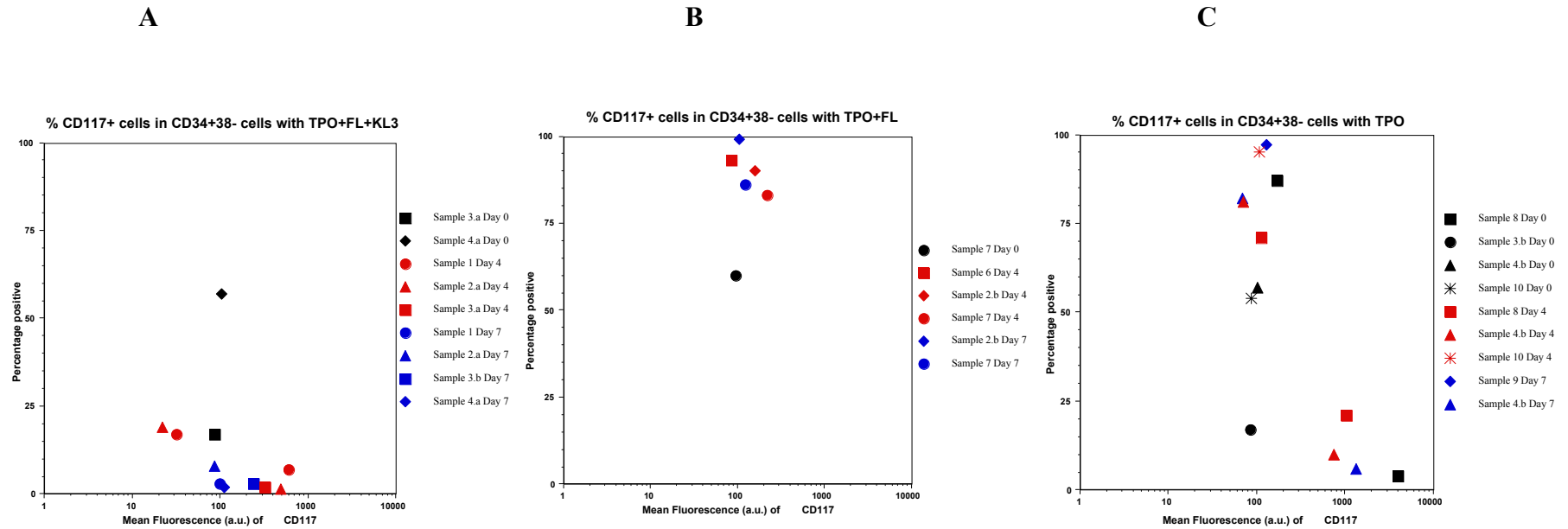


Figure 5 - Percentage of the CD117⁺ cells in CD34⁺CD38⁻ cells with (A) TPO+FL+KL, (B) TPO+FL and (C) TPO in day 0 and after culture. Not determined: (A) Day 0: samples 1 and 2a. Day 4: sample:4a. (B) Day 0: samples: 5, 6 and 2b. Day 4: sample: 5. Day 7: samples: 5 and 6. (C) Day 0: sample: 9. Day 4: samples: 9 and 3b. Day 7: samples: 8, 3b and 10.

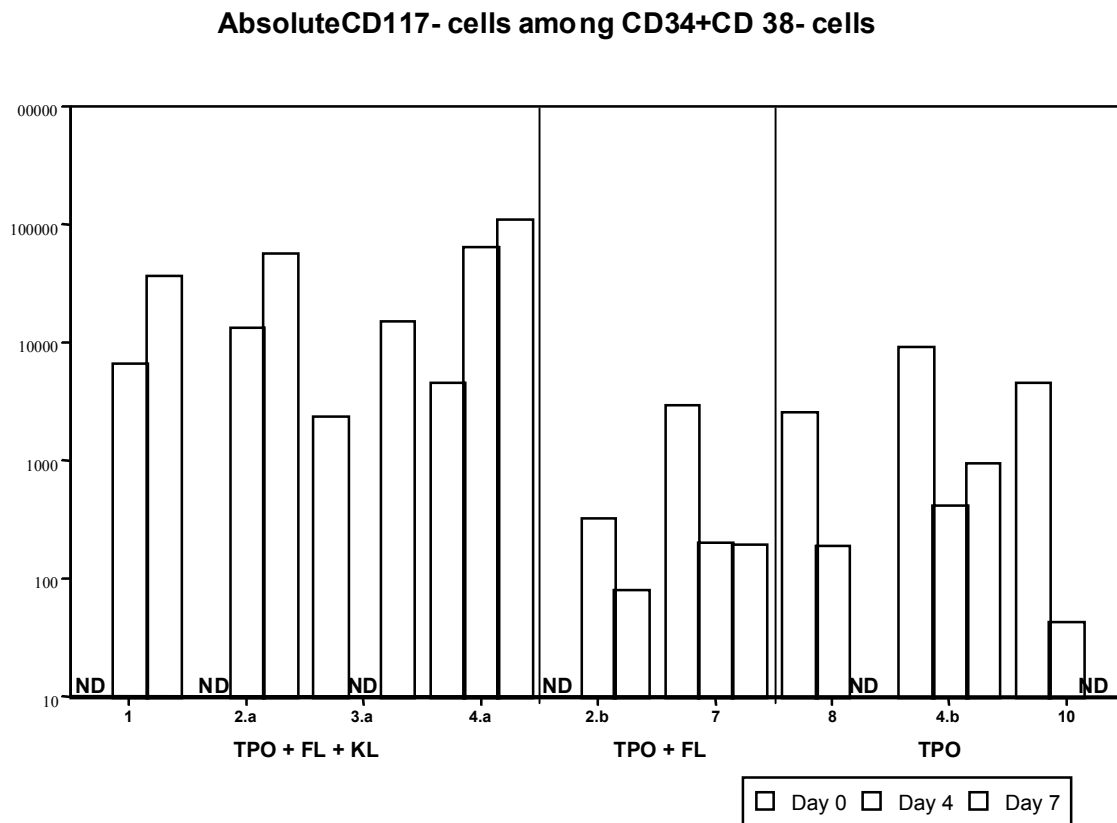


Figure 6 - Absolute number (linear scale) of the CD117⁻ cells among CD34⁺CD38⁻ cells in culture. The samples 2, 3 and 4 were split in 2 different culture, using 2 different combination of the growth factors. Samples 1, 2a, 3a and 4a: TPO+FL+KL. Samples 2b and 7: TPO+FL. Samples 8, 4b and 10: TPO. (ND: not determined).

DISCUSSION

Lack of CD38, HLA-DR and lineage committed antigens, as well as the co-expression of Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117), have been shown to identify the so-called stem cells (D'Arena *et al.*, 1998). However, the knowledge and standardization of umbilical cord blood CD34⁺ cells phenotype is critical since UCB volume is limited (Belvedere *et al.*, 1999). This work aimed at a contribution to the characterization of CD34⁺ cells from the umbilical cord blood, analysing their phenotype and behaviour before and after culture with different combinations of growth factors.

The frequency of CD34⁺ cells among CB mononuclear cells (yield after Ficoll and MACS procedure) in our study, was 1.4%±0.9% (0.4-4.9%), in agreement with other studies. This frequency has been described as similar to that in harvested pelvic BM (1.0±0.3% *versus* 0.8±0.4%) (Kinniburgh & Russel, 1993). According to Bühring (1998), about 1% of bone marrow cells express CD34, and generally less than 1% of these cells are CD38-negative. In other studies, Campagnoli *et al.* (2000) showed that the concentration of CD34⁺ cells in whole blood samples in term fetal blood was 0.4±0.03% of total CD45⁺ cells, and Hao *et al.* (1995) showed that the frequency of CD34⁺ cells among total MNCs in cord blood was 0.36±0.33% with a large variation among samples (range 0.02 to 1.43%) (n= 30).

In this study, we found a large variation in the frequency of CD34⁺ cells among CB mononuclear cells, from 0.4 to 4.9%. Although some form of linear correlation between total nucleated cell (TNC) and CD34⁺ cells in CB has been reported, within groups of samples with similar TNC counts a high degree of variation (at times exceeding 10-fold) in CD34⁺ cells is observed. CD34 counts in CB can be as low as 0.1% of TNC as reported by Yap *et al.* (2000), and D'Arena *et al.* (1996) observed 0.01–1.71% CD34⁺ cells among CB cells. Different explanations have been given to the variability found on the frequency of CD34⁺ cells in HUCB. There is evidence that, although the CD34 population is a reliable indicator of the progenitor potential of HUCB, it is nevertheless heterogeneous in nature. On the other hand, these heterogeneous results can reflect differences in the sensitivity of the methods employed by the different groups. CD34⁺ haemopoietic stem cells have also been shown to vary with gestational age, mode of

delivery and positioning of the delivered neonate after delivery. Yap *et al.* (2000) found that CD34⁺ cells accounted for 5.1±1.0 % of CD45⁺ cells in first trimester blood, significantly more than in term cord blood (0.4 ± 0.03%).

Campagnoli *et al.* (1999), however, reported that the concentration of CD34⁺ cells in first trimester blood (6.6±2.4 x 10⁴/ml) was similar to that in term cord blood (5.6±3.9x10⁴/ml), where the variability associated to the gestational age is referent to relative values among CD45⁺ cells. Kilpatrick *et al.* (1998) showed that the mean of CD34⁺ cells, expressed as a proportion of CD45-positive leukocytes, in fetal livers was 38%, while in UCB was 0.3%. The frequency of CD34⁺ cells was shown to decline linearly with gestation age, being significantly higher in the early gestational age than term gestation fetuses (Meister *et al.*, 1994; Thilaganathan *et al.*, 1994; Opie *et al.*, 1998; Shields *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2000; Gasparoni *et al.*, 2000; Surbek *et al.*, 2000), decreasing rapidly in the peripheral blood of neonates soon after birth (Li *et al.*, 2001). In fetal liver, also, there seems to be a strong and highly significant inverse correlation between CD34⁺ cells (as a proportion of total leukocytes) and gestational age (Kilpatrick *et al.*, 1998).

Other findings can also explain the variability of CD34⁺ frequency among HUCB samples. Longer duration stress (a prolonged first stage of labor) of the infant during delivery, for instance, demonstrated increased numbers of nucleated cells, granulocytes, CD34⁺ cells, and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood from children with lower venous pH (Lim *et al.*, 2000). Cesarean sections may allow collection of significantly higher volumes of HUCB and increase the absolute numbers of CD34⁺ cells compared to vaginal deliveries (Yamada *et al.*, 2000). The volume collected could be larger, also, according the effect of “upper” and “lower” positions of the term neonates, vaginally delivered, increasing the progenitor cell (CD34⁺) content of the HUCB (Grisaru *et al.*, 1999).

Controversial results have been published regarding the frequency of CD38- cells among cord blood CD34⁺ cells. We found that 2.6±2.1% (range 0.55–5.57) of the CD34⁺ cells were CD38-negative on day 0, which agrees with reports showing that most CD34⁺ cells present the CD38 antigen in HUCB (Malangone *et al.*, 2001) and in MPB cells (Sakabe *et al.*, 1997). Campagnoli *et al.* (2000) reported that the percentage of CD34⁺

cells which are CD38⁻ was 3.9±0.9 % (n= 5), whereas CD34⁺CD38⁻ cells have been reported to comprise 0.05±0.08 % of the mononuclear cells present in cord blood (Hao *et al.*, 1995). Timeus *et al.* (1998a) observed that the number of CD34⁺CD38⁻ cells was significantly higher in cord blood than in bone marrow (16±8.8% and 4.7±3% of total CD34⁺ cells respectively). However, the number of CD38⁻ among HUCB CD34⁺ cells was reported as 11% (D'Arena *et al.*, 1996), or 34.9±3.4% (Almici *et al.*, 1997).

Studies which compare the three different compartments have shown that the proportion of CD34⁺CD38⁻ cells was greater in HUCB (De Bruyn *et al.*, 1995; Timeus *et al.*, 1998a; Cho *et al.*, 1999). The observed higher percentage of pluripotent CD34⁺CD38⁻ stem cells in HUCB as compared to peripheral blood, that might explain the successful clinical use of HUCB even when low number of cells are used, candidates these antigens as the predictive parameter for clinical use of HUCB samples (Belvedere *et al.*, 1999). The great variability and controversial results reported for CD34⁺CD38⁻ cells in freshly collected cord blood can be explained by the natural heterogeneity of the CD34⁺ population or by factors that can change the number of the CD34⁺ cells, for instance differences in the gestational age. It has already been shown, for example, that, within the CD34⁺ population, the frequency of those cells was higher in the early gestational age group (81.8±9.9 %) than in term gestations (51.3±7.7 %) (Opie *et al.*, 1998). Gasparoni *et al.* (2000) showed that the absolute number of CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, BFU-E, CFU-GEMM, CFU-GM were significantly higher in very preterm fetuses compared with the other infants. The proliferative capacity was also higher at lower gestational ages, and the fetal liver cells had lower proportions of CD34⁺CD38⁺ subsets. In fetal liver, there was a strong and highly significant inverse correlation between CD34⁺ cells (as a proportion of total leukocytes) and gestational age (Kilpatrick *et al.*, 1998). Alternatively, different volumes of cord blood collected could be responsible for this variation, since as shown by Belvedere *et al.* (2000) and Malangone *et al.* (2001), there are more CD34⁺CD38⁻ cells in the last fraction of the cord and placenta blood than in the first ones.

The purity of the CD34⁺ cells after the isolation procedure in our study was 93.2±3.6%, in agreement with values reported in other studies. Several authors have shown that following immunomagnetic separation mean CD34⁺ cell purity is around 90 % (Reems *et al.*, 1997; Belvedere *et al.*, 1999; Malangone *et al.*, 2001).

Although cell numbers were higher after cultivation, particularly in the presence of TPO+FL+KL, and cell viability was increased or did not show much difference, the number of CD34⁺ cells showed a marked decrease, which was more pronounced in this same situation. These results indicate that, during cultivation, a proportion of stem cells differentiate and lose the CD34 surface marker.

In the literature, several different combinations of growth factors (GFs) has been used. In our study we used three different combination of GFs. TPO is a primary regulator of megakaryocyte and platelet production and might also play an important role in early hematopoiesis (Ramsfjell et al., 1997). It is an important cytokine in the early proliferation of human primitive as well as committed haemopoietic progenitors, and in the ex vivo manipulation of human haematopoietic progenitors (Yoshida, 1997). TPO has also been observed to suppress apoptosis of CD34⁺CD38⁻ cells in culture, showing a potential role in maintaining quiescent primitive human progenitor cells viable (Borge *et al.*, 1997). Liu *et al.* (1999) used a combination of growth factors with and without TPO and they showed a significant expansion of CD34⁺ cells from HUCB and NB (neonatal blood) to early and committed progenitors, in the presence of this factor. This potential role of TPO in the early hematopoietic differentiation was explored in the present work, in which TPO was used in all combinations of growth factors.

Flt3, a class III tyrosine kinase receptor expressed on primitive human and murine hematopoietic progenitors cells, is able to induce proliferation of CD34⁺CD38⁻ cells that are nonresponsive to other early acting cytokines and to improve the maintenance of progenitors in vitro (Shah *et al.*, 1996). In the studies of Piacibello *et al.*, using umbilical cord blood, the expansion of nonadherent cells was greater with TPO+FL+KL than TPO+FL, and greater in this combination than with TPO alone (Piacibello *et al.*, 1997; Piacibello, 1999). Similarly, the expansion of CD34⁺CD38⁻ was greater with TPO+FL than with TPO alone (Piacibello *et al.*, 1997), and the percentual number of CD34⁺ cells was greater with TPO+FL than with TPO+FL+KL. Our data agree with these results, since the absolute number of CD34⁺CD38⁻ cells increased considerably when TPO, FL and KL were used as growth factors. The number of those cells increased in a few samples when we used TPO and FL and decreased when we used just TPO. It has already been shown that, although TPO alone can stimulate limited clonal growth, it synergizes

with c-kit ligand (KL), flt3 ligand (FL), or IL-3 to potently enhance clonogenic growth. Ramsfjell et al. (1997) showed that whereas KL and FL in combination stimulate the clonal growth of only 3% of CD34⁺CD38⁻ cells, 40% of those cells are recruited by TPO+FL+KL demonstrating that TPO promotes the growth of a high fraction of CD34⁺CD38⁻ progenitor cells.

An interesting correlation can be made between the number of CD34⁺CD38⁻ cells and total increase in cell numbers, which is directly proportional to the increase or decrease in CD34⁺CD38⁻ cells (Figures 1 and 3). When TPO+FL+KL were used total cell numbers as well as CD34⁺CD38⁻ cells presented a gradual increase during cultivation. The results indicate that self-renewal and differentiation of CD34⁺CD38⁻ cells was significantly increased in the presence of TPO+FL+KL as compared to the other two combinations of growth factors.

Finally, it is interesting to observe that, although an increase in total cell counts and in CD34⁺CD38⁻ cell number was induced by the growth factors, particularly in the combination TPO+FL+KL, this increase was smaller than reported in other studies (Piacibello et al., 1997; Piacibello et al., 1999). In those, as well as in several other works, however, cells were cultured with fetal calf serum or pooled human serum, whereas we employed in serum-free media. We believe that serum-free medium allows a better control of the role individual cytokines and their combination have on the cell growth and differentiation. Furthermore, many of these studies analyze the behaviour of the cells in long term culture, whereas in the present work cells were cultivated for only one week. Our aim was to expand CD34⁺CD38⁻ cells in a short period, to use the expanded population for transplants. Once a histocompatible cord blood unit is found for an adult patient, for instance, its ex vivo expansion if necessary must be done within a few days.

We investigated the expression of some cell adhesion molecules and other proteins among CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells in umbilical cord blood. The immunophenotypic profile of CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells was analysed before and after culture with TPO+FL+KL, TPO+FL or TPO.

Adhesion molecules play a role in the migration of hematopoietic progenitor cells and regulation of hematopoiesis (Dercksen *et al.*, 1995). There is evidence that cord blood, bone marrow and peripheral blood-derived HSC are highly heterogeneous for a

number of antigens useful for HSC enumeration by flow cytometry (Bertolini *et al.*, 1998). Cell adhesion molecules are highly expressed in both HUCB and BM CD34⁺CD38⁺ cells. Since the expression of such molecules has been related to the repopulating capacity of HPCs, there is a possible advantage in homing and engraftment of more undifferentiated HUCB as opposed to BM HPCs (Timeus *et al.*, 1998b). Since the blood release of HPCs is probably due to a perturbation of the adhesive interactions between these cells and the expression on CD34⁺ HPCs found in the three hemopoietic compartments evaluated can lead to new knowledge about the mobilization kinetics in which the Ig superfamily adhesion molecules are involved (D'Arena *et al.*, 1998).

The expression of CD11c on HUCB CD34⁺ cells, in fresh samples, was rare, as already reported for BM (Asosingh *et al.*, 1998) and HUCB (Pranke *et al.*, 2001) CD34⁺ cells. This adhesion molecule has a role in the linkage to receptors on the stimulated endothelium (Nancy Hogg, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow). PECAM-1 expression was observed on all CD34⁺ cells, with high fluorescence, in all samples. Other reports have also shown high expression of CD31 on bone marrow (Asosingh *et al.*, 1998; Dercksen *et al.*, 1995) and cord blood (Pranke *et al.*, 2001) CD34⁺ cells. This molecule is involved with the adhesion between cells such as endothelial and leucocytes (William A. Muller, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow), as well as with the interaction between hematopoietic cells and extracellular matrix components in bone marrow (Watt *et al.*, 1993). CD11c and CD31 were homogeneously expressed, presenting the same pattern among CD34⁺CD38⁺ or CD34⁺CD38⁻ before and after culture.

We found in all samples, before and after culture, a large number of CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells positive for CD49e. This molecule corresponds to the alpha chain of the VLA-5 integrin, and is strongly involved in the binding of bone marrow progenitor cells to extracellular matrix components (Coulombel *et al.*, 1997). It is interesting, however, that different reports have conflicting results. Asosingh *et al.* (1998) showed that all CD34⁺ cells in normal bone marrow expressed CD49e, while cord blood and mobilized CD34⁺ cells had a lower expression of this molecule than BM CD34⁺ cells. On the other hand, Timeus *et al.* (1998a) showed greater expression of this molecule on CD34⁺ of CB than BM. In other studies, cord blood CD34⁺ cells were already reported to

have a remarkably similar (Roy & Verfaillie, 1999; Saeland *et al.*, 1992) expression of VLA-5 on BM CD34⁺ cells.

CD61 has been observed in small levels on HUCB CD34⁺ cells: less than 20% CD61⁺, (Belvedere *et al.*, 1999) or 20.2±16.1 % (Malangone *et al.*, 2001). In our study, the expression of this antigen on HUCB CD34⁺ cells was, also, rare in CD34⁺CD38⁺ or CD34⁺CD38⁻ cells before and after culture. L-selectin is involved in the homing of CD34⁺ cells after peripheral blood mononuclear cell transplantation (Dercksen *et al.*, 1995). The majority of the CD34⁺ cells also had CD62L on the surface membrane. CB and mobilized blood CD34⁺ have been shown to present a higher expression of CD62L than BM CD34⁺ cells (Asosingh *et al.*, 1998). CD62L was more expressed, also, in CB than in BM CD34⁺CD38⁻ subset, suggesting a possible advantage in homing and engraftment (Timeus *et al.*, 1998a; Timeus *et al.*, 1998b). In the present work, the CD62L expression was heterogenous, and the CD34⁺CD38⁺ population presented a slightly higher frequency of positive cells.

An interesting effect was observed for the expression of CD62L after cultivation. The number of positive cells and the fluorescence intensity increased during the culture in all conditions. Timeus *et al.* (1998-a) showed already that a short exposure to cytokines increases L-selectin expression in the more differentiated hematopoietic progenitors, CD34⁺CD38⁺ cells. This could improve their homing in a transplant setting.

HLA-DR is expressed in the majority of HUCB (Belvedere *et al.*, 1999; Malangone *et al.*, 2001) and peripheral blood CD34⁺ cells (Sakabe *et al.*, 1997; Belvedere *et al.*, 1999). While De Bruyn *et al.* (1995) showed that the coexpression of CD34 with HLA-DR was not significantly different in HUCB and BM (respectively, 86.3±2.7% and 92.7±5.1%), Cho *et al.* (1999) showed that among MNCs, CD34⁺HLA-DR⁺ cell frequencies did not differ significantly among the three compartments. Very heterogeneous results were found for HLA-DR in the present study, which due to the small number of cells in some of the experimental conditions made its interpretation difficult. The great heterogeneity of positive cells in fresh samples as well as small differences after culture, in CD62L and HLA-DR molecules could be explained by the natural heterogeneity of CD34⁺ cells or, perhaps, differences in gestational age. Surbek *et al.* (2000) showed that CD62L on CD34⁺ stem and progenitor cells in umbilical cord

blood change during gestation. Fetal liver cells, for instance, have been shown to present lower proportions of CD34⁺HLA-DR⁺ than HUCB, showing that the composition of fetal leukocytes changes during development and with gestational age (Kilpatrick *et al.*, 1998).

The frequency of HLA-DR-positive cells was a little higher among CD34⁺CD38⁺ than CD34⁺CD38⁻ cells. This result supports the conclusion that these molecules are more expressed in more differentiated cells.

The expression of the c-kit (CD117) on CD34⁺CD38⁺ cells separated the cells into two population in all samples, with more than 60% of the cells with regular fluorescence, and a small population of bright or very bright cells. In this way, three fractions were described: negative cells, cells with regular fluorescence, and cells with high fluorescence. Among CD34⁺CD38⁻ cells, however, the frequency of c-kit-positive cells was slightly lower and bright cells were not observed. Although the number of samples in the present work is relatively small, the results suggest that, after culture with TPO+FL+KL, the number of CD34⁺CD38⁻CD117⁻ cells increased. This number decreased when we used TPO+FL or TPO alone. Culture of CD34⁺ cells with TPO+FL+KL thus significantly increases the number of candidate stem cells with the CD34⁺CD38⁻(c-kit⁻) phenotype. On the other hand, the downregulation of c-kit may be due to the presence of KL in the growth factor combination, since this factor was essential to expand CD34⁺CD38⁻ cells. In this case, these stem cells are c-kit⁺, a situation to be better defined in further studies.

The most primitive human hematopoietic progenitor cells have demonstrated co-expression of c-kit, FLT3 and Thy 1, being negative for HLA-DR, CD38 and lineage markers (Bühring, 1988; Ramsfjell *et al.* 1997; D'Arena *et al.*, 1998; Williams, 2000; Quesenberry & Colvin, 2001). CD117 expression has thus been reported to characterize true stem cells (Papayannopoulou *et al.*, 1991). The c-kit receptor, a member of the Ig superfamily adhesion molecules, is involved in the interactions of CD34⁺ cells with other cells and stroma, on bone marrow, mobilized peripheral blood and HUCB. The c-kit receptor was detected on the majority of CD34⁺ HPCs, particularly in HUCB (HUCB:80.7±8.2%, BM: 72.3±13.1%, PB 64.2±17%) in the studies of D'Arena *et al.* (1998). On the other hand, Sakabe *et al.* (1997) showed that the expression of the c-kit receptor on MPB CD34⁺ cells was approximately 20% of that on BM- or HUCB- derived CD34⁺ cells which express high levels of c-kit receptor.

Studies about the expression of c-kit on mobilized peripheral blood CD34⁺ cells showed three fractions, namely CD34⁺c-kit^{high}, CD34⁺c-kit^{low} and CD34⁺c-kit⁻ cells (Sakabe *et al.*, 1997). Different levels of CD117 antigen was also shown in HUCB (Neu *et al.*, 1996). While Gunji *et al.* (1993) demonstrated that myeloid progenitors are enumerated in CD34⁺c-kit^{high} cells and erythroid progenitors are more enriched in CD34⁺c-kit^{low} cells, Sakabe *et al.* (1997) showed that erythroid progenitors are highly enriched in MPB CD34⁺c-kit^{high} cells, and that CFU-GM is enriched in MPB CD34⁺c-kit⁻ cells. Primitive progenitors with self-renewal potential may present in the MPB CD34⁺c-kit^{- or low} cell population (Sakabe *et al.*, 1997). Laver *et al.* (1995) reported that the HUCB-derived CD34⁺c-kit^{low} cell population contains the majority of cell cycle dormant progenitors and blast cell colony forming cells. Thus, the CD34⁺CD38⁻ or CD34⁺c-kit^{- or low} immunophenotype defines primitive progenitor cells in fetal liver, fetal BM, adult BM, MPB and HUCB (Sakabe *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1999; Christensen & Weissman, 2001). The expression of c-kit may therefore be useful in identifying HUCB progenitors with long-term engraftment capability (Laver *et al.*, 1995).

In conclusion, the results indicating that cultivation of HUCB CD34⁺ cells with the combination TPO+FL+KL induced an increase in total cell counts as well as in CD34⁺CD38⁻ cell numbers, suggest that this growth factor combination induces an expansion on very primitive stem cells. It is known that the use of allogeneic cord blood products as a source of cellular support for patients receiving high-dose chemotherapy has been limited primarily to the low numbers of cells in a HUCB unit (McNiece, 2000). The results of this work and others, however, show that the true stem cell can be expanded *in vitro*. Future studies should determine what culture conditions and what cell population are needed for a range of clinical applications, allowing the use of cord blood for transplantation in adults.

REFERENCES

- Abboud C.N. & Lichtman, M.A. (2001) Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: Williams. Beutler, E., Coller, B.S., Lichtman, M. A., Kipps, T.J. & Seligsohn, U. eds. *Hematology* **6th. ed.**, New York, McGraw-Hill, 29-58.
- Almici, C., Carlo-Stella, C., Wagner, J.E., Mangoni, L., Garau. D. & Rizzoli, V. (1997) Biologic and phenotypic analysis of early hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Leukemia*, **11**, 2143-2149.
- Asosingh, K., Renmans, W., Van der Gucht, K., Foulon, W., Schots, R., Van Riet, I. & De Waele, M. (1998) Circulating CD34+ cells in cord blood and mobilized blood have a different profile of adhesion molecules than bone marrow CD34+ cells. *European Journal of Haematology*, **60**: 153-160.
- Bagby, G.C. & Heinrich, M.C. (2000) Growth factors, cytokines, and the control of hematopoiesis. In: Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P. eds. *Hematology - Basic Principles and Practice* **3rd. ed.**, New York, Churchill Livingstone, 154-202.
- Belvedere, O., Feruglio, C., Malangone, W., Bonora, M. L., Donini, A., Dorotea, L., Tonutti, E., Rinaldi, C., Pittino, M., Baccarani, M., Del Frate, G., Biffoni, F., Sala, P. & Hilbert, D.M., Degrassi, A. (1999) Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34+ cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **25**, 141-146.

- Belvedere, O., Feruglio, C., Malangone, W., Bonora, M.L., Minisini, A.M., Spizzo, R., Donini, A., Sala, P., De Anna, D., Hilbert, D.M. & Degrassi, A. (2000) Increased blood volume and CD34⁺CD38⁻ progenitor cell recovery using novel umbilical cord blood collection system. *Stem Cells*, **18**, 245-251.
- Bertolini, F., Battaglia, M., Lanza, A., Palermo, B., Cuomo, A., Preti, P. & Robustelli della Cuna, G. (1998) Hematopoietic stem cells from different sources: biological and technical aspects. *Bone Marrow Transplant*, **21**, Suppl 2: S5-7.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Kapp, U., Wang, J.C.Y., Murdoch, B & Dick, J.E. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture (1997) *The Journal of Experimental Medicine*, **186**, 619-624
- Borge, O.J., Ramsfjell, V., Cui, L. & Jacobsen, S.E.W. (1997) Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34⁺CD38⁻ bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood*, **90**, 2282-2292
- Bühring H-J: Stem/Progenitor Cells.
<http://gryphon.jr2.ox.ac.uk/harr98/buehring/buehring.htm>
- Campagnoli, C., Fisk, N., Overton, T., Bennett, P., Watts, T. & Roberts I. (2000) Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. *Blood*, **95**, 1967-1972.
- Cho, S.H., Chung, I.J., Lee, J.J., Park, M.L. & Kim, H.J. (1999) Comparison of CD34⁺ subsets and clonogenicity in human bone marrow, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and cord blood. *Journal of Korean Medical Science*, **14**:520-525.

- Christensen, J.L. & Weissman, I.L. (2001) Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, **98**, 14541-14546.
- Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A. & Eaves, C. (1997) Expansion *in vitro* of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-*scid/scid* mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, **94**, 9836-9841.
- Coulombel, L., Auffray, I., Gaugler, M.H. & Roseblatt, M. (1997). Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematologica*, **97**:13-21.
- D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Di Giorgio., Zendoli., F. & Carotenuto., M. (1996) Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica*, **81**: 404-409.
- D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N. & Carotenuto., M. (1998) Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34+ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study. *Haematologica*, **83**: 404-409.
- De Bruyn, C., Delforge, A, Bron, D., Brenier, Massy, M., Ley P, de Hemptinne, D. & Stryckmans, P. (1995) Comparison of the coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR antigens on CD34+ purified cells from human cord blood and bone marrow. *Stem Cells*, **13**: 281-288.

- Dercksen, M.W., Gerritsen, W.R., Rodenhuis, S., Dirkson, M.K., Slaper-Cortenbach, I.C., Schaasberg, W.P., Pinedo, H.M., von dem Borne, A.E. & van der Schoot, C.E. (1995) Expression of adhesion molecules on CD34⁺ cells: CD34⁺ L-selectin⁺ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*, **85**: 3313-3319.
- Dorrell, C., Gan, O.I., Pereira, D.S., Hawlew, R.G. & Dick, J.E (2000) Expansion of human cord blood CD34⁺CD38⁻ cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increased in SCID repopulating cell (SRC) frequency; dissociation of SRC phenotype and function. *Blood*, **95**, 102-110.
- Gasparoni, A., Ciadella, L., Avanzini, M. A., Bonfichi, M., Di Mario, M., Piazzzi, G., Martinotti, L., Vanelli, L., Rondini, G. & Chirico, G. (2000) Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation. *Pediatric Research*, **47**: 825-829.
- Grisaru, D., Deutsch, V., Pick, M., Fait, G., Lessing, J.B., Dollberg, S. & Eldor, A . (1999) Placing the newborn on the maternal abdomen after delivery increases the volume and CD34 cell content in the umbilical cord blood collected: an old maneuver with new applications. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **180**: 1240-1243.
- Gunji, Y., Nakamura, M., Osawa, H., Nagayoshi, K., Nakauchi, H., Miura, Y., Yanagisawa, M. & Suda, T. (1993) Human primitive hematopoietic progenitor cells are more enriched in KIT^{low} cells than KIT^{high} cells. *Blood*, **82**, 3283-3289.
- Hao, Q-L., Shah, A.J., Thiemann, F.T., Smogorzewska, E.M. & Crooks, G.M. (1995) A functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow. *Blood*, **86**, 3745-3753.

- Hendrikx,P.J., Debnath,G., Alespeiti,G.E. & Visser, J.W.M. (2001). Improved density gradient separation of leukocytes from human umbilical cord blood. *Blood*, **98**, Suppl. 2: 337b: 5113.
- Jin, C-H., Takada, H., Nomura A., Takahata, Y, Nakayama, M., Kajiwara, M., Nakano, H. & Hara, T. (2000) Immunophenotypic and functional characterization of CD33⁺CD34⁺ cells in human cord blood of preterm neonates. *Experimental Hematology*, **28**, 1174-1180.
- Kilpatrick, D.C., Atkinson, A.P., Palmer, J.B., Murphy, W.G. & Turner, M.L. (1998) Developmental variation in stem-cell markers from human fetal liver and umbilical cord blood leukocytes. *Transfusion Medical*, **8**, 103-109.
- Kinniburgh, D. & Russel, N.H. (1993) Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplant*, **12**, 489-494.
- Koller, M.R., Bender, J.G., Papoutsakis, E.T. & Miller, W. M. (1992) Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood*, **80**, 403-411.
- Laver, J.H., Abboud, M.R., Kawashima, I., Leary, A.G., Ashman, L.K. & Ogawa, M. (1995) Characterization of c-kit expression by primitive hematopoietic progenitors in umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, **23**, 1515-1590.
- Li, K., Yau, F.W., Fok, T. F., So, K.W., Li, C. K. & Yuen, P.M.P. (2001) Haematopoietic stem and progenitor cells in human term and preterm neonatal blood. *Vox Sanguinis*, **80**, 162 –169.

- Lim, F.T., Scherjon, S.A., van Beckhoven, J.M., Brand, A., Kanhai, H.H., Hermans, J.M. & Falkenburg, J.H. (2000) Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **183**, 1144-1152.
- Liu, J., Li, K., Yuen, P.M., Fok, T.F., Yau, F.W., Yang, M. & Li, C.K. (1999) Ex vivo expansion of enriched CD34⁺ cells from neonatal blood in the presence of thrombopoietin, a comparison with cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplant*, **24**, 247-252.
- Malangone, W., Belvedere, O., Astori, G., Adami, V., Donini, A., Falasca, E., Sala, P.G., Del Frate, G., Pittino, M., De Anna, D. & Degrassi, A. (2001) Increased content of CD34⁺CD38⁻ hematopoietic stem cells in the last collected umbilical cord blood. *Transplantation Proceedings*, **33**, 1766-1768.
- Matsunaga, T., Kato, T., Miyazaki, H. & Ogawa, M. (1998) Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6. *Blood*, **92**, 452-461.
- McEver, R.P. (2000). Cell Adhesion. In: Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P. eds. *Hematology - Basic Principles and Practice* **3rd. ed.**, New York, Churchill Livingstone, 49-56.
- McNiece, I., Kubegov, D., Kerzic, P., Shpall, E.J. & Gross, S. (2000) Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. *Experimental Hematology*, **28**, 1181-1186.
- McNiece, I.M. & Briddell, R. (2001) Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Experimental hematology*, **29**, 3-11.

- Meister, B., Totsch, M., Mayr, A., Widschwendter, M., Huter, O. & Sperl, W., (1994) Identification of CD34⁺ cord blood cells and their subpopulations in preterm and term neonates using three-color flow cytometry. *Biology of the Neonate*, **66**, 272-279.
- Nardi, N.B. & Alfonso, Z.Z. (1999) The hematopoietic stroma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**, 601-609.
- Neu, S., Geiselhart, A., Kuci, S., Baur, F., Niethammer, D. & Handgretinger, R. (1996) Isolation and phenotypic characterization of CD117-positive cells. *Leukemia Research*, **20**, 963-971.
- Opie, T.M., Shields, L.E. & Andrews, R.G. (1998) Cell-surface antigen expression in early and term gestation fetal hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, **16**, 343-348.
- Papayannopoulou, T., Brice, M., Broudy, V.C. & Zsebo, K.M. (1991) Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood*, **78**, 1403-1412.
- Piacibello, W., Sanavio, F., Garetto, L., Severino, A., Bergandi, D., Ferrario, J., Fagioli, F., Berger, M. & Aglietta, M. (1997) Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood*, **89**, 2644-2653
- Piacibello, W., Sanavio, F., Severino, A., Dane, A., Gammaitoni, L., Fagioli, F., Perissinotto, E., Cavalloni, G., Kollet, O., Lapidot, T. & Aglietta, M. (1999) Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34⁺ cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*, **93**, 3736-3749
- Pranke, P., Failace, R.R., Allebrandt, W.F., Steibel, G., Schmidt, F. & Nardi, N.B. (2001) Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. *Acta Haematologica*, **105**, 71-76.

- Quesenberry, P.J. & Colvin, G.A. (2001) Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: Williams. Beutler, E., Coller, B.S., Lichtman, M. A., Kipps, T.J. & Seligsohn, U. eds. *Hematology* **6th. ed.**, New York, McGraw-Hill, 153-174.
- Ramsfjell, V., Borge, O.J., Cui, L. & Jacobsen, E.W. (1997) Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34⁺CD38⁻) human bone marrow progenitor cells. *The Journal of Immunology*, **158**, 5169-5177.
- Ramsfjell, V., Bryder, D., Bjorgvinsdottir, H., Kornfalt, S., Nilsson, L., Borge, O. J. & Jacobsen, S.E.W. (1999) Distinct requirements for optimal growth and in vitro expansion of human CD34⁺CD38⁻ bone marrow long-term culture-initiating cells (LTC-IC), extended LTC-IC, and murine in vivo long-term reconstituting stem cells. *Blood*, **94**, 4093-4102.
- Reems, J.A., Mielcarek, M. & Torok-Storb, B. (1997) Differential modulation of adhesion markers with ex vivo expansion of human umbilical CD34⁺ progenitor cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **3**, 133-141.
- Roy, V. & Verfaillie, C. (1999) Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: implications for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis. *Experimental Hematology*, **27**, 302-312.
- Saeland, S., Duvert, V., Caux, C., Pandrau, D., Favre, C., Valle, A., Durand, I., Charbord, P., de Vries, J. & Banchereau, J. (1992) Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34⁺ hematopoietic cells. *Experimental Hematology*, **20**, 24-33.

- Sakabe, H., Ohmizono, Y., Tanimukai, S., Kimura, T., Mori, K.J., Abe, T. & Sonoda, Y. (1997) Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived CD34⁺ cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38 and c-kit antigens. *Stem Cells*, **15**, 73-81.
- Schipper, L.F., Brand, A., Reniers, N.C.M., Melief, C.J.M., Willemze, R. & Fibbe, W.E. (1998) Effects of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of primitive and mature haemopoietic progenitor cells in cord blood. *British journal of Haematology*, **101**, 425-435.
- Shah, A.J., Smogorzewska, E.M., Hannum, C. & Crooks, G. M. (1996) Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34⁺CD38⁻ cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood*, **87**, 3563-3570.
- Shields, L.E. & Andrews, R.G. (1998) Gestational age changes in circulating CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **178**, 931-937.
- Surbek, DV., Steinmann, C., Burk., M., Hahn, S., Tichelli, A. & Holzgreve, W. (2000) Developmental changes in adhesion molecule expressions in umbilical cord blood CD34 hematopoietic progenitor and stem cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **183**, 1152-1157.
- Thilaganathan, B., Nicolaides, K.H. & Morgan, G., (1994) Subpopulations of CD34-positive haemopoietic progenitors in fetal blood. *British Journal of Haematology*, **87**, 634-636
- Timeus, F., Crescenzo, N., Basso, G., Ramenghi, U., Saracco, P. & Gabutti V. (1998a) Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34⁺ cells. *Stem Cells*, **16**, 120-126.

- Timeus F, Crescenzo N, Marranca D, Dall'Aglio M, Fazio L, Di Marco M, Saracco P, Ricotti M. & Gabutti V. (1998b) Cell adhesion molecules in cord blood hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant* , **22**, Suppl 1:S61-2
- Verfaillie, C.M. (2000). Anatomy and Physiology of Hematopoiesis. In: Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P. eds. *Hematology - Basic Principles and Practice* **3rd. ed.**, New York, Churchill Livingstone, 139-154.
- Watt, S.M., Williamson, J., Geneviev, H., Fawcett, J., Simmons, D.L., Hatzfeld, A., Nesbitt, S.A. & Coombe, D.R. (1993) The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood*: **82**, 2649-2663.
- Williams, D. A. (2000). Stem Cell Model of Hematopoiesis. In: Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P. eds. *Hematology - Basic Principles and Practice* **3rd. ed.**, New York, Churchill Livingstone, 126-138.
- Xiao, M., Oppenlander, B.K., Plunkett, J.M. & Dooley, D.C. (1999) Expression of Flt3 and c-kit during growth and maturation of human CD34+CD38- cells. *Experimental Hematology*, **27**, 916-927
- Yamada, T., Okamoto, Y., Kasamatsu, H., Horie, Y., Yamashita, N. & Matsumoto, K. (2000) Factors affecting the volume of umbilical cord blood collections. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, **79**, 830-833.
- Yamaguchi, M., Hirayama, F., Kanai, M., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., Sawada, K., Koike, T., Kuwabara, M., Ikeda, H. & Ikebuchi, K. (2001) Serum-free coculture for ex-vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Experimental Hematology*, **29**, 174-182.

Yap, C., Loh, M.T., Heng, K.K., Tan., P., Yu, S.L., Chan, S.H. & Ren, E.C. (2000) Variability in CD34+ cell counts in umbilical cord blood: implications for cord blood transplants. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, **50**, 258-259.

Yoshida, M., Tsuji, K., Ebihara, Y., Muraoka, K., Tanaka, R., Miyazaki, H. & Nakahata, T. (1997) Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum-free culture. *British Journal of Haematology*, **98**, 254-264.

DISCUSSÃO

A célula tronco hematopoética apresenta grande capacidade de auto-renovação e proliferação celular. Certos marcadores celulares são usados para identificar as classes primitivas das células tronco como a presença da glicoproteína CD34, de FLT3 e Thy 1 e a ausência de HLA-DR, CD38 e de marcadores de linhagem específica (Bühring, 1998; Jin *et al.*, 2000; Quesenberry & Colvin, 2001; Williams, 2000). A expressão da molécula CD38 identifica uma célula CD34⁺ já comprometida, enquanto que o fenótipo CD34⁺CD38⁻ identifica uma subpopulação de células tronco hematopoéticas mais primitivas (Malangone *et al.*, 2001).

O uso do sangue de cordão umbilical como fonte de células tronco hematopoéticas em transplante aumentou muito desde 1997 (McNiece *et al.*, 2000), principalmente devido às vantagens desta fonte celular sobre a medula óssea: oferta ilimitada, disponibilidade imediata do sangue e menor incidência de GVHD (Bühring, 1998; McNiece *et al.*, 2000; McNiece & Briddell, 2001). No entanto, a quantidade de células tronco hematopoéticas no sangue de cordão continua, ainda, sendo o fator limitante para o uso do mesmo, principalmente em adultos. Sendo assim, várias têm sido as tentativas de expandir estas células *ex-vivo* (Koller *et al.*, 1992; Shah *et al.*, 1996; Piacibello *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1997; Matsunaga *et al.*, 1998; Schipper *et al.*, 1998)

Devido à baixa frequência das células tronco no volume limitado de HUCB, muitas vezes a caracterização fenotípica desta mais recente fonte para transplante de células hematopoéticas é difícil. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o perfil imunofenotípico das células CD34⁺ provenientes de HUCB, bem como tentar expandir a célula candidata a ser a “verdadeira célula tronco”, analisando seu fenótipo e comportamento em cultura com fatores de crescimento hematopoéticos.

No presente estudo, o HUCB foi analisado por automação, para definição dos parâmetros hematológicos. Os valores hematológicos encontrados foram semelhantes aos do trabalho publicado por Walka *et al.* (1998), mostrando vários parâmetros hematológicos diferentes dos encontrados no sangue periférico de adultos, como maior número de leucócitos, reticulócitos e eritroblastos, bem como macrocitoze e anisocitose

mais acentuada, principalmente devido à presença do maior número de eritrócitos imaturos. Poucos são os estudos para determinar os valores de referência para o sangue de cordão umbilical obtidos por aparelhos de automação em hematologia. Walka *et al.* (1998) encontraram apenas um trabalho usando os novos aparelhos de automação em hematologia utilizando amostras da população neonatal, mas nenhum com HUCB. Em 1999, Tannirandorn *et al.* estudaram os parâmetros hematológicos durante a gestação em fetos entre 21 e 38 semanas de gestação. Em nosso estudo, o sangue de cordão foi obtido de crianças nascidas a termo. Sendo assim, o presente estudo contribui para o estabelecimento dos parâmetros hematológicos do sangue de cordão umbilical humano em gestação a termo.

Através da análise por citômetro de fluxo do sangue placentário, a proporção encontrada entre linfócitos e monócitos, assim como os valores encontrados para as subpopulações linfóides, foram compatíveis com os dados encontrados na literatura.

O perfil imunofenotípico encontrado entre os linfócitos e monócitos do sangue placentário quanto às moléculas de adesão e outros marcadores celulares, foram analisados no sangue de cordão fresco através de citômetro de fluxo de dois canais.

Entre as moléculas de adesão analisadas, CD11c estava ausente em linfócitos e presente em quase 50% dos monócitos, o que também seria esperado, uma vez que esta molécula é expressa em monócitos do sangue periférico. A presença de CD31 entre os monócitos e linfócitos foi ampla e a expressão da molécula CD62L foi em níveis similares entre as duas populações de células mononucleares (MNCs, *mononuclear cells*) do sangue de cordão (25-35%). Estas moléculas estão presentes em uma variedade de células do sangue periférico, como na maioria dos linfócitos, monócitos e granulócitos. Quanto à molécula CD49e, foi expressa em alta frequência sobre os monócitos e em baixa frequência sobre os linfócitos do sangue de cordão, cujo fenótipo é semelhante ao sangue periférico humano (www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/cd/index_molecule.htm).

A presença de CD117, ou c-kit, foi rara entre as células mononucleares do sangue de cordão, o que está de acordo com o fato que este marcador está presente em células precursoras hematopoéticas (Papayannopoulou *et al.*, 1991). A molécula HLA-DR foi expressa na maioria dos monócitos e em cerca de 15% dos linfócitos, o que era esperado, por ser molécula de HLA classe II presente em células mononucleares.

O perfil imunofenotípico das células CD34⁺ do HUCB foi estudado de duas diferentes formas, nos dois trabalhos apresentados. No primeiro estudo, o perfil imunofenotípico das células CD34⁺ do HUCB foi realizado no sangue fresco, sem manipulação e purificação. Este estudo foi realizado usando duas fluorescências, identificando-se a população de células CD34⁺ e estudando-se o segundo anticorpo sobre esta população.

No segundo trabalho, o estudo das células CD34⁺ foi levado a efeito após a purificação destas células em coluna magnética. A análise das moléculas estudadas foi realizada em citômetro de quatro cores, analisando-as entre as populações de células vivas CD34⁺CD38⁺ e CD34⁺CD38⁻, no dia do processamento da amostra e após 4 e 7 dias em cultura com fatores de crescimento hematopoéticos.

No segundo estudo, o número de células CD34⁺ foi 1,4%±0,9% (variação de 0,4 a 4,9%) entre as MNCs, o qual foi um pouco superior ao encontrado no primeiro estudo, mas ambos semelhantes aos dados da literatura. Já foram descritos valores como 0,4±0,03% de células CD34⁺ entre o total de células CD45⁺ (marcador leucocitário) (Campagnoli *et al.*, 2000), 0,36±0,33% de células CD34⁺ entre células mononucleares (Hao *et al.*, 1995), valores entre 0,01 e 1,71% de células CD34⁺ entre as células do sangue de cordão (D'Arena *et al.*, 1996), bem como 1,3% de células CD34⁺ entre as MNCs (Shields & Andrews, 1998).

Outro fator interessante foi a grande taxa de variação no número de células CD34⁺ encontradas, variando em até dez vezes (0,4–4,9%). Este fator também foi encontrado na literatura, onde Hao *et al.* (1995) observaram de 0,02 até 1,43% de células CD34⁺ entre o total de células mononucleares. Embora haja uma certa correlação entre o número total de células nucleadas (TCN) e o número de células CD34⁺, este número pode ser tão pequeno quanto 0,1% de células CD34⁺ entre o TCN (Yap *et al.* 2000) ou, como observado por D'Arena *et al.* (1996), 0,01 a 1,71% de células CD34⁺ entre as células do sangue de cordão. Vários são os fatores que podem explicar esta alta taxa de variação, tais como a observação de que a frequência de células CD34⁺ no sangue de cordão é heterogênea por natureza (Yap *et al.*, 2000) ou que o número percentual de células CD34⁺ em relação às células CD45⁺ ou às células mononucleares do sangue de cordão é inversamente proporcional à idade gestacional (Meister *et al.*, 1994; Thilaganathan *et al.*, 1994; Opie *et*

al., 1998; Shields & Andrews, 1998; Gasparoni *et al.* 2000; Jin *et al.*, 2000; and Yap *et al.*, 2000), embora Campagnoli *et al.* (1999), mostraram que esta variação seja em relação ao seu valor percentual entre as células CD45⁺, mas não no valor absoluto no HUCB.

Outros fatores são sugeridos serem responsáveis por um aumento no número de células CD34⁺ no sangue de cordão, como um longo tempo de estresse durante o trabalho de parto (Lim *et al.*, 2000), assim como fatores que podem aumentar o volume de sangue coletado, como o posicionamento do recém-nascido após o parto. (Grisaru *et al.*, 1999) ou o tipo de parto (se cesariano ou vaginal) (Vettenranta *et al.*, 1997), aumentando, conseqüentemente, o número de células CD34⁺

Quanto às células CD34⁺CD38⁻, nós encontramos 2,6±2,1% (0,55–5,57) de células CD38⁻ entre as células CD34⁺ viáveis. Os valores citados na literatura quanto ao número de CD34⁺CD38⁻ são muito variados, desde a maioria das células CD34⁺ sendo positivas para CD38 tanto em HUCB (Malangone *et al.*, 2001) quanto em sangue periférico (Sakabe *et al.*, 1997), 3,9±0,9% das células CD34⁺ sendo CD38⁻ (Campagnoli *et al.*, 2000), até valores consideravelmente mais altos de células CD34⁺CD38⁻ no HUCB, como 11% (D'Arena *et al.*, 1996), 16%±8.8% (Timeus *et al.*, 1998a), 34.9±3,4% (Almici *et al.*, 1997) ou 51.3±7.7 % (Opie *et al.*, 1998). Essa grande divergência quanto ao número destas células mostra a dificuldade de analisar estas células presentes no sangue de cordão umbilical.

No entanto, além da dificuldade na análise, devido ao baixo número de células CD34⁺ no HUCB, há vários fatores que podem explicar a grande variação no número de células CD34⁺CD38⁻. Os fatores que aumentam o número de células CD34⁺ poderiam influenciar, também, o número de células CD34⁺CD38⁻ no HUCB. A variação em relação à idade gestacional já foi indicada ser um fator inversamente proporcional ao número de células CD34⁺CD38⁻ no HUCB (Opie *et al.*, 1998; Gasparoni *et al.*, 2000). A capacidade proliferativa também mostra uma correlação inversa à idade gestacional (Gasparoni *et al.*, 2000).

Vários estudos, ainda, comparam a frequência da célula candidata a “verdadeira célula tronco hematopoética” nos três compartimentos. A frequência das células CD34⁺CD38⁻ é maior no sangue de cordão (De Bruyn *et al.*, 1995; Timeus *et al.*, 1998b;

Cho *et al.*, 1999), explicando o sucesso no uso de HUCB em transplantes (Belvedere *et al.*, 1999).

Outro achado interessante são os dados de Belvedere *et al.* (2000) and Malangone *et al.* (2001). Eles mostraram que a última fração coletada do sangue da placenta durante o procedimento, parece ter maior concentração de células CD34⁺CD38⁻. Dessa forma, o número destas células presentes no sangue, seria maior quanto maior for o volume coletado após o parto, não apenas pelo volume, mas por conter a “melhor fração” do HUCB.

Para o cultivo das células tronco de HUCB, escolhemos três combinações de fatores de crescimento (FCH) usando SCF (ou KL), Flt3 (ou FL) e trombopoetina (TPO). Esses FCHs foram escolhidos devido a sua ação sobre as células progenitoras. SCF é o fator estimulante de célula tronco, ligando-se ao c-kit ou CD117. Flt3, que é classe III de receptor tirosina-quinase expressa sobre células progenitoras primitivas humanas, tem se mostrado capaz de induzir a proliferação da célula tronco hematopoética mais imatura (CD34⁺CD38⁻) e parece auxiliar na manutenção dos progenitors *in vitro* (Shah *et al.*, 1996). TPO é o regulador primário na megacariocitopoese e pode exercer um papel importante nos primeiros estágios da hematopoese (Ramsfjell *et al.*, 1997) e na expansão *ex vivo* dos progenitors hematopoéticos (Yoshida, 1997; Liu *et al.*, 1999), bem como na capacidade de manter a viabilidade de células progenitoras primitivas quiescentes (Borge *et al.*, 1997).

No nosso estudo, a melhor combinação de FCH foi TPO+FL+KL, uma vez que foi o fator que expandiu com sucesso a população de células CD34⁺CD38⁻. Foi observada uma expansão de 15±12 vezes no número absoluto desta população celular em apenas 7 dias em cultivo, e um aumento no número percentual de células CD38⁻, de 2,6±2.1% para 52,0±29 % entre as células CD34⁺. Por outro lado, o número de células CD34⁺ diminuiu durante a cultura. A perda do marcador CD34⁺ na superfície da célula ocorreu, provavelmente, devido a diferenciação celular, o que pode ser correlacionado com o aumento do número de células.

Vários estudos da literatura têm mostrado o aumento desta população celular, inclusive com TPO sozinho (Piacibello *et al.*, 1997; Piacibello, 1999), o que não foi observado em nosso estudo. Já foi mostrado que TPO pode estimular o crescimento

celular dos progenitores hematopoéticos em sinergismo com KL e FL ou IL-3. Ramsfjell *et al.* (1997) expandiram as células CD34⁺CD38⁻ em apenas 3% usando KL+FL, mas a expansão foi de 40% com TPO+FL+KL, demonstrando que a TPO promove o crescimento celular das células progenitoras CD34⁺CD38⁻. No entanto, apesar de termos obtido uma expansão com sucesso das células CD34⁺CD38⁻, este aumento foi menor que o relatado em outros estudos (Piacibello *et al.*, 1997; Piacibello *et al.*, 1999). Porém nestes estudos, os autores usaram soro fetal bovino ou *pool* de soro humano, enquanto nós trabalhamos com meio sem soro, por acreditarmos que assim podemos ter um melhor controle sobre o real efeito dos fatores de crescimento sobre a proliferação celular. Além disso, muitos destes estudos trabalham com cultura de longo termo, enquanto nós estudamos o crescimento celular em uma semana apenas. O nosso objetivo foi tentar expandir as células CD34⁺CD38⁻ em um curto espaço de tempo, para viabilizar o uso destas células expandidas em transplantes. Uma vez que uma unidade compatível de sangue de cordão umbilical é encontrada para um doador adulto, por exemplo, cuja expansão *ex vivo* se faz necessária, esta expansão deverá ser realizada no menor espaço de tempo possível uma vez que o paciente não pode esperar muito tempo para o transplante.

Outra correlação interessante com o crescimento celular pode ser feito com o número de células CD34⁺CD38⁻. O aumento ou diminuição destas células foi diretamente proporcional ao aumento ou diminuição total de células. O número de células CD34⁺CD38⁻ aumentou consideravelmente quando usamos TPO+FL+KL, enquanto que com as outras combinações de FCH estas células pouco aumentaram em número. Por outro lado, nenhuma correlação foi vista entre o número inicial de células CD34⁺CD38⁻ e o crescimento celular ou a expansão deste grupo celular após a cultura. Sendo assim, podemos concluir que quando usamos TPO+FL+KL a diferenciação e a auto-renovação (ou produção de células CD34⁺CD38⁻) aumentou consideravelmente.

A expressão de algumas moléculas de adesão celular e outras proteínas foi analisada sobre as células CD34⁺, CD34⁺CD38⁺ e CD34⁺CD38⁻, antes e após cultivo com os FCHs citados. Em algumas amostras, não foi possível analisar estas moléculas nas células CD34⁺CD38⁻ porque o número de eventos era baixo. Este fato ocorreu

principalmente após a cultura com TPO+FL ou apenas TPO, pois as células CD34⁺CD38⁻ diminuíram ou apresentaram muito pouco crescimento após o cultivo.

As moléculas de adesão celular que agem na proliferação, diferenciação, mobilização e *homing* celular, CD11c, PECAM-1 (ou CD31), VLA-5 (ou CD49e), L-selectin (ou CD62L), bem como CD61, c-kit and HLA-DR são importantes marcadores do enxerto da célula tronco (Dercksen *et al.*, 1995; Timeus *et al.*, 1998a).

A molécula de adesão CD11c mostrou uma baixa expressão nas células CD34⁺CD38⁺ e CD34⁺CD38⁻ do HUCB. Esta molécula parece ter um importante papel na ligação de receptores sobre o endotélio estimulado (Nancy Hogg, www.ncbi.nlm.nih.gov/prov). Por sua vez, a proteína CD31 mostrou uma alta expressão, com praticamente todas as células CD34⁺ do HUCB expressando esta molécula. Esta molécula está envolvida com a interação entre células hematopoéticas e componentes da matriz extracelular na medula óssea (Watt *et al.*, 1993). Alguns estudos demonstraram a alta frequência de CD31 em células CD34⁺ da medula óssea (Asosingh *et al.*, 1998; Dercksen *et al.*, 1995) enquanto que CD11c mostrou-se rara entre as mesmas células na medula óssea (Asosingh *et al.*, 1998). Tanto CD11c quanto PECAM-1 não apresentaram alteração após cultura com FC hematopoéticos.

A cadeia alfa de VLA-5 integrina (CD49e) parece estar fortemente envolvida na ligação das células progenitoras da medula óssea aos componentes da matriz extracelular (Coulombel *et al.*, 1997). A alta frequência desta molécula em células CD34⁺ do sangue de cordão tem sido relatada em outros estudos (Asosingh *et al.*, 1998; Timeus *et al.*, 1998a). No entanto, diferentes trabalhos têm mostrado resultados conflitantes. Esta molécula já foi relatada como tendo menor expressão em células CD34⁺ do sangue de cordão quando comparado com a medula óssea (Asosingh *et al.*, 1998), assim como expressão similar e baixa (Roy & Verfaillie, 1999; Saeland *et al.*, 1992) ou maior que nas células CD34⁺ da MO (Timeus *et al.*, 1998a). No presente trabalho, encontramos baixa expressão da molécula CD49e sobre células CD34⁺ no primeiro estudo realizado, e alta expressão da mesma sobre células CD34⁺CD38⁺ e CD34⁺CD38⁻ no segundo estudo.

Embora não possamos concluir, com certeza, a causa das diferenças de expressão da molécula CD49e sobre as células CD34⁺ de HUCB, algumas sugestões são possíveis: a heterogeneidade dentro da população de células CD34⁺ (de Wynter *et al.*, 1999; De Bruyn

et al., 2000; Ma *et al.*, 2001; de Wynter *et al.*, 2001) e que as células CD34⁺ após isolamento podem apresentar diferenças com relação às células CD34⁺ não isoladas. Os resultados controversos apresentados na literatura sobre a co-expressão de marcadores em células CD34⁺ de sangue de cordão provavelmente refletem esta heterogeneidade fenotípica e funcional da população celular, principalmente considerando-se que enquanto no primeiro estudo as células foram estudadas como parte do total de células mononucleares, no segundo foram previamente isoladas em colunas magnéticas. A manipulação de células tronco hematopoéticas, como seu congelamento por exemplo, altera a distribuição de moléculas de superfície, como CD34 (Lanza *et al.*, 1999). A mobilização induzida por citocinas, também altera o perfil de marcadores (principalmente moléculas de adesão) de células CD34⁺ da medula óssea (Yano *et al.* 2000). Portanto, temos como hipótese que a manipulação exigida pelo processo de passagem em coluna também poderia afetar a biologia da célula, alterando o perfil de expressão de outras moléculas como a CD49e. Tada *et al.* (1999) mostrou que as moléculas de adesão e seus receptores apresentam interação entre si e mesmo superposição de funções. Sendo assim, no presente estudo, a ligação de anticorpos na molécula CD34 (uma vez que o processo de separação em coluna trata-se de seleção positiva) pode ter como consequência, no interior da célula, uma modulação da expressão de outras proteínas, como CD49e. A exposição destas células aos fatores de crescimento estudados, não mudou o fenótipo das mesmas quanto a esta molécula.

Quanto à molécula CD61, a mesma tem sido observada em baixos níveis sobre as células CD34⁺ do HUCB (Belvedere *et al.*, 1999; Malangone *et al.*, 2001). Em nosso estudo, a expressão desta molécula foi rara tanto antes quanto após a cultura.

A L-selectina está envolvida na redistribuição e *homing* das células CD34⁺ após o transplante de células tronco de sangue periférico (Dercksen *et al.*, 1995). Recentes estudos sugerem que esta molécula pode aumentar a capacidade clonogênica das células CD34⁺ (Koenig *et al.*, 1999) e já foi observada em significativa quantidade sobre a célula CD34⁺ mais primitiva no sangue periférico (Mohle *et al.*, 1995). Já foi relatada uma maior expressão desta molécula sobre as células CD34⁺ do sangue de cordão e células mobilizadas do sangue periférico do que nas mesmas células na MO (Asosingh *et al.*, 1998). Resultados controversos também são vistos quanto a esta molécula, uma vez que

outros autores mostraram expressão similar (Roy & Verfaillie, 1999) ou mais baixa (Timeus *et al.*, 1998a) desta molécula nas células tronco de HUCB que de MO.

No primeiro estudo observou-se a expressão da L-selectina em aproximadamente metade das células CD34⁺, enquanto que no segundo estudo, a expressão de CD62L foi mais heterogênea. Foi observada uma discreta maior positividade desta molécula entre as células CD34⁺CD38⁺ que entre as células CD34⁺CD38⁻.

A molécula CD62L é significativamente mais expressa em células CD34⁺CD38⁺ da MO que de HUCB, enquanto que o oposto foi visto nos progenitores mais imaturos, CD34⁺CD38⁻ (Timeus *et al.*, 1998a; Timeus *et al.*, 1998b). No entanto, após cultivo com FCHs em nosso estudo, o número de células positivas e a intensidade da fluorescência aumentou durante a cultura com todas as combinações de fatores de crescimento. Timeus *et al.* (1998a) mostraram que uma curta exposição das células às citocinas aumenta a expressão desta molécula, principalmente nos progenitores hematopoéticos mais diferenciados (células CD34⁺CD38⁺), podendo aumentar o seu *homing* nos transplantes. Em nosso estudo, observamos um aumento da expressão de CD62L após exposição aos FCH, nas duas populações de células CD34⁺.

A molécula HLA de classe II estudada, HLA-DR, é expressa na maioria das células CD34⁺ do HUCB (Belvedere *et al.*, 1999; Malangone *et al.*, 2001) e do sangue periférico (Sakabe *et al.*, 1997; Belvedere *et al.*, 1999). Porém, os resultados quanto à expressão desta molécula sobre as células tronco hematopoéticas são também conflitantes (Traycoff *et al.*, 1994). De Bruyn *et al.* (1995) mostraram que a co-expressão de CD34 e HLA-DR era diferente em HUCB e MO, enquanto que Cho *et al.* (1999) mostraram que entre as MNCs, a frequência das células CD34⁺HLA-DR⁺ não apresentava diferença nos três compartimentos.

No primeiro estudo de nosso trabalho, HLA-DR foi encontrada em 70% das células CD34⁺ do HUCB. Porém, no segundo estudo os resultados foram mais heterogêneos. É importante observar, também, que a expressão de HLA-DR, bem como de CD62L, foi um pouco maior entre as células CD34⁺CD38⁺ que entre as células CD34⁺CD38⁻. Esse achado está de acordo com o fato destas moléculas serem mais expressas em células mais diferenciadas.

Já foi descrito que a expressão de CD62L (Surbek *et al.*, 2000), bem como de HLA-DR (Kilpatrick *et al.*, 1998) muda durante o desenvolvimento fetal, sendo inversamente proporcional à idade gestacional. No entanto, acreditamos que a maior variação na expressão destas moléculas encontrada no segundo estudo seja uma consequência da heterogeneidade intrínseca da população de células CD34⁺, cuja heterogeneidade é também observada quanto ao número de células CD34⁺CD38⁻.

Em estudos posteriores com amostras coletadas do mesmo local, a média encontrada para a idade gestacional de 34 unidades de HUCB não utilizadas pelo banco de cordão umbilical foi 38.5±1.4 semanas. Logo, suspeita-se que estes dados representem a população estudada no presente trabalho, sendo ao redor de 90% de gestação a termo (≥38 semanas). No entanto, mesmo nas amostras `a termo, a variação no número de células CD34⁺ é muito grande (trabalho ainda não publicado) mostrando a heterogeneidade biológica da célula. Enormes variações no número de células CD34⁺ já foram descritas na literatura (Hao *et al.*, 1995; D'Arena *et al.*, 1996; Yap *et al.*, 2000). Li *et al.* (2001) encontraram variações ao redor de 10 vezes em estudo com sangue de cordão de recém-nascidos `a termo e Brocklebank & Sparrow (2001), estudando amostras de cordão umbilical `a termo, encontraram uma variação de 22 a 600 células CD34⁺/μL no HUCB.

Sendo assim, podemos concluir que, embora muitos fatores tenham sido sugeridos para influenciar o número dos progenitores hematopoéticos no HUCB, o estudo associado de todos estes fatores seriam de difícil interpretação. Mesmo medindo todos estes fatores, a grande variação ainda estaria presente devido a heterogeneidade intrínseca da população de células CD34⁺. Estes dados mostram o desconhecimento da biologia da células CD34⁺, indicando o muito que ainda temos a descobrir.

A molécula CD117, comumente chamada c-kit, é um membro da superfamília das imunoglobulinas e está envolvida nas interações das células CD34⁺ com o estroma e com outras células, tanto na medula óssea como nas células do sangue periférico mobilizado e no HUCB. Esta molécula tem sido detectada na maioria das células CD34⁺, porém mais frequentemente no HUCB (D'Arena *et al.*, 1998). No entanto, os achados na literatura são também controversos quanto à expressão desta molécula nas células CD34⁺. CD117 tem sido encontrado em diferentes frequências entre células CD34⁺: em 58% (Sakabe *et al.*,

1998) or 81% em HUCB e em 72 e 64% em células CD34⁺ de MO e sangue periférico respectivamente (D'Arena *et al.*, 1996).

Em nossos estudos, c-kit foi encontrado em 20% das células CD34⁺ no primeiro estudo e em mais de 60% das células no segundo estudo. No segundo estudo três populações foram vistas entre as células CD34⁺CD38⁺ (negativa, fluorescência regular e brilhante), enquanto que entre as células CD34⁺CD38⁻ foram observadas duas populações (negativa e fluorescência regular), além do que nesta última população o percentual de células positivas foi discretamente menor.

Sakabe *et al.* (1997) estudaram a expressão de c-kit sobre as células CD34⁺ mobilizadas do sangue periférico, as quais apresentavam, também, três distintas populações (CD34⁺c-kit^{high}, CD34⁺c-kit^{low} and CD34⁺c-kit⁻ cells). Diferentes níveis de c-kit foram também identificados sobre as células tronco em HUCB (Neu *et al.*, 1996). Laver *et al.* (1995) mostraram que células CD34⁺c-kit^{low} derivadas de HUCB contêm a maior parte das células progenitoras em ciclo dormente e células formadoras de colônias.

A célula progenitora hematopoética mais primitiva tem sido caracterizada pela co-expressão de c-kit⁺, FLT3⁺ e Thy 1⁺ e, também, pela ausência de expressão de HLA-DR, CD38 marcadores de linhagem específica (Bühring, 1998; Williams, 2000; Quesenberry & Colvin, 2001; Ramsfjell *et al.*, 1997). Logo, a presença de c-kit tem sido relatada para caracterizar a verdadeira célula tronco hematopoética (Papayannopoulou *et al.*, 1991). Por outro lado, estudos recentes têm sugerido que os precursores mais primitivos expressam c-kit em baixo nível (Xiao *et al.*, 1999) ou não o expressam (Sakabe *et al.*, 1998).

O fenótipo CD34⁺CD38⁻ ou CD34⁺c-kit⁻ or ^{low} tem sido usado para definir as células progenitoras mais imaturas no fígado fetal, na MO fetal, na MO do adulto, no HUCB (Sakabe *et al.*, 1997), bem como nas células mobilizadas do sangue periférico (Sakabe *et al.*, 1997, Xiao *et al.*, 1999).

O presente estudo detectou, no sangue de cordão sem expansão, um número discretamente maior de células c-kit negativas entre a população de células CD34⁺CD38⁻ que entre as células CD34⁺CD38⁺. O cultivo de células CD34⁺ com TPO+FL+KL aumentou o número de células c-kit negativas entre a população CD34⁺CD38⁻, mas também entre as células CD34⁺CD38⁺, sendo portanto difícil concluir se o aumento destas células c-kit negativas em cultura é real ou devido ao efeito da SCF em cultura,

internalizando a molécula, dificultando, assim, que a mesma seja identificada. O fato das células $CD34^+CD38^-$ terem aumentado na combinação de TPO+FL+KL mostrou a importância do SCF no crescimento da candidata a “verdadeira célula tronco” ($CD34^+CD38^-$), mas mostrou também que essas células devem ser positivas para c-kit.

Podemos concluir, então, que um cultivo de curta duração de células $CD34^+$ de HUCB com TPO+FL+KL, é capaz de aumentar a candidata a “verdadeira célula tronco” ($CD34^+CD38^-$) com sucesso. O presente trabalho, junto com os de outros autores, pode auxiliar em futuros estudos e tentativas de uso de células de HUCB em organismos adultos utilizando-se expansão *ex vivo*. Estamos muito próximos de começarmos a usar células tronco hematopoéticas expandidas em pacientes, o que poderá propiciar o uso de células de sangue de cordão umbilical em pacientes adultos, o que, até o momento, tem sido limitado apenas às crianças.

RESUMO E CONCLUSÕES

O uso de sangue de cordão umbilical humano, como fonte de células tronco hematopoéticas para transplantes, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. No entanto, seu uso permanece praticamente restrito para crianças devido ao número limitado destas células no HUCB. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil imunofenotípico e realizar cultura de células CD34⁺ de sangue de cordão umbilical humano (HUCB) em um sistema de rápida expansão.

O perfil hematológico do HUCB foi investigado utilizando-se contadores celulares de última geração e os parâmetros hematológicos encontrados foram semelhantes aos da literatura. A população de células mononucleares foi analisada por citometria de fluxo e foram encontrados em média 22,9±7,2% de monócitos e 77,05±7,24% de linfócitos, dos quais 46,59±15,62% eram linfócitos T, sendo 43,94±16,94% CD3⁺CD4⁺ e 13,45±7,46% eram CD3⁺CD8⁺.

O número de células CD34⁺ presentes no sangue de cordão representou em média cerca de 1% das células mononucleares. O perfil imunofenotípico destas células, bem como de células CD34⁺CD38⁺ e CD34⁺CD38⁻, foi analisado antes e após o cultivo de 4 e 7 dias com três combinações de fatores de crescimento hematopoéticos: TPO+FL+KL, TPO+FL e TPO sozinho

Após o cultivo, o número total de células aumentou 4,3±1,8 vezes em presença de TPO+FL+KL e o número de células CD34⁺CD38⁻ passou de 2,6±2,1% para 52±29% após 7 dias em cultura. Em culturas com TPO+FL e TPO, a fração de células CD34⁺CD38⁻ após cultivo foi apenas 9,1±8,6% e 2,5±2,4%, respectivamente, mostrando que a primeira combinação de fatores de crescimento é a melhor para a expansão da candidata à verdadeira célula tronco hematopoética, uma vez que estas células foram expandidas 15±12 vezes.

A expressão das moléculas CD11c, CD31, CD49e, CD61, CD62L, CD117 e HLA-DR foi avaliada por citometria de fluxo, logo após a coleta e após 4 ou 7 dias de cultivo. A expressão de CD11c, CD31, CD49e, CD61 não mudou durante a cultura. A expressão de CD11c e de CD61 foi muito baixa tanto em células CD34⁺CD38⁺ quanto em

CD34⁺CD38⁻. A expressão de CD31 foi alta nestas duas populações celulares, enquanto os resultados para CD49e foram mais heterogêneos. A expressão de CD62L e HLA-DR foi heterogênea e discretamente maior na população de células CD34⁺CD38⁺ que em CD34⁺CD38⁻. O número de células positivas para CD62L aumentou durante a cultura, principalmente usando-se TPO+FL+KL. O número de células positivas para HLA-DR aumentou até o quarto dia mas diminuiu um pouco até o fim da cultura nesta última combinação de FCH, mudando pouco nas outras combinações de fatores de crescimento. A heterogeneidade na expressão destas moléculas de adesão, bem como no número de células CD34⁺ e CD34⁺CD38⁻ pode ser sugerida por diversos fatores, mas também por uma heterogeneidade intrínseca da população de células CD34⁺.

Grande parte das células CD34⁺ expressavam c-kit em sua membrana e esta expressão foi mais alta em células CD34⁺CD38⁺ que em CD34⁺CD38⁻, inclusive com células altamente fluorescentes na primeira população, mostrando um maior número de células c-kit negativas entre as CD34⁺CD38⁻ sem expansão, que já foi sugerido ser a fração de células mais imaturas. No entanto, após o cultivo com TPO+FL+KL, o número de células CD34⁺CD38⁻c-kit⁻ aumentou consideravelmente, o que provavelmente se deve ao efeito do SCF em cultura. Uma vez que este fator de crescimento foi essencial para a expansão das células CD34⁺CD38⁻, conclui-se que estas células são c-kit⁺.

Podemos concluir, então, que um cultivo de curta duração de células CD34⁺ de HUCB com TPO+FL+KL, é capaz de aumentar a candidata `a “verdadeira célula tronco hematopoética” (CD34⁺CD38⁻) com sucesso. O presente trabalho, junto com os de outros autores, pode auxiliar em futuros estudos e tentativas de uso de células de HUCB em organismos adultos utilizando-se expansão *ex vivo*. Estamos muito próximos de começarmos a usar células tronco hematopoéticas expandidas em pacientes, o que, esperamos, poderá propiciar o uso de células de sangue de cordão umbilical em pacientes adultos.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Human umbilical cord blood (HUCB) has been increasingly employed as a source of hematopoietic stem cells for transplantation. Its use is however restricted to children, due to the limited number of cells. This work aimed at analyzing the immunophenotypic profile and culture potential of HUCB CD34⁺ cells, in a rapid expansion culture system.

The hematological profile of HUCB was investigated using most updated cell counters, and the hematological parameters observed were similar to those described in the literature. The mononuclear cell population was analyzed by flow cytometry, and was composed in average by 22.9±7.2% monocytes and 77.05±7.24% lymphocytes, among which 46.59±15.62% were T cells, being 43.94±16.94% CD3⁺CD4⁺ and 13.45±7.46% CD3⁺CD8⁺.

CD34⁺ cells represented in average 1% of cord blood mononuclear cells. These cells were analyzed by flow cytometry, before and after 4 and 7 days culture with different combinations of hematopoietic growth factors: TPO+FL+KL, TPO+FL and TPO alone. After culture, total cell number increased 4.3±1.8 in the presence of TPO+FL+KL and the frequency of CD34⁺CD38⁻ cells increased from 2.6±2.1% to 52±29% on day 7. In cultures with TPO+FL and TPO, CD34⁺CD38⁻ represented 9.1±8.6% and 2.5±2.4%, respectively, showing that the first combination of growth factors more efficiently induced the expansion of the population candidate to true stem cell, which was expanded 15±12 fold.

The expression of the surface molecules CD11c, CD31, CD49e, CD61, CD62L, CD117 and HLA-DR was analyzed by flow cytometry, before and after 4 and 7 days culture. The expression of CD11c, CD31, CD49e and CD61 was not modified during culture. CD11c and CD61 were poorly expressed on CD34⁺CD38⁺ as well as on CD34⁺CD38⁻ cells, whereas CD31 levels were high on both populations and CD49e expression was more heterogeneous. Expression of CD62L and HLA-DR was heterogeneous and slightly higher on CD34⁺CD38⁺ than on CD34⁺CD38⁻ cells. The frequency of CD62L-positive cells increased with cultivation, particularly in presence of TPO+FL+KL. The number of HLA-DR-positive cells increased until day 4 but showed a

small decrease on day 7, and changed very little in the other growth factor conditions. The heterogeneity of expression observed for the surface molecules, as well as for the frequency of CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells, can be explained by an intrinsic heterogeneity of CD34⁺ cells and possibly by differences in the gestational age.

A great part of the CD34⁺ cells expressed c-kit, and the expression was higher among CD34⁺CD38⁺ than among CD34⁺CD38⁻ cells, being observed highly fluorescent cells in the former population and a higher number of c-kit-negative cells in the unmanipulated CD34⁺CD38⁻ cells, which have already been indicated as the more immature cell population. After cultivation with TPO+FL+KL, however, the frequency of CD34⁺CD38⁻c-kit⁻ showed a consistent increase, probably due to the presence of SCF in the culture. Since this growth factor was essential for the expansion of CD34⁺CD38⁻ cells, it can be concluded that they are c-kit⁺.

We can thus conclude that the short term cultivation of HUCB CD34⁺ cells in the presence of TPO+FL+KL can expand the cell population which is candidate to “true stem cell” (CD34⁺CD38⁻). The present work, together with others, can help future studies on the attempt of using HUCB cells in adult organisms, after *ex vivo* expansion. We are very close to using expanded hematopoietic stem cells on patients, which we hope will allow the use of umbilical cord blood in adult patients.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abboud, C.N. & Lichtman, M.A. (2001). Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: Williams, Beutler, E. , Coller, B.S., Lichtman, M. A., Kipps, T.J. & Seligsohn, U. eds. *Hematology 6th. ed.*, New York, McGraw-Hill, 29-58.
- Almici, C., Carlo-Stella, C., Wagner, J.E., Mangoni, L., Garau, D. & Rizzoli, V. (1997) Biologic and phenotypic analysis of early hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Leukemia*, **11**, 2143-2149
- Asosingh, K., Renmans, W., Van der Gucht, K., Foulon, W., Schots, R., Van Riet, I. & De Waele, M. (1998) Circulating CD34+ cells in cord blood and mobilized blood have a different profile of adhesion molecules than bone marrow CD34+ cells. *European Journal of Haematology*, **60**: 153-160.
- Bagby, Jr, G.C. & Heinrich, M.C. (2000). Growth factors, cytokines, and control of hematopoiesis. In: Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P. eds. *Hematology - Basic Principles and Practice 3rd. ed.*, New York, Churchill Livingstone, 154-202.
- Belvedere, O., Feruglio, C., Malangone, W., Bonora, M. L., Donini, A., Dorotea, L., Tonutti, E., Rinaldi, C., Pittino, M., Baccarani, M., Del Frate, G., Biffoni, F., Sala, P. & Hilbert, D.M., Degrassi, A. (1999) Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34+ cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **25**, 141-146.

- Belvedere, O., Feruglio, C., Malangone, W., Bonora, M.L., Minisini, A.M., Spizzo, R., Donini, A., Sala, P., De Anna, D., Hilbert, D.M. & Degrassi, A. (2000) Increased blood volume and CD34⁺CD38⁻ progenitor cell recovery using novel umbilical cord blood collection system. *Stem Cells*, **18**, 245-251.
- Borge, O.J., Ramsfjell, V., Cui, L. & Jacobsen, S.E.W. (1997) Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34⁺CD38⁻ bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood*, **90**, 2282-2292
- Brocklebank, A.M. & Sparrow, R.L. (2001) Enumeration of CD34⁺ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*, **46**, 254-261
- Broudy, V.C. (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, **90**, 1345-1364.
(Brocklebank & Sparrow (2001)).
- Bühring H-J: Stem/Progenitor Cells.
www.gryphon.jr2.ox.ac.uk/harr98/buehring/buehring
- Campagnoli, C., Fisk, N., Overton, T., Bennett, P., Watts, T. & Roberts I. (2000) Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. *Blood*, **95**, 1967-1972.
- Cho, S.H., Chung, I.J., Lee, J.J., Park, M.L. & Kim, H.J. (1999) Comparison of CD34⁺ subsets and clonogenicity in human bone marrow, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and cord blood. *Journal of Korean Medical Science*, **14**:520-525.

- Coulombel, L., Auffray, I., Gaugler, M.H. & Roseblatt, M. (1997). Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematologica*, **97**:13-21.
- D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Di Giorgio., Zendoli., F. & Carotenuto., M. (1996) Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica*, **81**: 404-409.
- D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N. & Carotenuto., M. (1998) Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34+ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study. *Haematologica*, **83**: 404-409.
- De Bruyn, C., Delforge, A, Bron, D., Bremier, Massy, M., Ley P, de Hemptinne, D. & Stryckmans, P. (1995) Comparison of the coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR antigens on CD34+ purified cells from human cord blood and bone marrow. *Stem Cells*, **13**: 281-288.
- De Bruyn, C., Delforge, A., Lagneaux, L. & Bron, D. (2000) Characterization of CD34+ subsets derived from bone marrow, umbilical cord blood and mobilized peripheral blood after stem cell factor and interleukin 3 stimulation. *Bone Marrow Transplant*, **25**, 377-383.
- de Wynter, E.A., Emmerson, A.J. & Testa, N.G. (1999) Properties of peripheral blood and cord blood stem cells. *Best Practice and Research in Clinical Haematology*, **12**, 1-17.
- de Wynter, E.A., Heyworth ,C.M., Mukaida N, Matsushima, K. & Testa, N.G. (2001) NOD/SCID repopulating cells but not LTC-IC are enriched in human CD34+ cells expressing the CCR1 chemokine receptor. *Leukemia*, **15**, 1092-1101.

- Dercksen, M.W., Gerritsen, W.R., Rodenhuis, S., Dirkson, M.K., Slaper-Cortenbach, I.C., Schaasberg, W.P., Pinedo, H.M., von dem Borne, A.E. & van der Schoot, C.E. (1995) Expression of adhesion molecules on CD34⁺ cells: CD34⁺ L-selectin⁺ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*, **85**, 3313-3319.
- Garcia, A.L., Garcia, A.G., Martinez D.P., Langle, E.A., Fernandez S.P. & Vazquez, L.T. (1995) Reference values of T-lymphocyte subsets in umbilical cord blood. *Revista Alergia Mexico*, **42**, 60-63.
- Gasparoni, A., Ciadella, L., Avanzini, M. A., Bonfichi, M., Di Mario, M., Piazzzi, G., Martinotti, L., Vanelli, L., Rondini, G. & Chirico, G. (2000) Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation. *Pediatric Research*, **47**: 825-829.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J. & Boyse, E. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England Journal of Medicine*, **321**, 1174-1178.
- Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammard, A., Locatelli, F., Arcese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souillet, G., Ferreira, E., Laporte, J.P., Fernandez, M. & Chastang, C. (1997) Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *The New England Journal of Medicine*, **337**, 373-381
- Greenberg, A.W., Kerr, W.G. & Hammer, D.A. (2000) Relationship between selectin-mediated rolling of hematopoietic stem and progenitor cells and progression in hematopoietic development. *Blood*, **95**, 478-486.

- Grisaru, D., Deutsch, V., Pick, M., Fait, G., Lessing, J.B., Dollberg, S. & Eldor, A. (1999) Placing the newborn on the maternal abdomen after delivery increases the volume and CD34 cell content in the umbilical cord blood collected: an old maneuver with new applications. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **180**: 1240-1243.
- Hao, Q-L., Shah, A.J., Thiemann, F.T., Smogorzewska, E.M. & Crooks, G.M. (1995) A functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow. *Blood*, **86**, 3745-3753.
- Huss, R. (2000) Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, **9**, 783-93
- Jin, C-H., Takada, H., Nomura A., Takahata, Y, Nakayama, M., Kajiwara, M., Nakano, H. & Hara, T. (2000) Immunophenotypic and functional characterization of CD33⁺CD34⁺ cells in human cord blood of preterm neonates. *Experimental Hematology*, **28**, 1174-1180.
- Kilpatrick, D.C., Atkinson, A.P., Palmer, J.B., Murphy, W.G. & Turner, M.L. (1998) Developmental variation in stem-cell markers from human fetal liver and umbilical cord blood leukocytes. *Transfusion Medical*, **8**, 103-109.
- Kipps, T.J. (2001) The cluster of differentiation antigens. In: Williams. Beutler, E. , Collier, B.S., Lichtman, M. A., Kipps, T.J. & Seligsohn, U. eds. *Hematology 6th. ed.*, New York, McGraw-Hill, 141-152.
- Koenig., J.M., Baron, S., Luo, D., Benson, N.A. & Deisseroth, A.B. (1999) L-selectin expression enhances clonogenesis of CD34⁺ cord blood progenitors. *Pediatric Research*, **45**, 867-870.

- Koller, M.R., Bender, J.G., Papoutsakis, E.T. & Miller, W. M. (1992) Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood*, **80**, 403-411.
- Lanza, F., Moretti, S., Castagnari, B., Montanelli, F., Latorraca, A., Ferrari, L., Bardi, A., Dominici, M., Campioni, D., Dabusti, M., Piva, N., Lodi, G., Reverberi, R. & Castoldi, G. (1999) Assessment of distribution of CD34 epitope classes in fresh and cryopreserved peripheral blood progenitor cells and acute myeloid leukemic blasts. *Haematologica*, **84**, 969-977.
- Laver, J.H., Abboud, M.R., Kawashima, I., Leary, A.G., Ashman, L.K. & Ogawa, M. (1995) Characterization of c-kit expression by primitive hematopoietic progenitors in umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, **23**, 1515-1590.
- Lee, W.M.F. & Dang C.V. (2000). Control of cell growth and differentiation. In: Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P. eds. *Hematology - Basic Principles and Practice 3rd. ed.*, New York, Churchill Livingstone, 57-71.
- Li, K., Yau, F.W., Fok, T. F., So, K.W., Li, C. K. & Yuen, P.M.P. (2001) Haematopoietic stem and progenitor cells in human term and preterm neonatal blood. *Vox Sanguinis*, **80**, 162 –169.
- Lim, F.T., Scherjon, S.A., van Beckhoven, J.M., Brand, A., Kanhai, H.H., Hermans, J.M. & Falkenburg, J.H. (2000) Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **183**, 1144-1152.

- Liu, J., Li, K., Yuen, P.M., Fok, T.F., Yau, F.W., Yang, M. & Li, C.K. (1999) Ex vivo expansion of enriched CD34⁺ cells from neonatal blood in the presence of thrombopoietin, a comparison with cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplant*, **24**, 247-252.
- Ma, F., Wada, M., Yoshino, H., Ebihara, Y., Ishii, T., Manabe, A., Tanaka, R., Maekawa, T., Ito, M., Mugishima, H., Asano, S., Nakahata, T. & Tsuji, K. (2001) Development of human lymphohematopoietic stem and progenitor cells defined by expression of CD34 and CD81. *Blood*, **97**, 3755-3762
- Malangone, W., Belvedere, O., Astori, G., Adami, V., Donini, A., Falasca, E., Sala, P.G., Del Frate, G., Pittino, M., De Anna, D. & Degrassi, A. (2001) Increased content of CD34⁺CD38⁻ hematopoietic stem cells in the last collected umbilical cord blood. *Transplantation Proceedings*, **33**, 1766-1768.
- Matsunaga, T., Kato, T., Miyazaki, H. & Ogawa, M. (1998) Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6. *Blood*, **92**, 452-461.
- McEver, R.P. (2000). Cell Adhesion. In: Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P. eds. *Hematology - Basic Principles and Practice 3rd. ed.*, New York, Churchill Livingstone, 49-56.
- McNiece, I., Kubegov, D., Kerzic, P., Shpall, E.J. & Gross, S. (2000) Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. *Experimental Hematology*, **28**, 1181-1186.
- McNiece, I. & Briddell, R. (2001) *Ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Experimental Hematology*, **29**, 3-11.

- Meister, B., Totsch, M., Mayr, A., Widschwendter, M., Huter, O. & Sperl, W., (1994) Identification of CD34+ cord blood cells and their subpopulations in preterm and term neonates using three-color flow cytometry. *Biology of the Neonate*, **66**, 272-279.
- Mohle, R., Murea, S., Kirsch, M. & Haas, R. (1995) Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery. *Experimental Hematology*, **23**, 1535-42
- Morrison, S.J., Wright, D.E., Cheshier, S.H. & Weissman, I.L. (1997) Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Current Opinion in Immunology*, **9**, 216-221.
- Nardi, N.B. & Alfonso, Z.Z. (1999) The hematopoietic stroma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**, 601-609.
- Neu, S., Geiselhart, A., Kuci, S., Baur, F., Niethammer, D. & Handgretinger, R. (1996) Isolation and phenotypic characterization of CD117-positive cells. *Leukemia Research*, **20**, 963-971.
- Opie, T.M., Shields, L.E. & Andrews, R.G. (1998) Cell-surface antigen expression in early and term gestation fetal hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, **16**, 343-348.
- Papayannopoulou, T., Brice, M., Broudy, V.C. & Zsebo, K.M. (1991) Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood*, **78**, 1403-1412.
- Piacibello, W., Sanavio, F., Garetto, L., Severino, A., Bergandi, D., Ferrario, J., Fagioli, F., Berger, M. & Aglietta, M. (1997) Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood*, **89**, 2644-2653

- Piacibello, W., Sanavio, F., Severino, A., Dane, A., Gammaitoni, L., Fagioli, F., Perissinotto, E., Cavalloni, G., Kollet, O., Lapidot, T. & Aglietta, M. (1999) Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34⁺ cord blood cells after *ex vivo* expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*, **93**, 3736-3749
- Quesenberry, P.J. & Colvin, G.A. (2001) Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: Williams. Beutler, E. , Collier, B.S., Lichtman, M. A., Kipps, T.J. & Seligsohn, U. eds. *Hematology 6th. ed.*, New York, McGraw-Hill, 29-58.
- Ramsfjell, V., Borge, O.J., Cui, L. & Jacobsen, E.W. (1997) Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34⁺CD38⁻) human bone marrow progenitor cells. *The Journal of Immunology*, **158**, 5169-5177.
- Roy, V. & Verfaillie, C. (1999) Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: implications for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis. *Experimental Hematology*, **27**, 302-312.
- Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield, R.E., Adamson, J.W., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Taylor, P.E. & Stevens, C.E. (1995) Processing and cryopreservation of placental /umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, **92**, 10119-10122.
- Saeland, S., Duvert, V., Caux, C., Pandrau, D., Favre, C., Valle, A., Durand, I., Charbord, P., de Vries, J. & Banchereau, J. (1992) Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34⁺ hematopoietic cells. *Experimental Hematology*, **20**, 24-33.

- Sakabe, H., Ohmizono, Y., Tanimukai, S., Kimura, T., Mori, K.J., Abe, T. & Sonoda, Y. (1997) Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived CD34⁺ cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38 and c-kit antigens. *Stem Cells*, **15**, 73-81.
- Sakabe, H., Yahata, N., Kimura, T., Zeng, Z.Z., Minamiguchi, H., Kaneko, H., Mori, K.J., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J.H., Toyama, K., Abe, T. & Sonoda, Y. (1998) Human cord blood-derived primitive progenitors are enriched in CD34⁺c-kit⁻ cells: correlation between long-term culture-initiating cells and telomerase expression. *Leukemia*, **12**, 728-734
- Schipper, L.F., Brand, A., Reniers, N.C.M., Melief, C.J.M., Willemze, R. & Fibbe, W.E. (1998) Effects of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of primitive and mature haemopoietic progenitor cells in cord blood. *British journal of Haematology*, **101**, 425-435.
- Shah, A.J., Smogorzewska, E.M., Hannum, C. & Crooks, G. M. (1996) Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34⁺CD38⁻ cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood*, **87**, 3563-3570.
- Shields, L.E. & Andrews, R.G. (1998) Gestational age changes in circulating CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **178**, 931-937.
- Surbek, DV., Steinmann, C., Burk., M., Hahn, S., Tichelli, A. & Holzgreve, W. (2000) Developmental changes in adhesion molecule expressions in umbilical cord blood CD34 hematopoietic progenitor and stem cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **183**, 1152-1157.

- Tada, J., Omine, M., Suda, T. & Yamaguchi, N. (1999) A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells. *Blood*, **93**, 3723-3735.
- Tannirandom, Y., Uerpairojkit, B., Manotaya, S., Tanawattanacharoen, S., Danthamrongkul, V. & Charoenvidhya, D. (1999) Fetal hematology *Journal of the Medical Association Thailand* , **82**, 598-603.
- Thilaganathan, B., Nicolaides, K.H. & Morgan, G., (1994) Subpopulations of CD34-positive haemopoietic progenitors in fetal blood. *British Journal of Haematology*, **87**, 634-636
- Timeus, F., Crescenzo, N., Basso, G., Ramenghi, U., Saracco, P. & Gabutti V. (1998a) Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34⁺ cells. *Stem Cells*, **16**, 120-126.
- Timeus, F., Crescenzo, N., Marranca, D., Dall'Aglio, M., Fazio, L., Di Marco, M., Saracco, P., Ricotti, M. & Gabutti, V. (1998b) Cell adhesion molecules in cord blood hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant* , **22**, Suppl 1:S61-2
- Traycoff, C.M., Abboud, M.R., Laver, J., Brandt, J.E., Hoffman, R., Law, P., Ishizawa, L. & Srour, E.F. (1994) Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Experimental Hematology*, **22**, 215-222.
- Verfaillie, C.M. (2000). Anatomy and Physiology of Hematopoiesis. In: Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P. eds. *Hematology - Basic Principles and Practice 3rd. ed.*, New York, Churchill Livingstone, 139-154.

- Vettenranta, K., Piirto, I. & Saarinen-Pihkala, U.M. (1997) The effects of the mode of delivery on the lymphocyte composition of a placental/cord blood graft. *Journal of Hematotherapy*, **6**, 491-493
- Walka, M.M., Sonntag, J., Kage, A., Dudenhausen, J.W. & Obladen, M (1998) Complete blood counts from umbilical cords of healthy term newborns by two automated cytometers. *Acta Haematologica*, **100**, 167-73.
- Watt, S.M., Williamson, J., Geneviev, H., Fawcett, J., Simmons, D.L., Hatzfeld, A., Nesbitt, S.A. & Coombe, D.R. (1993) The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood*: **82**, 2649-2663.
- Williams, D. A. (2000). Stem Cell Model of Hematopoiesis. In: Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P. eds. *Hematology - Basic Principles and Practice 3rd. ed.*, New York, Churchill Livingstone, 126-138.
- Xiao, M., Oppenlander, B.K., Plunkett, J.M. & Dooley, D.C. (1999) Expression of Flt3 and c-kit during growth and maturation of human CD34+CD38- cells. *Experimental Hematology*, **27**, 916-927.
- Yamaguchi, M., Hirayama, F., Kanai, M., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., Sawada, K., Koike, T., Kuwabara, M., Ikeda, H. & Ikebuchi, K. (2001) Serum-free coculture for ex-vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Experimental Hematology*, **29**, 174-182.
- Yano, T., Katayama, Y., Sunami, K., Ishimaru, F., Shinagawa, K., Ikeda, K., Omoto, E., Niiya, K., & Harada, M. (2000) Granulocyte colony-stimulating factor and lineage-independent modulation of VLA-4 expression on circulating CD34+ cells. *International Journal of Hematology*, **71**, 328-333

Yap, C., Loh, M.T., Heng, K.K., Tan., P., Yu, S.L., Chan, S.H. & Ren, E.C. (2000) Variability in CD34+ cell counts in umbilical cord blood: implications for cord blood transplants. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, **50**, 258-259.

Yoshida, M., Tsuji, K., Ebihara, Y., Muraoka, K., Tanaka, R., Miyazaki, H. & Nakahata, T. (1997) Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum-free culture. *British Journal of Haematology*, **98**, 254-264.