

Formação *in vitro* de túbulos capilares a partir de células de sangue de cordão umbilical humano com perspectivas para aplicação terapêutica

In vitro formation of capillary tubules from human umbilical cord blood cells with perspectives for therapeutic application

Alexandra Cristina SENEGAGLIA¹, Paulo Roberto Slud BROFMAN¹, Carlos Alberto Mayora AITA¹, Bruno DALLAGIOVANNA², Carmen Lúcia Kuniyoshi REBELATTO¹, Paula HANSEN³, Fabiane BARCHIKI⁴, Marco Aurélio KRIEGER²

RBCCV 44205-1018

Resumo

Objetivo: As células progenitoras endoteliais (CPE), caracterizadas pelo marcador CD133+, contribuem para a neovascularização, e o aumento no número dessas células pode ser uma ferramenta terapêutica promissora. O sangue de cordão umbilical humano contém um número significativo de CPE, sugerindo a possibilidade do uso destas células para a revascularização de tecidos isquêmicos. O objetivo desse trabalho foi analisar a funcionalidade das células CD133+ diferenciadas *in vitro*.

Métodos: As células diferenciadas foram caracterizadas por citometria de fluxo; a expressão do mRNA de VEGF foi avaliada por RT-PCR e a funcionalidade, por meio de ensaios de formação de túbulos capilares.

Resultados: As células diferenciadas perderam os marcadores de CPE, mantiveram em níveis baixos os marcadores das linhagens hematopoética e monocíticas e aumentaram a expressão dos marcadores de células endoteliais adultas. As células diferenciadas apresentaram transcritos no mRNA de VEGF e mostraram-se capazes de formar túbulos capilares *in vitro*.

Conclusão: As células CD133+ diferenciadas *in vitro* em

células endoteliais demonstraram serem funcionalmente ativas, abrindo perspectiva para seu uso futuro em aplicações terapêuticas.

Descritores: Células endoteliais. Proliferação de células. Transplante de células-tronco de sangue do cordão umbilical. Neovascularização Fisiológica

Abstract

Objective: Endothelial progenitor cells (EPC) characterized by the CD133+ marker, contribute to the neovascularization. Increasing EPC number *in vitro* could be a promising therapeutic tool. Human umbilical cord blood maintains a significant number of EPC, suggesting the possibility to use these cells to induce the revascularization of ischemic tissues. The aim of this study was to analyze the *in vitro* function of differentiated CD133+ cells.

Methods: Cells were characterized by flow cytometry, VEGF mRNA expression was evaluated by the RT-PCR analysis and the functionally by essays of capillary tubes formation.

1. PhD - Núcleo de Cardiomioplastia Celular – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
2. PhD - Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ.
3. Graduada em Biologia, Doutoranda em Ciências da Saúde – Núcleo de Cardiomioplastia Celular - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
4. Graduada em Biologia - Núcleo de Cardiomioplastia Celular – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Endereço para correspondência:
Paulo Roberto Slud Brofman.
Rua Gumercindo Mares, 150 - casa 12 - Vista Alegre – Curitiba, PR –
Brasil - CEP 80810-220.
E-mail: paulo.brofman@pucpr.br

Trabalho realizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Artigo recebido em 30 de janeiro de 2008
Artigo aprovado em 23 de setembro de 2008

Results: Differentiated cells lost EPC markers, maintained low levels of markers for hematopoietic and monocytic cell lines and increased the expression of adult endothelial cell markers. Differentiated cells expressed VEGF mRNA and were capable to induce *in vitro* capillary tubules formation.

Conclusion: CD133+ cells differentiated into endothelial cells *in vitro* are functionally active initiating the possibility of their use in future therapeutic applications.

Descriptors: Endothelial cells. Cell proliferation. Cord blood stem cell transplantation. Neovascularization, physiologic.

INTRODUÇÃO

As investigações envolvendo células-tronco (CT) têm aumentado e apresentam resultados promissores para recuperar tecidos lesados, incluindo os cardíacos [1,2]. Porém, a falta de vasculatura suficiente que possibilite suprir rápida e adequadamente as células infundidas, com oxigênio e nutrientes, ainda é fator limitante para o sucesso da implantação da engenharia de tecidos e para o tratamento da isquemia tecidual [3].

Atualmente, há três tipos de estado-clínico que poderiam ser beneficiados pelo transplante das células progenitoras endoteliais (CPE): isquemia de membro inferior, isquemia do miocárdio e cicatriz pós-infarto. Estudos indicaram que a terapia celular, utilizando células expandidas *in vitro*, poderia promover a neovascularização de tecidos isquêmicos, mesmo quando aplicada como terapia única; isto é, sem a administração de fatores de crescimento [4-6].

Uma limitação crítica para a aplicação terapêutica das CPE, pós-natal, é seu baixo número na circulação. Foram realizadas várias pesquisas, com o intuito de otimizar a quantidade e a qualidade dessas células para poderem ser usadas clinicamente [4]. Devido às pequenas quantidades de CPE encontradas no sangue periférico, essas não estão disponíveis prontamente para utilização em ensaios clínicos. Experimentos que aumentem a quantidade de CPE funcionais, viabilizando esta terapia, podem se tornar importantes.

Após o infarto do miocárdio, a angiogênese natural é normalmente insuficiente para a grande demanda por oxigênio e nutrientes, bem como para prevenir a apoptose dos cardiomiócitos hipertrofiados e o remodelamento ventricular. Sendo assim, o aumento da perfusão do miocárdio infartado, para melhorar a circulação de oxigênio e de nutrientes, por meio da formação de novos vasos sanguíneos, tem o potencial de melhorar a função cardíaca [7].

Os mecanismos potenciais para as CPE induzirem a neovascularização incluem aumento do fornecimento das células endoteliais (CE) pela proliferação e diferenciação das CPE ou em um aumento no fornecimento de fatores de crescimento para ativar as CE residentes maduras. As CPE são CD133+ e, a maioria, co-expressam o CD34+, somente uma pequena porcentagem é CD34-. Assim, as células CD133+ representam um subgrupo das CT CD34+, e são

uma população ideal para gerar CE [8]. Sant'anna et al. [9] relataram que o aumento de capilares pela terapia gênica, utilizando injeção transmural de plasmídeo VEGF 165, tem presumível efeito benéfico na redução e na recuperação da área isquêmica.

Já foi demonstrado que o sangue de cordão umbilical humano (SCUH) contém células tronco mesenquimais [10] e um grande número de CPE [11], sugerindo a possibilidade de usar estas células para a revascularização de doenças isquêmicas. Até o presente, o transplante das CPE derivadas do SCUH ainda está em fase de experimentos com animais. A população exata de CPE específica (isoladas, expandidas ou diferenciadas), que deveria ser utilizada para transplante ainda não está claramente definida [12].

Nosso grupo implementou metodologias para diferenciar *in vitro* células CD133+, provenientes do SCUH, originando uma população de células semelhantes às endoteliais que foram avaliadas para comprovar se eram funcionalmente ativas e assim tornarem possível seu uso futuro para aplicações clínicas.

MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUCPR e no Instituto de Biologia Molecular do Paraná, com cinco amostras de sangue de cordão umbilical humano (SCUH), obtidas no Hospital e Maternidade Víctor Ferreira do Amaral - Curitiba/PR, de cinco parturientes que, após receberem todas as informações necessárias, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e concordaram em participar do estudo. O Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná aprovou este estudo sob nº 1366, e está registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob nº FR - 105806.

Critérios de Inclusão de Parturientes Doadoras de SCUH

- idade: 18 a 36 anos;
- pré-natal documentado com pelo menos duas consultas;
- parto normal ou cesáreo;
- tempo de bolsa rota no máximo até 18 horas;
- partos com pelo menos 32 semanas;
- peso fetal do recém-nascido acima de 1.500 gramas;
- parturientes sem comportamento de risco - uso de drogas,

promiscuidade sexual, doenças infectocontagiosas como: hepatite, doenças sexualmente transmissíveis, doença de Chagas e malária;

- parturientes sem doenças que possam interferir na vitalidade da placenta, como: *diabetes mellitus* e hipertensão arterial;
- parturientes que não façam uso de medicamentos antidepressivos, corticóides, ansiolíticos e hormônios de modo geral.

Purificação e expansão das células CD133+

As células CD133+ foram purificadas utilizando-se o conjunto de micropérolas acopladas ao anticorpo anti-CD133 (Miltenyi Biotec®), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a suspensão de células mononucleares (CM) foi centrifugada e ressuspendida em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Invitrogen Life Technologies®) suplementada com 5% de soro bovino fetal e 2 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As células foram então filtradas em um filtro com porosidade de 40 µm e centrifugadas por 10 minutos a 450 g e a concentração de células foi ajustada para, no máximo, 1 x 10⁸ células em 300 µL de PBS suplementado. Foram adicionados 100 µL de solução bloqueadora (Miltenyi Biotec®) e 100 µL do anticorpo anti-CD133 puro ligado às micropérolas magnéticas (Miltenyi Biotec®); o material foi homogeneizado e incubado por 30 minutos a 4° C.

As CPE resultantes da purificação das CM do SCUH foram plaqueadas em placas de 12 poços recobertos com fibronectina (BD - Bioscience®) com meio IMDM suplementado e fatores de crescimento beta-FGF (Invitrogen Life Technologies®), IGF-I (Sigma-Aldrich®) e VEGF (Sigma-Aldrich®). Após cinco dias de cultivo, trocou-se o meio pela primeira vez e, depois, a cada dois dias. Os cultivos foram mantidos em estufa, com 5% de tensão de CO₂ em atmosfera úmida. As células foram observadas diariamente em microscópio óptico invertido (Olympus IX70®) com relação a sua morfologia e proliferação. Quando as células alcançavam confluência de aproximadamente 80%, procedia-se à dissociação celular, utilizando a enzima Acutase. Primeiramente as células foram dissociadas das placas e replaqueadas em frascos de cultivo de 25 cm² (TPP®) e, posteriormente, de um frasco para dois, seguindo em progressão geométrica até 30 dias de cultivo.

Caracterização celular por citometria de fluxo

A caracterização, a quantificação e a análise da viabilidade das células CD133+ purificadas e diferenciadas foram realizadas pela técnica da citometria de fluxo com anticorpos específicos. As células purificadas foram analisadas logo após seu isolamento, enquanto que as células diferenciadas foram analisadas ao final de 30 dias, após a dissociação celular. A técnica utilizada foi realizada de acordo com Owens e Loken [13].

Resumidamente, a marcação foi realizada com 2 x 10⁵ células que foram incubadas com vários anticorpos conjugados a fluorocromos humanos. Isotipos idênticos aos anticorpos foram usados como controle. A aquisição das amostras foi realizada utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, EUA) e para as análises foi utilizado o programa FlowJo (FlowJo, EUA).

Ensaios para avaliação da funcionalidade das células expandidas e diferenciadas

Análise da expressão de transcritos do VEGF no mRNA por RT-PCR

O ácido ribonucléico (RNA) celular total das células CD133+ purificadas e das diferenciadas foi extraído utilizando o conjunto de reagentes RNeasy (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante e, em seguida, foi realizada a síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

Os transcritos que codificam para o VEGF foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase, com transcrição reversa (RT-PCR) utilizando-se o cDNA e o par de *primers* VEGF (F1 5CTACCTCCACCATGCCAAGTG3 R1 5TGCGCTGATAGAACATCCATGA3). O gliceraldeído-3-Fosfato-Desidrogenase (GAPDH) é um gene constitutivo e estável, expresso em altos níveis em quase todos os tecidos e células, e foi utilizado como controle interno. Os produtos de amplificação foram corados e analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% e utilizou-se o marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen Life Technologies®). As imagens foram capturadas pelo UV *with darkroom* (UVP Bioimaging Systems®), com o programa de análise da *Labworks*.

Ensaio de formação de túbulos capilares in vitro

Ao final de 30 dias de cultivo, as células CD133+ diferenciadas foram dissociadas e semeadas em placas de cultura de 24 poços, recobertas com 250 µL de Matrigel™ (BD-Biosciences®). A densidade celular foi de 20.000 células em 250 µL, de IMDM suplementado mais os fatores de crescimento. As células foram incubadas em estufa umidificada com tensão de 5%, de CO₂, e observadas com duas, seis, doze e vinte e quatro horas em microscópio invertido (Olympus IX 70), para verificar a formação de túbulos capilares, e, assim, comprovar sua capacidade funcional *in vitro*. Durante a análise das células ao microscópio, as imagens foram obtidas por meio do sistema de captura de imagens *spot insight* (Diagnostic).

RESULTADOS

Caracterização celular por citometria de fluxo

As células CD133+ purificadas foram avaliadas imunofenotipicamente depois do isolamento com as

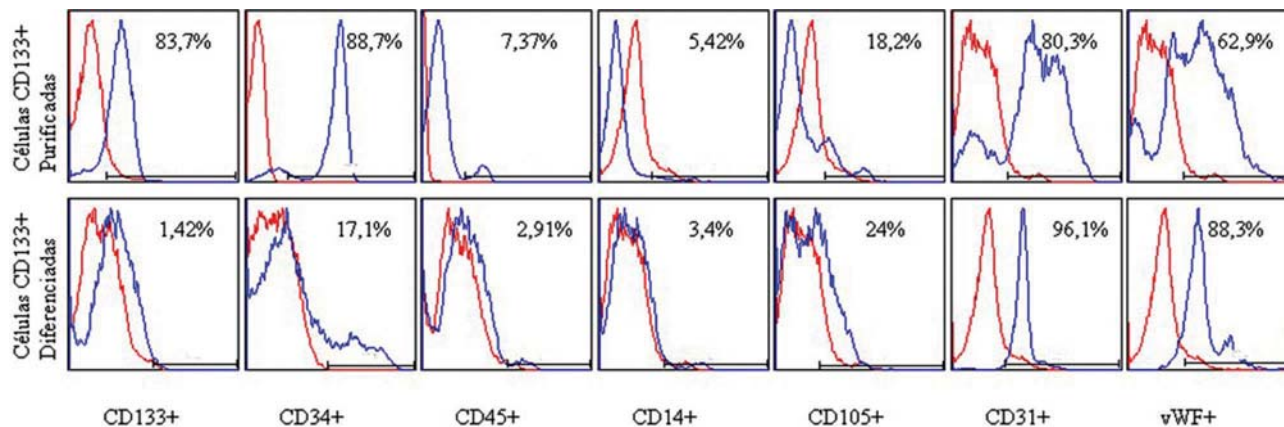


Fig. 1 - Caracterização fenotípica por citometria de fluxo de células CD133+ purificadas e diferenciadas. As células foram marcadas com anticorpos humanos fluorescentes anti-CD133, CD34, CD45, CD14, CD105, CD31 e vWF. Histogramas azuis identificam a porcentagem de células positivas para cada anticorpo e os histogramas vermelhos identificam os controles isotípicos (negativos)

micropérolas imunomagnéticas acopladas ao anticorpo anti-CD133 e as células diferenciadas após dissociação enzimática ao final do cultivo de 30 dias (resultados representados na Figura 1). Desta forma, foi possível caracterizar cada um desses tipos celulares independentemente.

Análise da expressão de transcritos do VEGF no mRNA por RT-PCR

A análise da expressão no mRNA do VEGF foi realizada nas células CD133+ purificadas e diferenciadas, por RT-PCR, em cinco amostras. Avaliou-se, como controle interno, a expressão de GAPDH, o qual apresentou bandas para as dez amostras analisadas. Nas células purificadas, não foi verificada a presença de transcritos no mRNA do VEGF. Observaram-se transcritos para o VEGF em todas as células diferenciadas testadas (Figura 2). Foi demonstrado que apenas as células após indução de diferenciação passaram a expressar transcritos no mRNA de VEGF.

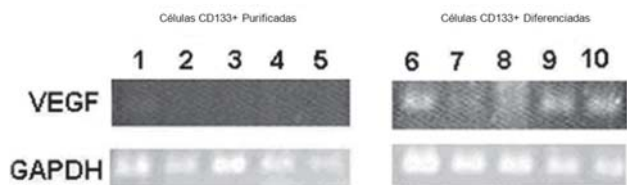


Fig. 2 - Gel de Agarose dos produtos de RT-PCR para o VEGF e GAPDH. Amostras 1 a 5: Células CD133+ purificadas; amostras 6 a 10: Células CD133+ diferenciadas

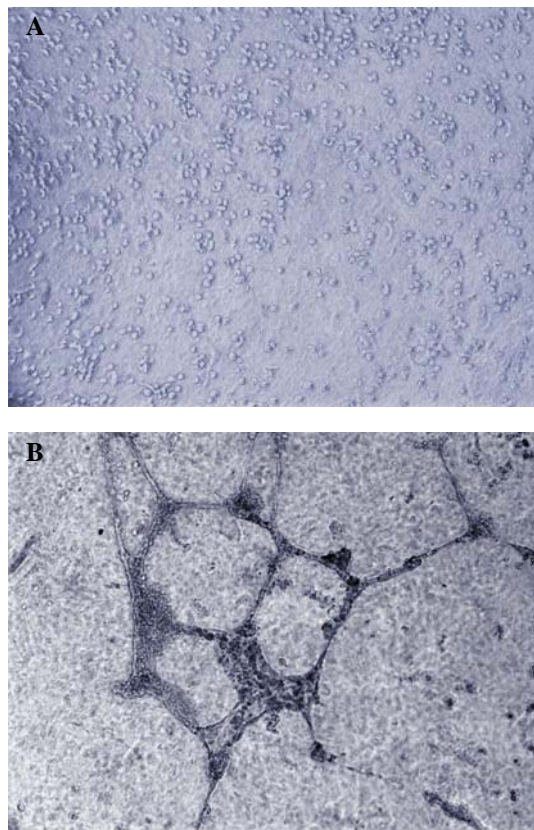


Fig. 3 - Ensaio de formação de túbulos capilares de células CD133+ diferenciadas in vitro. Fotomicrografia de: (A) células imediatamente após o plaqueamento apresentando morfologia arredondada e espalhadas pela superfície aleatoriamente (B) células após 24 horas apresentando estruturas semelhantes a túbulos capilares bem formadas

Ensaio de formação de túbulos capilares *in vitro*

Para avaliar a função das células CD133+ diferenciadas foi testada a capacidade, *in vitro*, dessas células formarem túbulos capilares quando plaqueadas sobre o Matrigel™. As células foram analisadas e fotografadas com duas, seis, doze e vinte e quatro horas após o plaqueamento. A análise das células demonstrou que, imediatamente após o plaqueamento, as células apresentavam morfologia arredondada e encontravam-se espalhadas pela superfície aleatoriamente, sem a formação de túbulos capilares (Figura 3A). E, após 24 horas, formaram estruturas semelhantes a túbulos capilares bem formadas (Figura 3B). Em todos os cinco experimentos, independentemente realizados, após 24 horas, as células diferenciadas formaram túbulos capilares *in vitro*.

DISCUSSÃO

Independentemente da fonte, CPE são difíceis de isolar porque representam uma população muito pequena, quando comparadas às células hematopoéticas. No sangue periférico, apenas 0,01% das CM são CPE [14]. Na MO, menos que 0,05% das células são CPE [15]. Em estudos prévios dos autores desse trabalho [16], conseguiu-se obter 0,64%, de CPE isoladas, a partir de CMS de SCUH, demonstrando que o SCUH pode ser uma melhor opção, como fonte de CPE, semelhante ao encontrado por Eggerman et al. [15], que demonstraram que o número de CPE de SCUH é superior ao encontrado no sangue periférico de adultos. O número exato de células necessário para induzir a neovascularização com sucesso ainda é uma incógnita [17]. A possibilidade de obter um número maior de células poderá abrir a perspectiva de que novos testes sejam realizados, para definir o número de células mais adequado para esse tipo de terapia.

As células tiveram seu fenótipo caracterizado por citometria de fluxo. Em torno de quatro semanas, quando as células alcançaram a confluência, as células CD133+ apresentaram-se semelhantes ao fenótipo típico de CE, tendo aumentada a positividade para marcadores característicos destas células, como o CD31 e o vWF [18]. Observou-se o decréscimo das células CD34+, porém algumas ainda continuaram presentes, em concordância com estudos de Gross e Herbrig [14], o mesmo aconteceu com o CD105. Verificou-se uma grande diminuição das células CD133, como descrito por Shmelkov et al. [19]. O número de células CD45 e CD14, respectivamente das linhagens hematopoéticas e monocíticas, não foi representativo.

A técnica da RT-PCR demonstrou claramente a presença de transcritos do VEGF no RNA mensageiro em todos os cinco experimentos independentemente realizados com células CD133+ diferenciadas. Sabe-se que o VEGF tem

função determinante na neovascularização por ser um potente mitógeno para as CE, promove a proliferação e migração destas células, participa do remodelamento da matriz extracelular, formação de túbulos capilares e rede vascular [20]. A verificação da presença de transcritos no mRNA do VEGF é um fator importante para confirmar que apenas as CPE diferenciadas *in vitro* possuem características que permitem afirmar que são células semelhantes às CE adultas.

O ensaio funcional, por meio da formação tubular em Matrigel™ mostrou que as células CD133+ diferenciadas apresentaram *in vitro* a formação de estruturas semelhantes a capilares, fornecendo evidências adicionais de que as células proliferaram e originaram células semelhantes às células endoteliais. A capacidade de migração celular é fundamental para formar novos vasos e capilares e é uma característica das CE que são capazes de uma organização que resultam na formação de estruturas tubulares tridimensionais *in vitro* [21].

Os resultados obtidos, a respeito da funcionalidade das células CD133+ diferenciadas, parecem estar em concordância com um estudo pré-clínico de Kawamoto et al. [22]. Nesse estudo, as CPE diferenciadas *in vitro* e infundidas na área isquêmica de ratos com infarto agudo do miocárdio foram detectadas, em estudos histológicos, pós-eutanásia, na área de neovascularização. Demonstrou-se que essas células não participam apenas da indução de fatores parácrinos, os quais estimulariam a proliferação de células presentes *in situ*, mas, sim, fisicamente da reconstituição da área lesada. Outro estudo, de Mukai et al. [23], que corrobora com os achados deste trabalho comprova que CPE cultivadas poderiam formar vasos sanguíneos. Diferente das CPE sem cultivo que promoveriam a angiogênese por meio da migração e proliferação de CE maduras; sugerindo assim que estas duas populações celulares teriam um papel diferente na neovascularização *in vivo*.

Segundo Rocha et al. [24], as células derivadas de SCUH são pouco imunogênicas, o que possibilitaria sua utilização em transplantes alogênicos. Há necessidade de estudos mais aprofundados para confirmar se as CPE diferenciadas *in vitro* possuem expressão de antígenos HLA ou não e qual a sua intensidade de expressão. Mesmo que essas células não apresentem antígenos HLA, outros testes na área da histocompatibilidade deverão ser realizados, com o objetivo de comprovar se as CPE diferenciadas *in vitro* despertam, ou não, a resposta imunológica alogênica. Em um estudo envolvendo células mesenquimais, Cho et al. [25] descrevem que as células mesenquimais alogênicas não desencadeiam uma resposta imunológica no tecido normal, porém em regiões de inflamação, na presença de citocinas como o IFN- γ pode haver rejeição. A partir dessas informações, será possível ter uma base mais sólida para

viabilizar a possível utilização de CPE diferenciadas do SCUH em ensaios clínicos.

O uso de CPE derivadas de SCUH pode servir como uma estratégia útil para estudar a natureza dessas células, antes de usá-las em ensaios clínicos. As CPE podem ser obtidas e expandidas do SCUH e, também, utilizadas para várias propostas, como a expansão *ex vivo* de células semelhantes às CE, para terapia celular e gênica ou, de acordo com Quirici et al. [26], em co-cultivos *in vitro*, abrindo novas perspectivas para o tratamento da cardiomiopatia isquêmica. Os resultados obtidos por Melero-Martin et al. [27] reafirmam o potencial terapêutico *in vivo* das CPE para formar redes vasculares que permitam a vascularização de órgãos e tecidos isquêmicos.

Com base nos ensaios realizados ficou demonstrado que as células CD133+ diferenciadas *in vitro* têm função semelhante à das CE, abrindo perspectiva para seu uso futuro em aplicações terapêuticas.

AGRADECIMENTOS

À Alessandra Melo Aguiar e a Patrícia Shigunov, pela realização das técnicas de biologia molecular; à Dra. Vivian Ferreira do Amaral, pela coordenação das coletas do sangue de cordão umbilical humano; à Márcia Olandoski, pela análise estatística; e ao Dr. Alejandro Correa, pela análise crítica do trabalho.

Esse trabalho foi financiado pelo Ministério de Saúde e Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CNPq) - 552233/2005-06.

REFERÊNCIAS

1. Schwartz Y, Kornowski R. Progenitor and embryonic stem cell transplantation for myocardial angiogenesis and functional restoration. *Eur Heart J*. 2003;24(5):404-11.
2. Scorsin M, Guarita-Souza LC. O transplante celular no tratamento da insuficiência cardíaca. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2001;16(3):183-6.
3. Fuchs S, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell Tissue Res*. 2006;326(1):79-92.
4. Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med*. 2004;8(4):488-97.
5. Dallan LAO, Gowdak LH, Lisboa LAF, Schettert I, Krieger JE, Cesar LAM, et al. Terapia celular associada à revascularização transmiocárdica laser como proposta no tratamento da angina refratária. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(1):43-52.
6. Almeida RMS. Carta ao editor: Terapia celular associada à revascularização transmiocárdica a laser: uma nova proposta no tratamento da angina refratária aos métodos terapêuticos. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(2):292-4.
7. Lee MS, Lill M, Makkar RR. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med*. 2004;5(2):82-98.
8. Chachques JC, Duarte F, Herreros J, Prosper F, Giamboni R, Julia P, et al. Cellular myogenic and angiogenic therapy for patients with cardiac or limb ischemia. *Basic Appl Myol*. 2003;13(1):29-37.
9. Sant'Anna RT, Kalil RAK, Moreno P, Anflor LC, Correa DLC, Ludwig R, et al. Gene therapy with VEGF 165 for angiogenesis in experimental acute myocardial infarction. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2003;18(2):142-7.
10. Kawasaki-Oyama RS, Braile DM, Caldas HC, Leal JCF, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC, et al. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008; 23(1):29-34.
11. Nieda M, Nicol A, Denning-Kendall P, Sweetenham J, Bradley B, Hows J. Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 1997;98(3):775-7.
12. Zhang L, Yang R, Han ZC. Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells: a promising method of therapeutic revascularisation. *Eur J Haematol*. 2006;76(1):1-8.
13. Owens M, Loken M. Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. Quality assurance for quantitative immunophenotyping. New York:Wiley-Liss;1995.
14. Gross P, Herbrig K. Role of endothelial progenitor cells in cardiovascular pathology. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2004;49:174-7.
15. Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin KM, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation *in vitro*: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiov Res* 2003;58(2):478-86.
16. Senegaglia AC, Brofman PRS, Aita CAM. Células progenitoras endoteliais de sangue de cordão umbilical humano: purificação, expansão e diferenciação [Tese de doutorado]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná;2007. 125p.
17. Zammaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells'. Renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(3):493-503.
18. Hoyer LW. The factor VIII complex: structure and function. *Blood*. 1981;58(1):1-13.

19. Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, et al. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood*. 2004;103(6):2055-61.
20. Shen BQ, Lee DY, Cortopassi KM, Damico LA, Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor KDR receptor signaling potentiates tumor necrosis factor-induced tissue factor expression in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5281-6.
21. Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol*. 1985;101(6):2330-4.
22. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103(5):634-47.
23. Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res*. 2008;314(3):430-40.
24. Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*. 2000;342(25):1846-54.
25. Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, Chi N, Goldman SN, Lo DP, et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood*. 2008;111(1):430-8.
26. Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*. 2001;115(1):186-94.
27. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. *In vivo* vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*. 2007; 109(11):4761-8.