

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

ARTHUR ANDRADE NERY

**Purificação de células tronco de
lipoaspirado humano por aptâmeros
de DNA, seguida da caracterização dos
fenótipos obtidos da diferenciação
neuronal.**

Tese corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

10/02/2014

Arthur Andrade Nery

**Purificação de células tronco de lipoaspirado humano
por aptâmeros de DNA, seguida da caracterização dos
fenótipos obtidos da diferenciação neuronal.**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

Co-Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2014

Arthur Andrade Nery

**Purificação de células tronco de lipoaspirado humano por aptâmeros
de DNA, seguida da caracterização dos fenótipos obtidos da
diferenciação neuronal.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

DEDICATÓRIAS

*Aos meus pais Sergio e Vera, por serem meu porto seguro e terem me apoiado em tudo que fiz,
sempre! Só sou o que sou por que vocês foram os primeiros a acreditar!*

Ao meu irmão, ao qual sempre serei grato pela amizade e admiração mútua.

À minha esposa, a melhor amiga e companheira que tive em minha vida! Laura, "You complete me! You had me at hello!"

À minha filha Angelina, que me re-ensinou tudo, transformar uma ideia, um amor e uma paixão...em realidade! Papai te ama filha! Sempre vou te amar!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por sempre terem me incentivado a seguir meus sonhos, por me auxiliarem sempre que tive dificuldades, por serem meu porto seguro onde podia pedir conselhos e apoio.

Agradeço ao meu pai por ser um exemplo de homem, profissional e pai. Um homem íntegro e verdadeiro, um profissional de sucesso sempre pautado pela ética e um pai sempre presente, amigo e companheiro. Gostaria de ser tão bom quanto você meu pai e poder orgulhá-lo sempre!

Agradeço minha mãe, por ser a pessoa que sempre me colocou no caminho certo, me incentivou, me apoiou. Mãe você sempre me ajudou muito e eu nunca vou me esquecer disso! Eu sempre vou ser o seu “rainho de sol”!

Meu irmão, sempre foi um exemplo para mim, ele sempre foi para as pessoas ao meu redor o meu irmão mais novo, mas eu sempre vi ele como um irmão da mesma idade, um cara em quem eu podia me espelhar e tinha a responsabilidade de sempre tentar orgulhar. Gú, você é pra mim tão importante que na minha falta eu só confiaria em você para criar minha filha! Beijos meu irmão!

Aos meus avós, graças a vocês eu sei de onde venho, sei de minhas raízes, entendo os valores que tanto admiro e preservo. A vocês, serei sempre grato por terem trabalhado e sofrido tanto e graças a vocês que eu pude chegar onde estou, obrigado por terem feito tudo o que fizeram por nossa família e por mim. À minha madrinha querida que sempre me tratou como um filho e me incentivou em tudo que fiz!

Agradeço à melhor amiga que eu poderia encontrar na minha vida, meu grande amor, minha esposa Laura. Ela me completa, me entende, me incentiva e me orgulha. Jamais poderia chegar onde cheguei sem sua cumplicidade e apoio, sem seu amor e seu caráter irretocável. Você me inspira a ser um homem melhor, uma marido melhor e agora um pai. Pai daquela que foi minha maior aventura, que vai durar pra sempre, pois agora sempre serei pai da minha amada filha Angelina. Essa nova aventura em minha vida só foi possível por sua causa...Laura, meu grande amor! Irei amá-la por toda a eternidade!!!

Agradeço à minha filha, Angelina, a maior revolução da minha vida, que quem diria, não seria científica, mas foi de muito amor, um amor que jamais imaginei sentir em minha vida. Desde o momento que vi você minha filha, saindo da barriga de sua mãe, despertou em mim um amor que não se contém dentro de mim, me desculpe, mas vou sempre te apertar, beijar e babar...é assim que esse amor todo vai extravasar! Angelina, você deu para mim um novo sentido para viver, trabalhar e amar! Papai te ama...sempre vou te amar!

Agradeço à família “da Silva Cardeal” que me adotou e sempre acreditou em mim, me deu apoio e ajudou. A Da. Cida e Sr. Clóvis por sempre serem pessoas que sempre acreditaram em mim, até mesmo para casar com a Laura! Rsr. À Heloisa Cardeal, a melhor cunhada que eu podia ter!!! Ao André e a Selma, pessoas que sempre considereei muito companheiras e sempre gostei de estar junto. Um beijo a todos vocês e obrigado por tudo!

Agradeço ao meu orientador e amigo Henning Ulrich, aprendi a respeitá-lo e admirá-lo, além de saber que nós dois crescemos muito durante esses mais de 10 anos de colaboração científica e parceria pessoal. Hoje sei que somos cientistas melhores e pessoas melhores porque convivemos um com o outro. Sei que mais do que um nome que sempre vai ajudar a me definir

como cientista, tenho um amigo por toda a vida. Obrigado chefe!

Agradeço ao meu co-orientador José Eduardo Krieger por ter sido uma porta aberta desde o começo de minhas ideias para o Doutorado e ter dado todo o suporte que ele pode oferecer para que o projeto fosse bem sucedido.

Agradeço a uma grata surpresa que me aconteceu como cientista, conhecer e dividir muitos experimento com o Vinícius Bassaneze, um amigo, uma pessoa para discutir experimentos e que sempre me ajudou muito em todos os passos da tese.

Quero mencionar amigos muito queridos que fiz nesses anos de laboratório, Henrique Martins, que sempre me ajudou e me guiou de maneira indireta desde que cheguei no laboratório no final de 2002. Meus amigos de graduação Cleber Trujillo e Rogério Lauria, ter tido a oportunidade de ter trabalhado, convivido e dado risadas ao lado de vocês fez toda a diferença na minha vida de ciência. Em especial ao Cleber, posso dizer que foi um prazer imenso, ter visto o desenvolvimento científico de alguém que sei terá grande sucesso na vida acadêmica. Valeu Binho! Valeu Roger!

Agradeço à Claudiana Lameu, uma pessoa que conheci desde minha primeira IC, lá no Butantã e que me ajudou muito na minha tese, foi um prazer conviver com alguém tão autêntica e competente nesses anos de laboratório.

Quero agradecer a grande amigas que fiz ao longo desses anos de laboratório de Neurociências, Isis, Talita e Priscila, pessoas sensacionais, obrigado pelas conversas e pelas risadas, vocês me ajudaram muito a desfazer os novelos de minhas ideias.

Obrigado a todos que compartilharam bancada, experimentos e reagentes durante esses anos, Paromita, Rodrigo, Camila, Arquimedes, Kátia MG, Kátia japa, Marcelo, Maynara, Tina Smuc, Marius, Raphael Marioni, Michelli, Angélica e Lara.

Queria aqui, agradecer a um grupo de amigos que trago comigo desde a minha infância, irmãos que ganhei durante minha vida, ao pessoal do meu antigo colégio, Gustavo, Dani e Rodolfo. Ao pessoal do Casablanca e do RPG, Denis, Will (+Dani e Fernandinha), Nando (+Andréia e Matheusinho), Danilo (+Carol e Eric), Daniel (+Dafne, Clarinha e Jorge).

Existe um outro grupo de amigos que a vida me apresentou, pessoas das quais sempre terei a maior admiração e respeito, grandes pesquisadores, biólogos e seres humanos irretocáveis, que me ensinaram, me ensinam e vão continuar me ensinando muito ainda...Desertores da Escada, devo muito a nossa amizade! Vocês são os melhores cientistas que eu tive o prazer de conhecer, tenho muito orgulho de ter desfrutado meus anos de USP ao lado de todos vocês. Obrigado por tudo!

Meus amigos foram a família que a vida me deu!

Um agradecimento especial a todos os outros professores e amigos de laboratórios onde sempre encontrei um ambiente amigável, reagentes para pegar emprestado e ideias que pudemos compartilhar, Prof. Hugo Armelin, Matheus Dias; Prof. Walter Colli e Profa. Maria Julia, Marinei, Celinha, Renata e Pablo; Profa. Mari Cleide Sogayar e especialmente ao Prof. Bayardo pelas conversas. Em especial, gostaria de agradecer ao professor Luis Roberto Britto, sem a sua ajuda grande parte desse projeto não teria sido possível, muito obrigado pela ajuda!

Finalmente, queria agradecer a todos os funcionários desse departamento incrível, desde o pessoal do departamento de química, da manutenção, da secretaria de pós graduação, da seção de convênios, da diretoria, do audiovisual, da expedição e da copa.

Agradeço à FAPESP e CNPq pelos apoios concedidos durante a realização desse projeto.

À minha filha **Angelina**,

“Te desejo um mundo livre de demônios e cheio de luz”

Carl Sagan,

O mundo assombrado por demônios: A ciência como uma vela na escuridão.

RESUMO

Nery, A.A. **PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DE LIPOASPIRADO HUMANO POR APTÂMEROS DE DNA, SEGUIDA DA CARACTERIZAÇÃO DOS FENÓTIPOS OBTIDOS DA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL.** 2013. 141p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Células tronco mesenquimais de tecido adiposo, são uma promissora ferramenta para aplicações clínicas em terapias celular e regenerativa, em vista da facilidade de sua extração e da maior quantidade de células por unidade de massa de tecido quando comparado a outras fontes clássicas de células mesenquimais como medula óssea. O protocolo clássico de extração e purificação dessas células, depende de sua adesão em plástico e xeno-materiais demandando muito tempo para ser utilizado por médicos para auxiliar pacientes em procedimentos de emergência. Estas células são capazes se diferenciar em diversos tipos celulares, o que as torna boas candidatas para terapia celular, embora sua capacidade de transdiferenciação para fenótipos neuronais seja ainda discutida.

Neste trabalho demonstramos um novo processo para isolar essas células na base de epitopos específicos expressos (assinatura molecular de superfície) utilizando aptâmeros como ligantes de alta afinidade para estes sítios. Aptâmeros, moléculas de DNA simples fita identificadas a partir de uma biblioteca combinatória de sequências de DNA simples-fita foram identificados por ciclos reiterativos de seleção *in vitro* (SELEX) utilizando células tronco do lipoaspirado como alvo. Dois aptâmeros isolados, denominados APT9 e APT11, foram capazes de identificar subpopulações (15,8 e 23,7% respectivamente) dentre as células tronco mesenquimais (classicamente CD29⁺/CD90⁺/CD45⁻) e separá-las usando nano-partículas magnéticas acopladas aos aptâmeros.

Além disso, seguindo uma indução para diferenciação neuronal, as células tronco mesenquimais passam a apresentar morfologia neuronal e apresentam expressão e atividade de diversos receptores de neurotransmissores, avaliados por PCR real-time e imageamento de variações da concentração de cálcio intracelular após estimulação com vários agonistas de receptores metabótrópicos e ionotrópicos. Ao longo da diferenciação, os níveis transcricionais de mRNA de receptores de cininas (B1 e B2), nicotínicos (alfa 7), muscarínicos (M1, M3 e M4), glutamatérgicos (AMPA2 e mGluR2), purinérgicos (P2Y1 e P2Y4) e GABAérgicos (GABA-A, subunidade 3) e da óxido nítrico sintase neural aumentaram quando comparados aos níveis das células não diferenciadas, enquanto que os níveis de expressão de outros receptores incluindo purinérgicos P2X1, P3X4, P2X7 e P2Y6 e muscarínico M5 diminuíram.

Os níveis de atividade das classes dos receptores estudados, por imageamento de variações da concentração de cálcio intrac, aumentaram para a maioria dos agonistas analisados durante a diferenciação neuronal com exceção para respostas induzidas por glutamato e NMDA. Células diferenciadas expressavam altos níveis de antígenos específicos de neurônios como β 3-tubulina, NF-H, NeuN e MAP-2 indicando uma diferenciação em fenótipo neuronal bem sucedida.

Desta maneira, esta tese, ao identificar aptâmeros, prove uma inovadora solução para médicos usarem as células tronco mesenquimais dentro de uma sala de cirurgia, através de um método que é capaz de purificar essas células em um tempo clínico viável, com pureza e sem contato com contaminantes. Além disso, nós mostramos aqui que com um protocolo como o proposto para diferenciação neuronal, nós poderíamos induzir essas células para se diferenciar em neurônios, através da ativação de fatores de transcrição específicos, levando às células tronco mesenquimais a serem possivelmente utilizadas em terapias celulares de reparo neuronal.

Palavras Chave: SELEX, Aptâmeros, Diferenciação neuronal, receptores de neurotransmissores, PCR real-time, Imageamento de Cálcio.

ABSTRACT

Nery, A.A. **HUMAN ADIPOSE MESECHYMAL STEM CELL SEPARATION BY DNA APTAMERS FOLLOWED BY THE CHARACTERIZATION OF THE OBTAINED PHENOTYPES FROM NEURONAL DIFFERENTIATION. 2013. 141p.** Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Adipose mesenchymal stem cells are promising tools for clinical applications in cellular and regeneration therapies, in view of easiness of extraction and higher amount of isolated stem cells per mass of tissue when compared to other classical mesenchymal stem cell sources including bone marrow. The classical protocol to extract and purify these cells, depending on plastic adherence and xeno-materials, is too time consuming to be used by physicians to help patients at emergency procedures. These cells are able to differentiate into various cell types, making them good candidates for cell therapy, however their capability for transdifferentiation into neural phenotypes is yet discussed.

Here we show a novel process to isolate these cells using their surface molecular signature and aptamers, ssDNA molecules identified through the SELEX technique, denominated APT9 and APT11 that are able to identify subpopulations (15,8 and 23,7% respectively) within the mesenchymal stem cells (classically CD29⁺/CD90⁺/CD45⁻) and separate them using magnetic nano-particles attached to the aptamers.

Moreover, following induction to neural differentiation, mesenchymal cells presents neuronal morphology and present expression and activity of several neurotransmitter receptors, as evaluated by real-time PCR and calcium imaging. During this process, mRNA transcription levels of bradykinin (B1 and B2), cholinergic (alpha 7), muscarinic (M1, M3 and M4), glutamatergic (AMPA2 and mGlu2), purinergic (P2Y1 and P2Y4) and GABAergic (GABA-A, subunit 3) receptors and neuronal nitric oxide synthase were augmented when compared to levels of undifferentiated cells, while the expression levels of other receptors including purinergic P2X1, P2X4, P2X7 and P2Y6 and muscarinic M5 receptors were down-regulated.

Activity levels of the studied receptor classes, as studied by calcium imaging, increased for most of the agonists analyzed during the neuronal differentiation with the exception for glutamate- and NMDA-induced receptor responses. Differentiated cells expressed high levels of neuron-specific antigens such as β 3-tubulin, NF-H, NeuN and MAP-2, indicating a successful differentiation into neuronal phenotypes.

This thesis, by identifying aptamers, provides a novel solution for physicians to use mesenchymal stem cells inside a surgery room, by using a method that are able to purify the cells in a clinical viable time, with purity and no contact with contaminats. Furthermore, we show here that with a protocol as provided for neuronal differentiation, we could induce these cells to differentiate into neurons, by activating specific transcription factors, making mesenchymal stem cells to possibly be used in neuronal repair cell therapies.

Key words: SELEX, Aptamers, Neuronal differentiation, neurotransmitter receptors, Real-time PCR, Calcium Imaging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURA 1: MODELO ESQUEMÁTICO DE POTÊNCIA DE CÉLULAS TRONCO, PLURI E MULTIPOTENTES.	22
FIGURA 2: ILUSTRAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO CELULAR DE LOCAIS DE EXTRAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA CONTENDO CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS COMO UMA DE SUAS FRAÇÕES CELULARES. FORAM AGRUPADOS OS OUTROS TIPOS CELULARES DA MEDULA ÓSSEA COM O TÍTULO DE “CÉLULAS SOMÁTICAS” A CRITÉRIO DE SIMPLIFICAR A VISUALIZAÇÃO.....	26
FIGURA 3: ILUSTRAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO CONTENDO CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS COMO UMA DE SUAS FRAÇÕES CELULARES. FORAM AGRUPADOS OS OUTROS TIPOS CELULARES DO LIPOASPIRADO COM O TÍTULO DE “CÉLULAS SOMÁTICAS” A CRITÉRIO DE SIMPLIFICAR A VISUALIZAÇÃO.....	26
FIGURA 4: ESQUEMA DE INTERAÇÕES ENTRE SINALIZAÇÃO POR CÁLCIO INDUZIDA POR NEUROTRANSMISSORES E OS PROCESSOS DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO. EXPLIQUE A FIGURA, TAMBÉM COMO FATORES DE TRANSCRIÇÃO SÃO ENVOLVIDAS.	31
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DO CONCEITO DE ASSINATURA MOLECULAR DE MEMBRANA. A, A IDEIA INICIAL DE QUE A MEMBRANA CELULAR NÃO É UMA SUPERFÍCIE ESTÉRIL. B, A PRESENÇA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE PODERIAM SER ALVOS PARA MOLÉCULAS QUE IDENTIFICASSEM AS CÉLULAS QUE CARREGAM EXCLUSIVAMENTE ESSE ALVO.....	35
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA SELEX, UTILIZANDO BIBLIOTECA DE DNA PARA IDENTIFICAÇÃO CELULAR (ADAPTADO DE ULRICH ET AL. 2006). PARA A PRODUÇÃO DE APTÂMEROS SIMPLES FITA UTILIZAMOS A INCORPORAÇÃO DE PRIMERS COM BIOTINA, FAZENDO COM QUE EM UMA ELETROFORESE DESNATURANTE DE DNA EM GEL DE POLIACRILAMIDA, A FITA COM AS BIOTINAS SE SEPARA DO DNA ALVO PARA AS PRÓXIMAS SELEÇÕES. O DNA A SER PURIFICADO E UTILIZADOS NOS CICLOS SUBSEQUENTES PODE CONTER FITC OU OUTRAS MOLÉCULAS FLUORESCENTES PARA TRANSFORMAR NOSSAS MOLÉCULAS EM MARCADORES PARA SEREM UTILIZADOS EM CITOMETRIA. AINDA É POSSÍVEL A ANEXAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE FOSFATO (PO ₄) NO TERMINAL 5´ DA FITA COMPLEMENTAR À MOLÉCULA, ASSIM ESSA FITA PODE SER DIGERIDA ENZIMATICAMENTE AUMENTANDO A EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO DA MOLÉCULA SIMPLES FITA PARA OBTERMOS UM PRODUTO DE ALTA QUALIDADE E BAIXO CUSTO DE PRODUÇÃO.	39
FIGURA 7: PADRONIZAÇÕES DAS ANÁLISES DE INFLUXO DE CÁLCIO PARA AS RESPOSTAS FUNCIONAIS. EM A, PODEMOS VERIFICAR A SOBREPOSIÇÃO DO FILTRO RABINO RGB PELO PROGRAMA IMAGE J, EM PONTOS DE FLUORESCÊNCIA BASAL, APÓS A APLICAÇÃO DO AGONISTA (E.G.: 100 µM ATP) (1), APÓS A APLICAÇÃO DO 5 µM IONÓFORO (2) E APÓS A APLICAÇÃO DE 10 mM EGTA (3) RESPECTIVAMENTE. OS EXPERIMENTOS DE PADRONIZAÇÃO FORAM REALIZADOS EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS DE TECIDO ADIPOSEO. OS PONTOS DE APLICAÇÃO, AS CINÉTICAS DAS RESPOSTAS E OS PATAMARES DE FLUORESCÊNCIA QUANTIFICADA PRODUZIDOS PELOS COMPOSTOS, SÃO DEMONSTRADOS EM B.....	49
FIGURA 8: MODELO ESQUEMÁTICO DE PROCESSOS QUE LEVAM AO AUMENTO DE ESTRINGÊNCIA DURANTE A REALIZAÇÃO DOS CICLOS DE SELEÇÃO. AUMENTO DO NÚMERO DE LAVAGENS, DIMINUIÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS, ASSIM COMO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPETIDOR INESPECÍFICO (NO CASO T-RNA DE LEVEDURA) LEVAM AO AUMENTO DA PRESSÃO DE SELEÇÃO DURANTE A SELEÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS APTÂMEROS, FAZENDO COM QUE CRIEMOS UM AMBIENTE MAIS RESTRINGENTE PARA SELECIONARMOS APENAS AQUELES COM MAIOR AFINIDADE.	54
FIGURA 9: MODELO ESQUEMÁTICO DE UM CICLO DUPLO REALIZADO COM O AUXÍLIO DA TÉCNICA BRASIL.	58
FIGURA 10: DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS EM FENÓTIPOS NEURAIS. A – CÉLULAS NÃO DIFERENCIADAS, B – CÉLULAS NO SEGUNDO DIA DE DIFERENCIAÇÃO, C – EXEMPLO DE PROLONGAMENTO DE NEURITO COMPREENDENDO DIVERSOS CAMPOS FOCAIS, D – DAPI, E – MARCAÇÃO SOBREPOSTA DE DAPI E	

NEuN, F – DAPI, G – MARCAÇÃO SOBREPOSTA DE DAPI E BIII-TUBULINA, H – DAPI, I – MARCAÇÃO SOBREPOSTA DAPI E MAP-2, J – DAPI, K – MARCAÇÃO SOBREPOSTA DAPI E NF-200.....	65
FIGURA 11: RESPONSABILIDADE A NEUROTRANSMISSORES DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSE DIFERENCIADAS, EM ESTADO NÃO DIFERENCIADO E DIFERENCIADO (SEGUNDO DIA DA DIFERENCIAÇÃO).	67
FIGURA 12: ANÁLISE DA RESPONSABILIDADE A NEUROTRANSMISSORES AO LONGO DO INÍCIO DA DIFERENCIAÇÃO. AO LONGO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO PODEMOS VERIFICAR UM AUMENTO DO INFLUXO DE CÁLCIO OCASIONADO PELA APLICAÇÃO DOS NEUROTRANSMISSORES. OS VALORES REPRESENTAM A CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE CÁLCIO MÁXIMA, PARA AO MENOS 12 CÉLULAS POR EXPERIMENTO, COM DOIS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA CADA NEUROTRANSMISSOR. UTILIZAMOS PARA OS EXPERIMENTOS UMA CONCENTRAÇÃO DE 1mM PARA TODOS OS AGONISTAS, CONSIDERANDO UMA CONCENTRAÇÃO QUE GARANTIRIA A ABERTURA COMPLETA DOS RECEPTORES EM QUESTÃO.....	68
FIGURA 13: PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES QUE APRESENTARAM AUMENTO DE EXPRESSÃO DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO NEURAL, O MÉTODO UTILIZADO ESTÁ DESCRITO NA SEÇÃO DE MATERIAIS E MÉTODOS (ITEM 3, SUBITEM 3.2).	72
FIGURA 14: PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES QUE APRESENTARAM DIMINUIÇÃO DE EXPRESSÃO DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO NEURAL, O MÉTODO UTILIZADO ESTÁ DESCRITO NA SEÇÃO DE MATERIAIS E MÉTODOS (ITEM 3, SUBITEM 3.2).	74
FIGURA 15: PERFIL DE EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO ESPECÍFICOS PARA NEURÔNIOS DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO NEURAL, O MÉTODO UTILIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO ESTÁ DESCRITO NA SEÇÃO DE MATERIAIS E MÉTODOS (ITEM 3, SUBITEM 3.2).	75
FIGURA 16: MARCAÇÃO DOS OLIGOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE SELEÇÃO DE APTÂMEROS. 1) PRIMER ANTI-SENSE COM 20 PARES DE BASE, O PROTOCOLO DE MARCAÇÃO DO PRIMER FOI FEITO DE ACORDO COM O FABRICANTE DA ENZIMA T4 QUINASE (FERMENTAS, THERMO SCIENTIFIC, LA JOLLA, CA), ATRAVÉS DA REAÇÃO DE TROCA DO FOSFATO (EXCHANGE REACTION) TENDO COMO BASE O [32P]- γ -dATP. 2) BIBLIOTECA SIMPLES FITA MARCADA, O PROTOCOLO DE MARCAÇÃO DO PRIMER FOI FEITO COM T4 KINASE ATRAVÉS DA REAÇÃO DE TROCA DO FOSFATO (FOWARD REACTION) TENDO COMO BASE O [32P]- γ -dATP. 3) EXTENSÃO DO PRIMER MARCADO COM BIBLIOTECA NÃO MARCADA, A EXTENSÃO DO PRIMER FOI APENAS UM ÚNICO CICLO DE EXTENSÃO A 42oC POR 5 MINUTOS, SEGUIDO DE UMA EXTENSÃO DE 72oC POR 10 MINUTOS. O TAMANHO ESPERADO PARA A DUPLA FITA É DE 80 PARES DE BASE. O EXPERIMENTO FOI FEITO EM GEL NÃO DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA 8%.	75
FIGURA 17: PURIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA POR ELUIÇÃO DA BANDA CORTADA DO GEL, VISUALIZADA POR “SHADOWING”. A ÁREA TRACEJADA INDICA O LOCAL DO CORTE DA BANDA QUE POSTERIORMENTE FOI ELUÍDA. GEL DE ACRILAMIDA 8% DESNATURANTE.....	76
FIGURA 18: A VERIFICAÇÃO DO PRIMER (1) DA PURIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA QUE SE MOSTROU SATISFATÓRIA (2), PORÉM O MESMO NÃO ACONTECEU COM A EXTENSÃO RADIOATIVA DO PRIMER, COM A BIBLIOTECA NÃO MARCADA (3), MOSTRANDO A NECESSIDADE DE PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR PARA PRODUÇÃO DE AMPLICONS COM TAMANHO ÚNICO.	77
FIGURA 19: PADRONIZAÇÃO DOS ADITIVOS PARA PCR, ONDE TEMOS 1M DE BETAÍNA PARA TODAS AS BANDAS COM ADIÇÕES CRESCENTES DE DMSO, SENDO 1) 2%, 2) 3%, 3) 4% E 4) 5%. GEL 8% DE ACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE. A BANDA DE 80PB REPRESENTA O TAMANHO DETERMINADO PARA A AMPLIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA E A DE 20PB O EXCESSO DE PRIMERS COLOCADO NA REAÇÃO DE TESTE.....	77
FIGURA 20: PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DAS FITAS COM PRIMER SENSE BIOTINILADO, SENDO 1) AMPLIFICAÇÃO SEM O TEMPLATE, A FIM DE MOSTRAR QUE NÃO TÍNHAMOS AMPLIFICAÇÃO ENTRE OS PRIMERS EM NOSSAS REAÇÕES, 2) AMPLIFICAÇÃO COM OS PRIMERS NORMAIS, 3) AMPLIFICAÇÃO USANDO O PRIMER SENSE BIOTINILADO. GEL 8% DE ACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE DE 7CM.	78
FIGURA 21: PADRONIZAÇÃO DOS CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO. A - AMPLIFICAÇÕES DE BIBLIOTECA NÃO RADIO MARCADOS, FEITOS EM INTERVALOS DE 5 CICLOS DE PCR (0, 5, 10, 15, 20, 25 E 30). B – O GRÁFICO MOSTRA A QUANTIFICAÇÃO DAS BANDAS PRESENTES NO GEL ONDE AS AMPLIFICAÇÕES NÃO FORAM RADIO MARCADAS, FEITAS A PARTIR DO SOFTWARE IMAGE] (U. S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, BETHESDA, MARYLAND,	

USA). C – O PAINEL DA DIREITA MOSTRA AS AMPLIFICAÇÕES DE BIBLIOTECA RADIO MARCADAS, FEITOS EM INTERVALOS DE 3 CICLOS (0, 3, 6, 9, 12, 15 E 18). D –QUANTIFICAÇÃO DAS BANDAS PRESENTES NO GEL ONDE AS AMPLIFICAÇÕES FORAM RADIO MARCADAS, FEITOS EM INTERVALOS DE 3 CICLOS PARA MOSTRAR A INCORPORAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS RADIO MARCADOS. OS EXPERIMENTOS FORAM ANALISADOS EM GEL 8% DE ACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE DE 7CM. 79

FIGURA 22: A – SEPARAÇÃO DAS FITAS POR GEL 8% DE ACRILAMIDA DESNATURANTE DE 21CM, ONDE TIVEMOS UMA SEPARAÇÃO SATISFATÓRIA DAS BANDAS PARA QUE A BANDA INFERIOR FOSSE ELUÍDA E PURIFICADA PARA A UTILIZAÇÃO NOS CICLOS DE SELEÇÃO. 1 – FITA BIOTINILADA, 2 – BIBLIOTECA SIMPLES FITA. B – CINTILAÇÃO DOS SOBRENADANTES ORIUNDOS DA ELUIÇÃO DAS BANDAS 1 E 2 DO GEL DE SEPARAÇÃO, APÓS A INCUBAÇÃO COM RESINA DE ESTREPTAVIDINA-AGAROSE. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO MÉDIO DE 3 EXPERIMENTOS. ... 80

FIGURA 23: AMPLIFICAÇÃO INICIAL DA BIBLIOTECA, ONDE ALGUMAS AMPLIFICAÇÕES FORAM FEITAS NA PRESENÇA DE $A^{32}P$ -dATP. MOSTRAMOS EM GEL DE ACRILAMIDA 8% A VISUALIZAÇÃO DE MASSA OBTIDA PARA CADA AMPLIFICAÇÃO (GEL À ESQUERDA), ASSIM COMO MARCAÇÃO RADIOATIVA DE CADA BANDA (GEL À DIREITA). AS AMPLIFICAÇÕES FORAM REALIZADAS ATRAVÉS DE 20 CICLOS CONTENDO OS NUCLEOTÍDEOS RADIO-MARCADOS, NOS LEVANDO A PRODUÇÃO DE BOA QUANTIDADE DE MASSA E COM MUITA MARCAÇÃO RADIOATIVA (A E D), AS AMPLIFICAÇÕES NÃO RADIO MARCADAS APRESENTAM MAIOR QUANTIDADE DE MATERIAL AMPLIFICADO, PORÉM COM NENHUMA MARCAÇÃO RADIOATIVA (B E E) E FINALMENTE A MISTURA DOS DOIS PCR NA PROPORÇÃO DE 1:5 DE PCR DE RADIO MARCADO PARA PCR NÃO RADIO MARCADO, APRESENTA MASSA E MARCAÇÃO RADIOATIVA PARA SEREM UTILIZADAS DURANTE AS SELEÇÕES(C E F). 81

FIGURA 24: A – DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE BIBLIOTECA MARCADA COM A^{32} -dATP LIGADA A CADA UM DOS PASSOS DURANTE O PRIMEIRO CICLO. NESTE CICLO DE SELEÇÃO DOS 8,4mM DE BIBLIOTECA QUE INICIARAM A SELEÇÃO CONTRA CÉLULAS DO PACIENTE 1, APENAS 20% SE MANTEVE LIGADO AO FINAL DO PROCESSO DE SELEÇÃO (ELIMINAÇÃO DE 80% DAS SEQUÊNCIAS) QUE TRANSCORREU CONTRA 5×10^5 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS EM UMA GARRAFA DE CULTURA DE 25cm². B – DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE BIBLIOTECA MARCADA COM A^{32} -dATP LIGADA A CADA UM DOS PASSOS DURANTE O SEGUNDO CICLO. NESTE CICLO DE SELEÇÃO CONTRA CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS DO PACIENTE 2, TÍNHAMOS 1,0µM DE BIBLIOTECA QUE FOI INCUBADO NA SELEÇÃO, ONDE APENAS 2,3% NÃO FOI RETIRADO DURANTE O PROCESSO (ELIMINAÇÃO DE 97,7% DAS SEQUÊNCIAS) QUE TRANSCORREU CONTRA 5×10^5 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS EM UMA GARRAFA DE CULTURA DE 25cm². C – DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE BIBLIOTECA MARCADA COM A^{32} -dATP LIGADA A CADA UM DOS PASSOS DURANTE O TERCEIRO CICLO. NESTE CICLO TIVEMOS A SELEÇÃO CONTRA CÉLULAS NÃO-TRONCO DO PACIENTE 3 ONDE TIVEMOS 1,2µM DE BIBLIOTECA INCUBADAS NA SELEÇÃO, 81,7% NÃO SE LIGOU ÀS CÉLULAS, A SELEÇÃO OCORREU CONTRA 5×10^9 CÉLULAS NÃO-TRONCO, ORIUNDAS DO SOBRENADANTE PÓS EXTRAÇÃO DE UMA PLACA DE CULTURA DE 100MM. D – DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE BIBLIOTECA MARCADA COM $A^{32}P$ -dATP LIGADA A CADA UM DOS PASSOS DURANTE O QUARTO CICLO. NESTE CICLO CADA TIVEMOS A SELEÇÃO CONTRA CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS DO PACIENTE 3. DE 1µM DE BIBLIOTECA QUE ENTRARAM NA SELEÇÃO, 63,5% NÃO SE LIGOU ÀS CÉLULAS E OBTIVEMOS UMA ALTA TAXA DE LIGAÇÃO NAS CÉLULAS, DE 36,5%. A SELEÇÃO OCORREU CONTRA 5×10^5 CÉLULAS MESENQUIMIAIS EM UMA GARRAFA DE CULTURA DE 25cm². E - DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE BIBLIOTECA MARCADA COM A^{32} -dATP LIGADA A CADA UM DOS PASSOS DURANTE O QUINTO CICLO. NESTE CICLO TIVEMOS A SELEÇÃO CONTRA CÉLULAS MESENQUIMIAIS DO PACIENTE 4. DE 1µM DE BIBLIOTECA QUE ENTRARAM NA SELEÇÃO, 97% NÃO SE LIGOU ÀS CÉLULAS E OBTIVEMOS 3% DE LIGAÇÃO ÀS CÉLULAS. A SELEÇÃO OCORREU CONTRA 5×10^5 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS EM UMA GARRAFA DE CULTURA DE 25cm², CONTENDO 100MG/ML DE T-RNA DE LEVEDURA COMO COMPETIDOR INESPECÍFICO. OS GRÁFICOS MOSTRA % CPM RELATIVO À SOLUÇÃO DE INCUBAÇÃO CONTENDO A BIBLIOTECA DE DNA RADIO MARCADA COM A^{32} -dATP, 1^a.LVG – VALOR REFERENTE AO SOBRENADANTE NA PRIMEIRA LAVAGEM COM TAMPÃO DE SELEÇÃO, AS LAVAGENS SUBSEQUENTES TAMBÉM SÃO REPRESENTADAS NOS GRÁFICOS, FENOL – VALOR REFERENTE AO %CPM RETIDO NA FASE ORGÂNICA DA EXTRAÇÃO POR FENOL, CLOROF – VALOR REFERENTE AO % CPM RETIDO NO CLOROFÓRMIO. 83

- FIGURA 25:** ESPECIFICIDADE DAS BIBLIOTECAS R10 E BR3 NA LIGAÇÃO EM CÉLULAS MESENQUIMIAIS ESTUDADOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA APTÂMEROS MARCADOS COM 6FAM (FITC). FORAM UTILIZADOS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS SEM MARCAÇÃO DE APTÂMEROS (CNT -) PARA VERIFICAÇÃO DE AUTOFLUORESCÊNCIA. HEMÁCIAS FORAM MARCADAS COM A BIBLIOTECA R10-6FAM PARA VERIFICAR A MARCAÇÃO INESPECÍFICA DA BIBLIOTECA EM UM TIPO CELULAR DIFERENTE DA QUE FOI ALVO DAS SELEÇÕES. POR FIM, AS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS FORAM MARCADAS TANTO COM AS BIBLIOTECAS R10 E BR3 ACOPLADAS A 6FAM PARA VERIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DAS MESMAS. 86
- FIGURA 26:** PADRONIZAÇÃO DAS MARCAÇÕES DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS EM CITOMETRIA DE FLUXO INCLUINDO EVENTOS NÃO CELULARES. NA PARTE DOS CONTROLES, FIZEMOS A SELEÇÃO DA REGIÃO COM OS EVENTOS CELULARES, LIVRES DE *DOUBLEts* E DE RESTOS CELULARES, COMO MEMBRANAS, ESSA REGIÃO (*GATING*) DENOMINAMOS “CÉLULAS” ONDE APROXIMADAMENTE 74% DOS EVENTOS CORRESPONDIAM A CÉLULAS (■). A PARTIR DA DETERMINAÇÃO DESSA REGIÃO AVALIAMOS A MARCAÇÃO DE NOSSAS CÉLULAS PARA CD29, CONSIDERANDO TODOS OS EVENTOS ATINGIMOS 90% DE MARCAÇÃO(■) E 74% DOS EVENTOS “CÉLULAS” SENDO MARCADOS (■). O MESMO SE SEGUIU PARA A MARCAÇÃO PARA CD90 OCORRENDO A MARCAÇÃO DE 75% TODOS OS EVENTOS (■) E DOS EVENTOS DENTRO DO *GATING* “CÉLULAS” DE 65% (■). PARA O TESTE DA MARCAÇÃO DAS CÉLULAS POR APTÂMEROS, PARA R12 E BR5 TIVEMOS A MARCAÇÃO DE 13% E 19%, RESPECTIVAMENTE, PARA TODOS OS EVENTOS (■) E 9% E 12%, RESPECTIVAMENTE, PARA POPULAÇÃO DE CÉLULAS (■). PARA A VERIFICAÇÃO POR ANÁLISE DE HISTOGRAMA AO INVÉS DO *DOT PLOT* ATINGIMOS A MARCAÇÃO DE 11,6% PARA R12 E 12,2% PARA BR5, EM AMBOS OS CASOS, DELIMITANDO UM SEGUNDO PICO DE MARCAÇÃO BEM EVIDENTE. OS ANTICORPOS SECUNDÁRIOS PARA CD29 E CD90, ESTAVAM ACOPLADOS A PE-Cy5 (FL3) E APC (FL4) RESPECTIVAMENTE, ENQUANTO OS APTÂMEROS ESTAVAM MARCADOS COM 6-FAM (FL1)..... 88
- FIGURA 27:** DEFINIÇÃO DA POPULAÇÃO DE APTÂMEROS LIGADOS À CTM. NO PAINEL DOS CONTROLES, FILTRAMOS OS EVENTOS QUE FICARAM DENTRO DO *GATE* DEFINIDO ANTERIORMENTE E MOSTRAMOS QUE ELIMINAMOS QUAISQUER TRAÇOS DE AUTOFLUORESCÊNCIA. OBSERVAMOS QUE 95% DOS EVENTOS SÃO CD29+ E 85% CD90+ APÓS A APLICAÇÃO DO *GATING*. NO PAINEL DAS BIBLIOTECAS R12 E BR5 OBSERVAMOS A MARCAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES QUE SE DESLOCAM NO EIXO DE FL1, SUGERINDO QUE NÃO FOI TODA A POPULAÇÃO DE CÉLULAS QUE GANHOU FLUORESCÊNCIA DE MANEIRA INDISCRIMINADA. ASSIM OS VALORES DE 12% E 20% PARA R12 E BR5, RESPECTIVAMENTE, DEMONSTRAM UMA MARCAÇÃO DE UM SUBGRUPO DE CÉLULAS DENTRO DA POPULAÇÃO ATÉ ENTÃO DENOMINADA CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS. OS ANTICORPOS SECUNDÁRIOS PARA CD29 E CD90, ESTAVAM ACOPLADOS A PE-Cy5 (FL3) E APC (FL4) RESPECTIVAMENTE, ENQUANTO OS APTÂMEROS ESTAVAM MARCADOS COM 6-FAM (FL1)..... 89
- FIGURA 28:** MARCAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMIAIS PARA CD29, CD90 E R12. PAINEL SUPERIOR MOSTRA A MARCAÇÃO DOS EVENTOS DENTRO DO *GATE* CÉLULAS E SUAS PORCENTAGENS DE MARCAÇÃO PARA CD29/CD90 E R12, ENQUANTO NO PAINEL INFERIOR MOSTRAMOS A MARCAÇÃO DE TODOS OS EVENTOS R12+ E SUAS PORCENTAGENS QUANDO CONSIDERADOS AS CO-MARCAÇÕES PARA R12/CD29, R12/CD90, R12/CD29/CD90 E APENAS R12. 90
- FIGURA 29:** MARCAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMIAIS PARA CD29, CD90 E BR5. PAINEL SUPERIOR MOSTRA A MARCAÇÃO DOS EVENTOS DENTRO DO *GATE* CÉLULAS E SUAS PORCENTAGENS DE MARCAÇÃO PARA CD29/CD90 E BR5, ENQUANTO NO PAINEL INFERIOR MOSTRAMOS A MARCAÇÃO DE TODOS OS EVENTOS BR5+ E SUAS PORCENTAGENS QUANDO CONSIDERADOS AS CO-MARCAÇÕES PARA BR5/CD29, BR5/CD90, BR5/CD29/CD90 E APENAS BR5..... 91
- FIGURA 30:** PROVA DE CONCEITO DA PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO POR SEPARAÇÃO MAGNÉTICA COM A UTILIZAÇÃO DE APTÂMEROS. É POSSÍVEL VERIFICAR QUE APÓS A PRIMEIRA TROCA DE MEIO, A FIM DE ELIMINAR AGLOMERADOS DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E RESTO CELULARES EM TODAS AS CULTURAS, A DIFERENÇA ENTRE AS CÉLULAS QUE PASSARAM PELA PURIFICAÇÃO COM APTÂMEROS É PRINCIPALMENTE DELIMITADA PELA PUREZA DA CULTURA (BR5 E R12) ENQUANTO QUE NAS CÉLULAS NÃO PROCESSADAS, MESMO APÓS A TROCA DE MEIO CONTINUA A CONTAMINAÇÃO POR ERITRÓCITOS E OUTROS POSSÍVEIS TIPOS CELULARES, SENDO QUE É POSSÍVEL

VISUALIZAR AO FUNDO A CULTURA CELULAR EM DESENVOLVIMENTO. AS TAXAS DE IMUNOMARCAÇÃO PARA CD29 E CD90 APÓS AS PURIFICAÇÕES, FORAM SEMELHANTES À POPULAÇÃO PURIFICADA PELA METODOLOGIA DE PROCESSAMENTO DO LIPOASPIRADO (DADO NÃO MOSTRADO)..... 93

FIGURA 31: PAINEL DE SEQUÊNCIAS PRESENTES NAS BIBLIOTECAS R12 E BR5. AS SEQUÊNCIAS EM NEGRITO SÃO AQUELAS QUE APRESENTARAM UM ÍNDICE DE PRESENÇA SIMILAR NAS DUAS BIBLIOTECAS ANALISADAS. NA COLUNA FREQUÊNCIA TOTAL DEMONSTRAMOS O NÚMERO DE VEZES QUE CADA MOLÉCULA APARECE TANTO EM R12 QUANTO EM BR5, EM SEGUIDA A CONSERVAÇÃO (%) É UM VALOR MÉDIO DA PORCENTAGEM DA VARIAÇÃO DA SEQUÊNCIA DENTRO DAS REPETIÇÕES ENCONTRADAS E FINALMENTE O ÍNDICE DE PRESENÇA QUE É O RESULTADO DA DIVISÃO ENTRE O NÚMERO DE VEZES QUE A SEQUÊNCIA APARECEU EM BR5 POR R12, ASSIM SE A MOLÉCULA APARECESSE DE MANEIRA SIMILAR EM AMBAS AS BIBLIOTECAS ELA TERIA UM ÍNDICE DE PRESENÇA PRÓXIMO DE 1, SENDO QUE CONSIDERAMOS APROXIMADAMENTE DE 0,5 A 1,5 PARA CRITÉRIOS DE INVESTIGAÇÃO. OS FRAGMENTOS DE DNA AQUI ANALISADOS, CORRESPONDEM ÀS REGIÕES RANDÔMICAS DAS BIBLIOTECAS R12 E BR5. 94

FIGURA 32: CLASSES DE SEQUÊNCIAS PRESENTES NAS BIBLIOTECAS R12 E BR5. AS SEQUÊNCIAS EM NEGRITO SÃO AQUELAS QUE APRESENTARAM UM ÍNDICE DE PRESENÇA PRÓXIMO NAS DUAS BIBLIOTECAS ANALISADAS. PERCEBE-SE QUE NO ALINHAMENTO POR SIMILARIDADE, 5 CLASSES DE APTÂMEROS FORAM IDENTIFICADAS (I, II, III, IV E V) E MAIS QUATRO SEQUÊNCIAS FICARAM EVIDENCIADAS, DUAS COM ÍNDICES DE PRESENÇA ENTRE 0,5 E 1,5 QUE NÃO TIVERAM SIMILARIDADE COM NENHUMA OUTRA (SEQ27 E SEQ28 RESPECTIVAMENTE) E DUAS SEQUÊNCIAS QUE TIVERAM O MAIOR E O MENOR ÍNDICE DE PRESENÇA, INDICANDO FORTE PRESENÇA EM BR5 E R12 RESPECTIVAMENTE, OU SEJA, ESSAS DUAS SEQUÊNCIAS APRESENTARAM, PROVAVELMENTE DEVIDO AO MÉTODO EMPREGADO NA SELEÇÃO, MAIOR FITNESS SELETIVO EM UMA METODOLOGIA DO QUE EM OUTRA, TORNANDO-SE ESSENCIAL INVESTIGARMOS ESSA PECULIARIDADE. EM AZUL É POSSÍVEL VERIFICAR QUAIS SEQUÊNCIAS FORAM SELECIONADAS PARA SER CARACTERIZADAS COM APTÂMEROS ISOLADOS, QUE POR SUA VEZ RECEBERAM OS NOMES DE APT1-32 DE ACORDO COM O PROCESSO DE ALINHAMENTO DESCRITO ACIMA..... 95

FIGURA 33: PADRONIZAÇÃO PARA EXPERIMENTOS COM APTÂMEROS ISOLADOS. PARA A REGIÃO “CÉLULAS” (■) APROXIMADAMENTE 95% DOS EVENTOS CORRESPONDIAM A CÉLULAS. A PARTIR DA DETERMINAÇÃO DESSA REGIÃO AVALIAMOS A MARCAÇÃO DE NOSSAS CÉLULAS PARA CD34, CONSIDERANDO TODOS OS EVENTOS (■) TIVEMOS 0,11% DOS EVENTOS SENDO MARCADOS. O MESMO SE SEGUIU PARA MARCAÇÃO PARA CD45, ONDE, CONSIDERANDO TODOS OS EVENTOS (■) TIVEMOS 0,10% DOS EVENTOS SENDO MARCADOS. PARA A MARCAÇÃO PARA CD90 ONDE TIVEMOS A VERIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DE TODOS OS EVENTOS (■) COM MARCAÇÃO DE 96,8% DOS EVENTOS, ASSIM COMO APENAS OS EVENTOS CELULARES (■) COM MARCAÇÃO DE 91,2% DOS EVENTOS. PARA O TESTE DA MARCAÇÃO DAS CÉLULAS POR APTÂMEROS TIVEMOS A MESMA CONSIDERAÇÃO ONDE PARA O “POOL” DE APTÂMEROS E O CONTROLE NEGATIVO CNT1, TIVEMOS A MARCAÇÃO DE 10% E 3,83%, RESPECTIVAMENTE, PARA TODOS OS EVENTOS (■) E 8,79% E 2,61%, RESPECTIVAMENTE, PARA OS EVENTOS CELULARES (■). PARA A VERIFICAÇÃO POR ANÁLISE DE HISTOGRAMA AO INVÉS DO DOT PLOT TIVEMOS A MARCAÇÃO DE 8,8% PARA O “POOL” DE APTÂMEROS E 2,6% PARA CNT1. 97

FIGURA 34: CARACTERIZAÇÃO POR CITOMETRIAS DE FLUXO COM APTÂMERO 1. PARA OS EXPERIMENTOS CONSIDERAMOS APENAS OS EVENTOS “CÉLULAS” (■). NO PAINEL CNT- SÃO OS EXPERIMENTOS DE DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE MARCAÇÃO SEM NENHUM ANTICORPO OU APTÂMERO, ASSIM COMO NO SEGUNDO PAINEL CD90/CD34/CD45 TEMOS A PADRONIZAÇÃO DE MARCAÇÃO PARA ESSES MARCADORES, ONDE CD34 (■) E CD45 (■) SÃO LOCALIZADOS NO MESMO PAINEL, TENDO COMO EIXO FL-2. ISSO OCORREU POIS O PAINEL COM EIXO FL-2 REPRESENTA 2 EXPERIMENTOS, UM COM MARCAÇÃO PARA CD34 E OUTRO COM MARCAÇÃO PARA CD45, EVITANDO REPETIÇÃO DE RESULTADOS NEGATIVOS NA FIGURA, UMA VEZ QUE AMBOS NÃO APRESENTAREM MARCAÇÃO PARA AS CTM. A MARCAÇÃO PARA CD90 (■) FOI DE 98,0%. ASSIM TIVEMOS CARACTERIZADAS CADA UMA DAS CLASSES DE APTÂMEROS ENCONTRADAS NOS SEQUENCIAMENTOS, ONDE PODERÍAMOS AVALIAR QUAIS DELAS TERIAM UMA MAIOR EFICIÊNCIA EM MARCAR SUBGRUPOS CELULARES. ASSIM TÍNHAMOS CÉLULAS QUE ACABARAM MARCADAS APENAS POR CD90 (■) E APTx/CD90 (■). 99

FIGURA 35: CARACTERIZAÇÃO POR CITOMETRIAS DE FLUXO COM APTÂMEROS ISOLADOS PARA OS EXPERIMENTOS CONSIDERAMOS APENAS OS EVENTOS “CÉLULAS” (■). NO PAINEL CNT- SÃO OS EXPERIMENTOS DE DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE MARCAÇÃO SEM NENHUM ANTICORPO OU APTÂMERO, ASSIM COMO NO SEGUNDO PAINEL CD90/CD34/CD45 TEMOS A PADRONIZAÇÃO DE MARCAÇÃO PARA ESSES MARCADORES, ONDE CD34 (■) E CD45 (■) SÃO LOCALIZADOS NO MESMO PAINEL, TENDO COMO EIXO FL-2, UMA VEZ QUE AMBOS NÃO APRESENTAREM MARCAÇÃO PARA AS CTM. A MARCAÇÃO PARA CD90 (■) FOI DE 98,0%. ASSIM TIVEMOS CARACTERIZADAS CADA UMA DAS CLASSES DE APTÂMEROS ENCONTRADAS NOS SEQUENCIAMENTOS, ONDE PODERÍAMOS AVALIAR QUAIS DELAS TERIAM UMA MAIOR EFICIÊNCIA EM MARCAR SUBGRUPOS CELULARES. ASSIM TÍNHAMOS CÉLULAS QUE ACABARAM MARCADAS APENAS POR CD90 (■) E APTx/CD90 (■).	102
FIGURA 36: MODELO ESQUEMÁTICO DO PROCESSO DE ATIVAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO ASSOCIADOS À DIFERENCIAÇÃO NEURONAL.	106
FIGURA 37: PROCESSO DE “DIFERENCIAÇÃO NEURONAL” DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE LIPOASPIRADO INDUZIDO POR NGF/BDNF.	107
FIGURA 38: MODELO DO PROCESSO DE SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA ATRAVÉS DA TÉCNICA SELEX. AO FINAL DE DIVERSOS CICLOS DE SELEÇÃO, QUE EXLUEM SEQUÊNCIAS COM BAIXA AFINIDADE PELO ALVO, CONSEGUIMOS AGRUPAR UMA POPULAÇÃO ANTES HETEROGÊNEA, EM POUCAS FAMÍLIAS OU CLASSES DE APTÂMEROS.	112
FIGURA 39: MODELO ESQUEMÁTICO DOS TIPOS DE ALVOS AOS QUAIS OS APTÂMEROS DAS BIBLIOTECAS R12 E BR5 PODEM SE LIGAR. DENTRO DESSAS BIBLIOTECAS DEVEMOS TER LIGANTES PARA ALVOS CONHECIDOS E DESCONHECIDOS, INCLUSIVE COMPARTILHADOS POR OUTROS TIPOS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS, DESSA FORMA, PODENDO VIABILIZAR-NOS ENCONTRAR MARCADORES MESENQUIMAIS MAIS AMPLOS, PARA OUTROS TIPOS CELULARES COMO MEDULA ÓSSEA.	117
FIGURA 40: MODELO ESQUEMÁTICO DE COMO AS SELEÇÕES PODEM EVOLUIR. NO EXEMPLO DEMONSTRADO, A SELEÇÃO EVOLUIRIA NA DIREÇÃO DE SEREM OBTIDOS MARCADORES MESENQUIMAIS MAIS AMPLOS, NO CASO ADICIONANDO CÉLULAS DE POLPA DENTÁRIA.	118
APÊNDICE 1: RESPOSTA DE CÉLULAS PLA HUMANAS NÃO DIFERENCIADAS PARA NEUROTRANSMISSORES. É POSSÍVEL VERIFICAR QUE OCORRE RESPOSTA DE CÉLULAS PARA BK, E PARA CCh E ATP POUCAS CÉLULAS PARECEM TER RESPOSTA RESPECTIVAMENTE (EMBORA A QUANTIFICAÇÃO PARA CCh TENHA SIDO MAIS EFETIVA). NENHUMA RESPOSTA FOI OBSERVADA PARA OS OUTROS AGONISTAS.	127
APÊNDICE 2: RESPOSTA DE CÉLULAS PLA HUMANAS NO PRIMEIRO DIA DE DIFERENCIAÇÃO PARA NEUROTRANSMISSORES. É POSSÍVEL VERIFICAR RESPOSTAS PARA ATP, BK E NICOTINA DE MANEIRA HOMOGÊNEA NA POPULAÇÃO, ENQUANTO PARA CCh A RESPOSTA SE MOSTROU POUCO REPRODUTÍVEL. NÃO HOUE RESPOSTA PARA OS OUTROS NEUROTRANSMISSORES.	128
APÊNDICE 3: RESPOSTA DE CÉLULAS PLA HUMANAS NO SEGUNDO DIA DE DIFERENCIAÇÃO PARA NEUROTRANSMISSORES. É POSSÍVEL VERIFICAR RESPOSTAS PARA ATP, BK E NICOTINA DE MANEIRA HOMOGÊNEA NA POPULAÇÃO, ENQUANTO PARA CCh A RESPOSTA SE MOSTROU MAIOR E MAIS REPRODUTÍVEL DO QUE NO DIA 1, PORÉM A RESPOSTA PARA NICOTINA QUE ATIVA OS RECEPTORES DA MESMA FAMÍLIA SE MOSTROU MUITO MAIS EFETIVA. NÃO HOUE RESPOSTA PARA OS OUTROS NEUROTRANSMISSORES.	129
APÊNDICE 4: TABELA DE PRIMERS UTILIZADOS PARA OS EXPERIMENTOS DE PCR EM TEMPO REAL.	130
APÊNDICE 5: ESTRUTURAS E SEQUÊNCIAS DA CLASSE I DE APTÂMEROS ENCONTRADOS NO SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS BR5 E R12.	131
APÊNDICE 6: ESTRUTURAS E SEQUÊNCIAS DA CLASSE II DE APTÂMEROS ENCONTRADOS NO SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS BR5 E R12.	132
APÊNDICE 7: ESTRUTURAS E SEQUÊNCIAS DA CLASSE III DE APTÂMEROS ENCONTRADOS NO SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS BR5 E R12.	133

APÊNDICE 8: ESTRUTURAS E SEQUÊNCIAS DA CLASSE IV DE APTÂMEROS ENCONTRADOS NO SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS BR5 E R12	134
APÊNDICE 9: ESTRUTURAS E SEQUÊNCIAS DA CLASSE V DE APTÂMEROS ENCONTRADOS NO SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS BR5 E R12.	135
APÊNDICE 10: ESTRUTURAS E SEQUÊNCIAS DE APTÂMEROS ENCONTRADOS NO SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS BR5 E R12 E QUE FORAM CONSIDERADOS PARA SÍNTESE PARA TESTES, INCLUINDO UMA SEQUÊNCIA CONTROLE COM A REGIÃO RANDÔMICA COMPOSTA POR UMA SEQUÊNCIA POLI-A.	136

TABELA 1: RESUMO DOS CICLOS DE SELEÇÃO 55

TABELA 2: DENOMINAÇÃO DOS GENES INVESTIGADOS 70

EQUAÇÃO 1: EQUAÇÃO PARA CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR. F_{MAX} É O VALOR DE FLUORESCÊNCIA OBTIDO COM A PRESENÇA DE IONÓFORO, F_{MIN} A FLUORESCÊNCIA OBTIDA NA PRESENÇA DE EGTA E F O VALOR DO PLATÔ DE FLUORESCÊNCIA OBTIDO COM O AGONISTA A SER ANALISADO. KD DE 450MM PARA FLUO-3AM.	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MSC – Mesenchymal Stem Cells	NGF – Nerve Growth Factor
PLA – Processed LipoAspirated Cells	BDNF – Brain Derived Neurothrophic Factor
CTM – Células Tronco Mesenquimais	bFGF – basic Fibroblast Growth Factor
SNC – Sistema Nervoso Central	dbcAMP – Dibutyryl-cAMP
nAChR – neuronal Acetylcholine Receptors	IBMX – 3-Isobutyl-1-methylxanthine
mAChR – muscarinic Acetylcholine Receptors	GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GABA – Gamma-Amino Butiric Acid	HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
NMDA – N-Metil D-Aspartato	PBS – Phosphate Buffer Saline
AMPA – α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	SFB – Soro Fetal Bovino
AMN – Assinatura Molecular de Membrana	MAP-2 – Microtubule Assembly Protein 2
SELEX – Systematic Enhancement of Ligands by EXponential enrichment	BRASIL – Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands
PCR – Polymerase Chain Reaction	NF-200 – Neuro Filament 200kDa
RT-PCR – Real-Time Polymerase Chain Reaction	GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein
DMSO – Dimetilsulfóxido	

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	18
SUMÁRIO	19
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 CÉLULAS TRONCO	21
1.1.1 CÉLULAS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSE	25
1.2 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL	27
1.2.1 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DAS CÉLULAS PLA	31
1.3 O CONCEITO: ASSINATURA MOLECULAR DE MEMBRANA (AMM)	33
1.4 A TÉCNICA SELEX	35
2 JUSTIFICATIVA	40
2.1 OBJETIVOS GERAIS	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSE.	42
3.1.1 EXTRAÇÃO E CULTURA.	42
3.1.2 PADRONIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS MESENQUIMAIS	43
3.2 RT PCR E PCR EM TEMPO REAL.	45
3.3 IMAGIAMENTO DE VARIAÇÕES DE CÁLCIO INTRACELULAR LIVRE ($[Ca^{2+}]_i$)	46
3.4 ENSAIOS DE IMUNOFLORESCÊNCIAS	49
3.5 SELEX	50
3.5.1 DESENVOLVIMENTO DE APTÂMEROS ATRAVÉS DA TÉCNICA SELEX.	50
3.5.2 A TÉCNICA BRASIL	56
3.5.3 SEQUENCIAMENTO E CLONAGEM.	58
3.5.4 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE APTÂMEROS	59
3.6 CITOMETRIA DE FLUXO PARA CÉLULAS TRONCO	60
3.7 PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO POR APTÂMEROS	61
4 RESULTADOS	63
4.1 DIFERENCIAÇÃO NEURAL	63
4.1.1 OBTENÇÃO DE MORFOLOGIA E FENÓTIPOS NEURAIS.	63
4.1.2 FUNCIONALIDADE E ATIVIDADE DE CANAIS DE NEUROTRANSMISSORES	66

<u>4.1.3</u>	MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE NEUROTRANSMISSORES AO LONGO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL.	68
4.2	SELEÇÃO DE APTÂMERO	75
<u>4.2.1</u>	PADRONIZAÇÕES	75
<u>4.2.2</u>	PROGRESSO DA SELEÇÃO	81
<u>4.2.3</u>	COMPROVAÇÃO DE LIGAÇÃO ÀS CTM ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.	85
<u>4.2.4</u>	QUANTIFICAÇÃO DA LIGAÇÃO APTÂMEROS FAM NAS CTM POR CITOMETRIA DE FLUXO.	87
<u>4.2.5</u>	PROVA DE CONCEITO DA PURIFICAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS POR APTÂMEROS DE DNA.	91
<u>4.2.6</u>	IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS BIBLIOTECAS BR5 E R12.	93
<u>4.2.7</u>	CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS ISOLADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.	95
5	DISCUSSÃO	103
5.1	DIFERENCIAÇÃO NEURONAL	103
5.2	SELEÇÃO DE APTÂMEROS PARA PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE LIPOASPIRADO	108
6	CONCLUSÕES	120
6.1	DIFERENCIAÇÃO NEURAL	120
6.2	SELEX	121
7	BIBLIOGRAFIA	122
	SÚMULA CURRICULAR – ARTHUR ANDRADE NERY	137

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULAS TRONCO

Células tronco são encontradas em todos os organismos multicelulares, sendo que elas podem se dividir por mitose e se diferenciar em diversos tipos celulares especializados, assim como se auto renovar para produzir mais células tronco. Desta forma, a definição clássica de uma célula tronco necessita que essa tenha duas propriedades fundamentais:

- Auto-renovação: a habilidade de passar por numerosos ciclos de divisão celular enquanto mantém o estado não diferenciado. Esse processo passa por divisões celulares simétricas, para gerar duas novas células tronco idênticas e divisões assimétricas, para geração de uma célula tronco e uma célula mais diferenciada (seja em um progenitor ou em um tipo final de célula). Também ocorrem diferenciações estocásticas que irão dar origem a duas células progenitoras, menos potentes do que a geração anterior, que por sua vez darão origem a células diferenciadas ou outras progenitoras.
- Potencia: a capacidade de se diferenciar em tipos celulares mais especializados (Figura 1). Em *strictu sensu*, isso requer que as células tronco sejam:
 - Totipotente: célula capaz de se diferenciar em tipos celulares embrionários e extraembrionários sendo capazes de produzir um organismo completo e viável. Encontramos esse tipo celular logo após a formação do zigoto ou células oriundas de suas divisões antes da fase de blástula.
 - Pluripotente: célula capaz de se diferenciar tipos celulares de todos os três folículos embrionários, ectoderme, mesoderme e endoderme.
 - Multipotente: célula que pode se diferenciar e alguns tipos celulares, todos do mesmo folículo embrionário de sua origem.

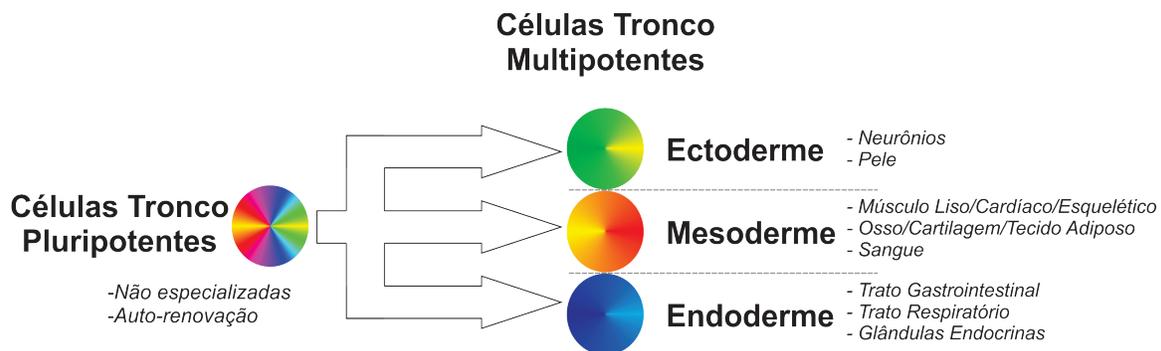


Figura 1: Modelo esquemático de potência de células tronco, pluri e multipotentes.

Em mamíferos, existem dois grandes grupos de células tronco: células tronco embrionárias (pluripotentes), os quais são isoladas da massa interna do blastocisto, e células tronco adultas (multipotentes), encontradas em diversos tecidos.

Em um embrião em desenvolvimento, as células tronco (embrionárias) podem se diferenciar em todos os tipos celulares especializados, mas também mantendo a renovação de órgãos regenerativos, como sangue, pele ou tecidos intestinais. Em organismos adultos, as células tronco e células progenitoras agem como o sistema de reparo do corpo, repovoando tecidos adultos que perdem suas células por morte, seja por processo natural ou por lesão.

O termo célula tronco, foi postulado para propósito científico inicialmente em 1908, pelo histologista russo Alexander Maksimov (1874-1928) no congresso da sociedade histológica em Berlim daquele ano, quando ele postulou a existência de células tronco hematopoiéticas deflagrando um grande número de pesquisas na área da hematologia, que culminou em 1968 com o primeiro transplante de medula óssea em humanos para combate de imunodeficiência severa combinada (SCID) e a descoberta dessas células em cordão umbilical em 1978.

Já em 1997 foi demonstrado que a leucemia se origina de células tronco hematopoiéticas, sendo essa a primeira evidência de células tronco em câncer.

Durante os anos 1960 em que uma série de trabalhos de Joseph Altman e Gopal Das, foram apresentadas evidências científicas de neurogênese em adultos, com atividade de células tronco no cérebro, porém por se contrapor ao dogma de Santiago Ramón y Cajal “*No new neurons*” essas descobertas foram largamente ignoradas até 1992 quando ocorreram as primeiras culturas de células tronco neurais *in vitro* na forma de neuroesferas, tendo o americano Fred H. Gage como um dos maiores expoentes nessa linha de pesquisa.

O termo “células tronco embrionárias” foi cunhado pela primeira vez em 1981 quando Martin Evans, Matthew Kaufman e Gail R. Martin, estabeleceram pela primeira vez células tronco oriundas da massa interna do blastocisto de camundongos, sendo atribuído a Gail R. Martin a origem do termo. Em 2007, Martin Evans viria a ser laureado com o Prêmio Nobel para Fisiologia ou Medicina por suas pesquisas nesse campo, juntamente com Mario Capecchi e Oliver Smithies.

A partir o estabelecimento das células tronco embrionárias, a pesquisa nessa área para terapias celulares, sejam adultas ou embrionárias, teve uma explosão devido às grandes possibilidades que essa tecnologia fornece para a medicina regenerativa e tratamento de doenças crônicas.

Mais recentemente, uma nova onda de pesquisas inovadoras foi deflagrada pela publicação de células tronco pluripotentes induzidas (iPS), em agosto de 2006 de camundongos e em novembro de 2007 de humanos pelo grupo de Shinya Yamanaka, onde através da introdução de 4 genes em fibroblastos (Oct3/4, Sox2, Klf4, e c-Myc), conhecidos informalmente como “Yamanaka fatores”, ocorre a reprogramação das células para um estado pluripotente, equivalente a células embrionárias.

Com esse novo modelo, Yamanaka revolucionou as pesquisas de células tronco, pois seu modelo não trazia as questões éticas associadas às células oriundas de embrião e tinham a mesma gama de possibilidades, isso acarretou, já em 2012 com o pesquisador sendo laureado com o Prêmio Nobel para Fisiologia ou Medicina. Porém algumas questões ainda continuavam não respondidas, como o potencial tumorigênico para o uso dessas células reprogramadas.

Com relação às células tronco adultas, desde 1968, quando McCulloch e Till mostraram a presença de células com auto-renovação em medula óssea de camundongos, células tronco adultas vêm sendo descobertas em diversos tecidos incluindo medula óssea, cordão umbilical, tecido adiposo e na polpa dentária.

Dentre essas células existem três principais fontes autólogas em humanos :

1. Medula óssea - o qual requer extração por perfuração óssea (tipicamente do fêmur ou da crista ilíaca);
2. Tecido adiposo - que requer extração por lipoaspiração, e
3. Sangue - que requer extração através de aferese sanguínea, ou um subtipo dessa modalidade onde o sangue de cordão umbilical é retirado do cordão após o nascimento.

Embora as células tronco embrionárias apresentem uma maior capacidade de se diferenciar em diversos tecidos, elas apresentam grandes limitações de uso em terapias celulares por dois grandes motivos, o primeiro por questões éticas, que apresentam variações de país para país, mas que invariavelmente estão presentes, e o segundo motivo, é a possibilidade de rejeição de terapias com eficácia ainda pouco demonstrada, uma vez que as células são de outro doador e as implicações disso na qualidade de vida do paciente ao passar a tomar imunossuppressores para resultados pouco demonstrados.

Dessa forma, as células tronco adultas vêm sendo alvo de grande atenção das agências de fomento, institutos de pesquisa, universidades e empresas por terem um risco de rejeição praticamente nulo, acelerando em muito a possibilidade de sua utilização em aplicações clínicas.

Neste caso restaria desenvolver protocolos que debelassem as limitações impostas por sua multipotência para obter um modelo adequado de células para utilizar nas mais diversas necessidades médicas de terapia (Ishikawa et al. 2012).

1.1.1 CÉLULAS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO

Células tronco adultas têm sido isoladas de diversos tecidos, desde o tecido nervoso, retina, medula óssea e mais recentemente o tecido adiposo e polpa dentária (Zuk et al. 2001, Majka et al. 2005; Sakagushi et al. 2005, Bojic et al. 2014, Fuentes and Kearns-Jonker 2013, Cheuk 2013, Ahmed and Hincke 2014). Recentes trabalhos mostraram a utilidade das células mesenquimais para a engenharia de tecidos e no controle de algumas doenças, sendo até então as células tronco mesenquimais de medula óssea (MSC) a principal fonte para células com essa finalidade (Muñoz-Eliáz et al. 2001, Moroni and Fornasari 2013, Strioga et al. 2012) (Figura 2).

Essas células se mostraram capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, incluindo osso, cartilagem, gordura e mais recentemente em linhagens de origem não mesodermis, como células neuronais (Ashjian et al. 2003).

Nesta direção, outra linhagem de célula tronco adulta, de origem mesodermal portanto mesenquimal, foi recentemente identificada, as células de lipoaspirado humano (PLA) (Figura 3). Essas células demonstraram a capacidade de se diferenciar em tecidos adipogênicos, condrogênicos, miogênicos, osteogênicos e assim como as MSC, se diferenciam em células neuronais apresentando características morfológicas de neurônios e/ou glia (Zuk et al. 2001; Zuk et al. 2002; Strem *et al.*, 2005).

As MSC apresentam diversas propriedades que sugerem grande potencial para utilização em terapias celulares para diversas doenças, porém possuem limitações em seu potencial tanto para extração quanto para a sua utilização, uma vez que o número de células tronco por unidade de massa de medula é muito baixa comparada a outras fontes de células como o lipoaspirado, assim como o volume de tecido a ser extraído (Zuk *et al.*, 2001).

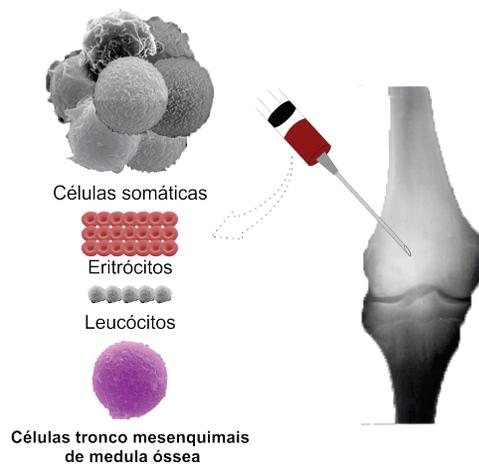


Figura 2: Ilustração sobre a composição celular de locais de extração da medula óssea contendo células tronco mesenquimais como uma de suas frações celulares. Foram agrupados os outros tipos celulares da medula óssea com o título de “células somáticas” a critério de simplificar a visualização.

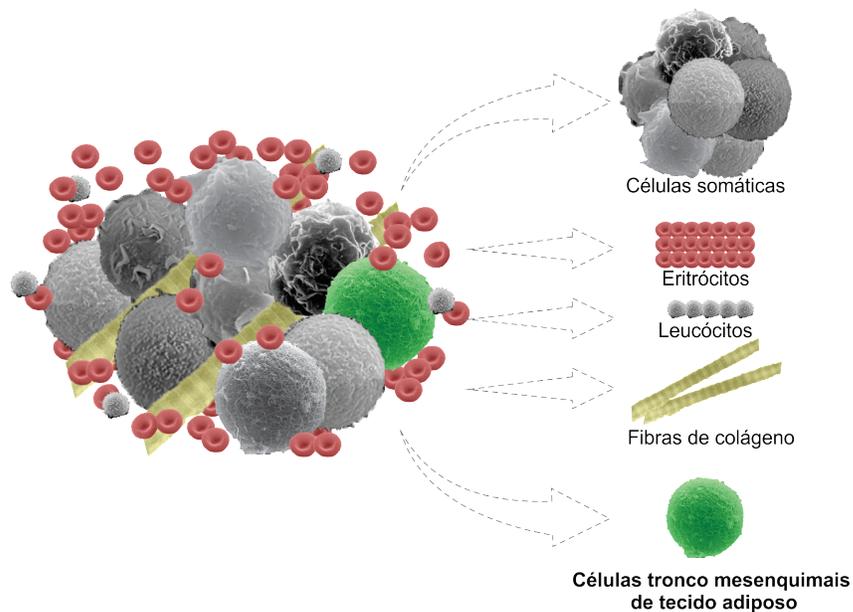


Figura 3: Ilustração sobre a composição do tecido adiposo contendo células tronco mesenquimais como uma de suas frações celulares. Foram agrupados os outros tipos celulares do lipoaspirado com o título de “células somáticas” a critério de simplificar a visualização.

Em contrapartida, as células PLA apresentam um grande número de células tronco por unidade de massa de tecido. Estas células podem ser enzimaticamente digeridas e isoladas a partir do tecido adiposo presente na porção sobrenadante de lipoaspirados (onde se encontram apenas as porções celulares compostas por adipócitos e matriz de sustentação do tecido) e assim separadas dos adipócitos por

centrifugação.

Porém, é comum a contaminação por outros tipos celulares na cultura das células tronco oriundas de lipoaspirado após a separação, o que não indicaria o uso dessas células para o emprego imediato em usos clínicos, faltando assim uma ferramenta para facilitar essa utilização.

Se de fato ocorrer a facilitação para seu emprego, o tecido adiposo passaria então, a ser um eficiente candidato para a obtenção de células tronco, pois a partir de uma lipoaspiração processada, obtemos um número maior de células quando comparado às extrações de medula óssea, que poderiam ser purificadas e mantidas *in vitro* por extensos períodos (Aziz *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 2006; Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002, Salibian *et al.* 2013, Bibber *et al.* 2013, Ahmed and Hincke 2014).

Contudo, a aplicação dessas células em procedimentos clínicos dependeria de processos de extração rápidos, eficientes e baratos que garantisse a pureza das células extraídas, sendo assim necessário endereçarmos essa limitação.

1.2 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

A diferenciação neuronal é um processo que se refere aos processos que geram, modelam e formam o sistema nervoso, desde seus estágios mais iniciais da embriogênese, formando neurônios e glias a partir do tubo neural, até os últimos momentos de vida ainda tendo parte da plasticidade neuronal em atividade.

Durante esse processo, o desenvolvimento do sistema nervoso leva a formação de trilhões de conexões entre as crescentes células neuronais e seus alvos de inervação. Os neurônios dentro do sistema nervoso central (SNC) se conectam com suas células adjacentes por sinapses, que são mediadas por canais iônicos voltagem dependentes ou dependentes de ligantes de neurotransmissores.

Os processos de diferenciação neuronal são altamente coordenados, requerendo a expressão específica de receptores de ligantes em determinados estágios da diferenciação neuronal (Ulrich & Majumder, 2006), assim como outras proteínas específicas de neurônios, como proteínas de citoesqueleto, proteínas

nucleares, ocorre a desmetilação e ativação de genes e fatores de transcrição específico assim como silenciamento de genes não relacionados ao funcionamento de células neuronais.

Esses processos finamente orquestrados conduzem uma célula indiferenciada através de uma transformação fenotípica e funcional até atingir o ápice de sua diferenciação quando o neurônio recém formado passa não apenas a receber informações através de neurotransmissores, conduzir essa informação em forma de potencial de ação e finalmente transmiti-la através da liberação de um coquetel de novos neurotransmissores.

Durante a maturação do neurônio funcional as células aumentam a expressão de proteínas específicas para neurônios e sinapses. Deisseroth et al. 2004, notou que a indução gênica e a expressão de proteínas funcionais de receptores de neuropeptídeos e neurotransmissores, além de canais iônicos ativados por alteração do potencial de membrana e a taxa de síntese e liberação de neurotransmissores são reguladas ao longo do processo da diferenciação. Estes dados também foram verificados em estudos com animais (Cameron et al., 1998; Nguyen et al., 2001).

Durante a indução da diferenciação neuronal, podem ser definido programas transcricionais para um determinado grupo de genes, entre eles, genes que codificam canais iônicos, sendo estes regulados por fatores extrínsecos e intrínsecos, produzindo assim, padrões de influxo de íons. O cálcio por exemplo, induz, mediado por proteínas cálcio-dependente, um novo programa de expressão gênica para o próximo estágio de diferenciação (Spitzer et al., 2002; Trujillo et al. 2009) (Figura 4)

Desta maneira a atividade de diversos íons, entre eles o cálcio, colaborariam para determinar e atingir o fenótipo final do neurônio em desenvolvimento a partir da expressão gênica induzida por canais iônicos, receptores e seus ligantes.

Nos trabalhos anteriores do laboratório a diferenciação foi abordada em modelos de células *in vitro* de carcinoma embrionário murino (P19) e feocromocitoma de rato (PC12) que representam estágios de células tronco embrionárias e progenitoras neuronais, respectivamente.

Em cada um desses trabalhos foi investigado principalmente a interface célula com o meio extracelular e como essa interação pode nortear a diferenciação neuronal. A modulação desses efeitos extrínsecos às células foi foco através do estudos de receptores de neurotransmissores e como isso poderia modular o processo de diferenciação, através de agonistas e antagonistas modulavam a diferenciação neuronal.

Diversas famílias de receptores passaram a ser estudadas, com ênfase em 3 delas, a família de receptores neuronais nicotínicos, tanto seus subtipos canais iônicos como os receptores neuronais de acetilcolina (nAChR) como seus subtipos metabotrópicos, os receptores muscarínicos (mAChR). Além dessa família, os receptores de purinas, subdivididos em 2 tipos, os tipos canais iônicos (P2X) e os metabotrópicos (P2Y), além da família dos receptores de cininas (B2 e B1), ambos receptores metabotrópicos (Shen et al 2013, Resende and Adhikari 2009, Glaser et al 2013, Martins et al. 2008).

Em um trabalhos desenvolvidos pelo nosso laboratório foi verificada a expressão de receptores nicotínicos, que apresentaram uma modulação determinada de acordo com o estágio do processo de diferenciação neuronal *in vitro* (Nery et al 2010). No caso específico das células PC12, verificou-se que logo após o estímulo inicial para a diferenciação neuronal, os níveis de expressão gênica da subunidade $\alpha 7$ dos nAChR aumentam três vezes no início do processo, retornando a níveis basais quando as células fizeram a maturação neuronal.

Isso passou a evidenciar o aparecimento de janelas que se abrem e fecham, em períodos bastante específicos durante o processo de diferenciação, mediadas por receptores específicos, nesse caso a subunidade $\alpha 7$ dos nAChR, que é notoriamente reconhecida por ter uma permeabilidade a cálcio 20x maior do que para outros íons (Nery et al. 2010)

Assim esses receptor teria uma importância pontual para a modulação do processo como um todo, sendo que desde sua expressão até sua funcionalidade, a janela de oportunidades de modulação da diferenciação mediada por essa subunidade teria de ser medida e entendida para ser utilizada

posteriormente.

Com isso passamos a avaliar a atividade do receptor homomérico composto de subunidades $\alpha 7$, sendo que sua atividade, relativa a seu aumento de expressão, pode ser verificada no segundo dia de diferenciação neuronal, por experimentos de whole-cell recording utilizando inibidores específicos para esse receptor. A atividade específica da subunidade $\alpha 7$ aumentou duas vezes comparada com a atividade desse receptor observado nos outros dias da diferenciação (Nery *et al.*, 2010), demonstrando a possibilidade que o estudo desses receptores em processos complexos, como a diferenciação neuronal, deflagram para intervenções e modulações do processo como um todo.

Não obstante, com o progresso da diferenciação das células P19, houve alteração da expressão e funcionalidade de receptores tais como o receptor P2X4, as subunidades de receptores nicotínicos $\alpha 2, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7$ e $\beta 4$ e aumento da atividade de receptores muscarínicos (Resende et al 2008, Resende et al 2007) .

A expressão direcionada de neurotransmissores e seus receptores durante a diferenciação neuronal é um processo chave para a formação das redes neuronais, sejam excitatórias ou inibitórias, como exemplo temos que, uma vez objetivando a possível utilização clínica teríamos de diferenciar células em circuitarias próprias para cada região aonde as células forem implantadas.

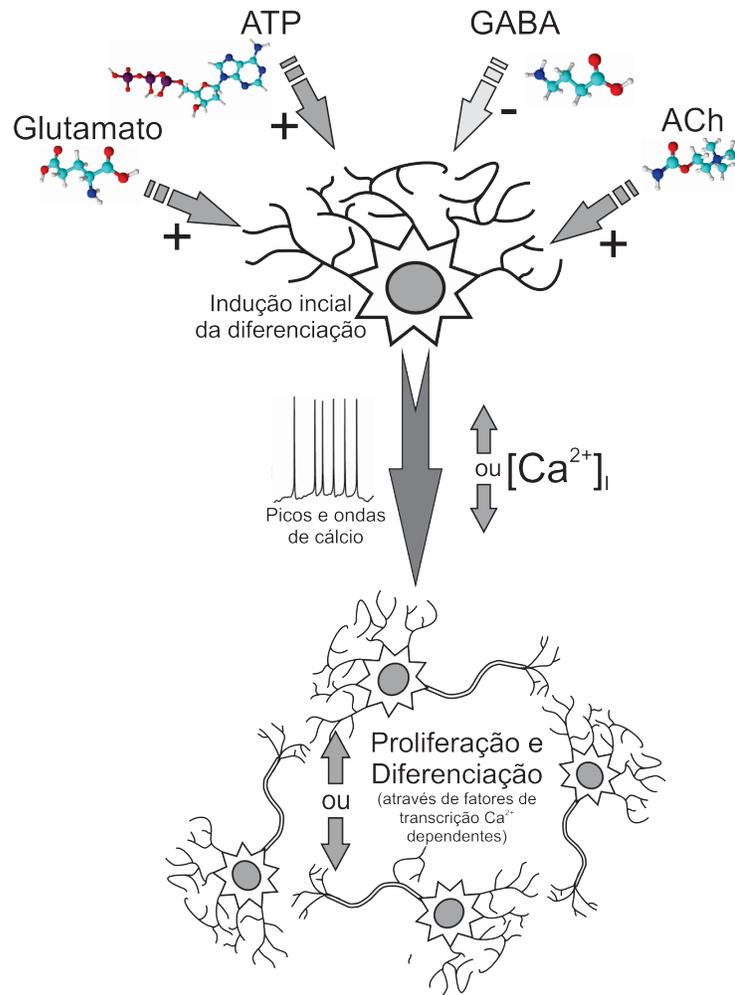


Figura 4: Esquema de interações entre sinalização por cálcio induzida por neurotransmissores e os processos de proliferação e diferenciação. Explique a figura, também como fatores de transcrição são envolvidas.

De maneira geral, diversas famílias de receptores já foram identificados como tendo importante papel durante a diferenciação neuronal, os receptores da família Cys-loop, como no caso dos receptores nicotínicos e receptores de GABA, receptores ionotrópicos de glutamato, tanto de NMDA quanto AMPA e finalmente os receptores de purinas, em particular os receptores ionotrópicos P2X (Burel-Jungerman et al. 2011, Gupta et al. 2013, Jansson et al. 2012, Glaser et al. 2013)

1.2.1 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DAS CÉLULAS PLA

Desta maneira, tentaremos entender e testar o processo de diferenciação neuronal nas células PLA e investigarmos quais tipos de redes neuronais (de acordo com os receptores expressos) existem ao fim do

processo. Foi investigado a expressão e a funcionalidade dos receptores sinápticos durante o início da diferenciação neuronal das células PLA, buscando verificar se os processos de modulação da expressão gênica de canais iônicos, observados anteriormente pelo laboratório, ocorrem com essas células.

A ideia principal por trás dessa abordagem, seria a de tentar desenvolver um protocolo que estimule as células PLA de origem mesenquimais a se transdiferenciar em um tipo celular ectodermal, no caso neurônios, possibilitando assim, em caso de sucesso, uma promissora ferramenta para a prática clínica em terapias celulares para reparo de danos no tecido neuronal, oriundos de lesões, como acidentes automobilísticos que levam a paraplegia ou tetraplegia, tratamento para doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica e tratamento de lesões agudas como derrames ou lesões por ataques epilépticos.

A diferenciação de células mesenquimais (PLA) em ectodermas (neurônios) é um tema muito discutido na literatura (Kitada 2012, Franco Lambert et al. 2009, Kanno 2009), e por isso mesmo selecionamos abordar esse tema, a fim de, com nossos conhecimentos de diferenciação neuronal, a modulação de diversos receptores de neurotransmissores durante o processo e os testes funcionais, entender até onde poderíamos chegar nesse processo de transdiferenciação e o quanto poderíamos acrescentar a esse campo do conhecimento, aumentando seu entendimento e o levando mais perto de ser um processo possível.

Diversos estudos anteriores foram realizados *in vitro* e demonstraram de maneiras diferentes a habilidade das células MSC (entre elas as células PLA), de expressar marcadores neuronais, sejam marcadores de neurônios imaturos, células com morfologia neuronal e finalmente na diferenciação em neurônio e astrócitos (Sanchez-Ramos et al. 2000; Woodbury et al. 2000; Zhang et al. 2004, Kitada 2012, Franco Lambert et al. 2009, Kanno 2009), mas seriam esses processos de diferenciação capazes de dar origem a neurônios nas células PLA?

Em acordo com os processos de diferenciação das células MSC, foi detectada a expressão de genes

para alguns receptores de neurotransmissores que indicam a formação de redes neuronais distintas, pois foi encontrada a expressão de receptores característicos de redes inibitórias da neurotransmissão como os receptores de GABA do tipo A e receptores característicos e de redes excitatórias como os receptores de glutamato, inicialmente AMPA e posteriormente NMDA (Wislet-Gendebien et al. 2005)

Partimos da hipótese de que essa diferenciação, de células mesenquimais para neurônios, seja possível, uma vez que essas células apresentam receptores para alguns fatores de crescimento tipicamente neuronais e assim, imaginamos que amplificando as cascatas de sinalização envolvidas no processo, como ativação de certos fatores de transcrição específicos, células diferenciadas ou ao menos em um estágio intermediário do processo poderiam ser obtidas, que nos possibilitará entender o que ainda nos falta para completar o processo.

1.3 O CONCEITO: ASSINATURA MOLECULAR DE MEMBRANA (AMM)

Assim como havia a necessidade de obtermos células diferenciadas para suplantando uma grande necessidade médica de terapias em tecido nervoso lesionado, tínhamos pela frente a limitação de fornecer essas células tronco adultas mesenquimais de lipoaspirado, para médicos em salas de operação, de modo que elas pudessem ser utilizadas em diversas aplicações não apenas de reparo neuronal.

Porém para isolar essas células das outras, que fazem parte do lipoaspirado, eu teria de primeiro buscar algo que as tornasse únicas, para então me utilizar disso para identifica-las e purifica-las para serem utilizadas, seja em uma sala de cirurgia ou para um estudo de diferenciação neuronal *in vitro* por exemplo. Assim, passamos a procurar algo exclusivo dessas células e uma ferramenta para poder identificar essa assinatura específica de células tronco mesenquimais de lipoaspirado.

O conceito de assinatura, é de se ter uma marca, um símbolo, que seja único, específico, e que possa afirmar sua originalidade perante possíveis similaridades. Aplicando esse conceito a uma célula, a ideia se baseia em buscar um conjunto de moléculas de membrana que seriam capazes de serem um conjunto de

marcas exclusivas de um determinado tipo celular, sendo com essa base que cunhamos o conceito de assinatura molecular de membrana (AMM) (Ulrich and Wrenger 2009).

Tendo essa assinatura celular, buscamos identificar possíveis ligantes que reconhecessem especificamente a AMM que fosse exclusivo de um tipo celular, no caso, das células tronco mesenquimais PLA. Esse padrão de epítomos (proteicos ou não), que individualmente poderiam estar presentes em outros tipos celulares, formaria um padrão único para o reconhecimento dessas células. Faz-se necessário então que esses epítomos não estejam presentes nas células vizinhas ao tipo da célula alvo, embora, possam aparecer em células distantes da região de interesse.

Com isso, seria possível obter ligantes para um determinado tipo celular que inviabilizasse a copurificação de outros tipos celulares não desejados, como por exemplo, adipócitos ou fibroblastos ao invés das células PLA, o alvo da purificação.

Partimos da ideia que a membrana celular não é algo uniforme ou uma superfície estéril (Figura 5A) e portanto, possui diversos receptores, sejam eles canais, receptores, proteínas sinalizadoras, moléculas de adesão entre outros tipos de moléculas (Figura 5B), assim queríamos identificar ligantes que possam se ligar não em todos os receptores presentes na superfície celular, mas apenas naqueles alvos que fazem com que um tipo celular se diferencie dos outros tipos celulares presentes no mesmo tecido ou amostra de biópsia.

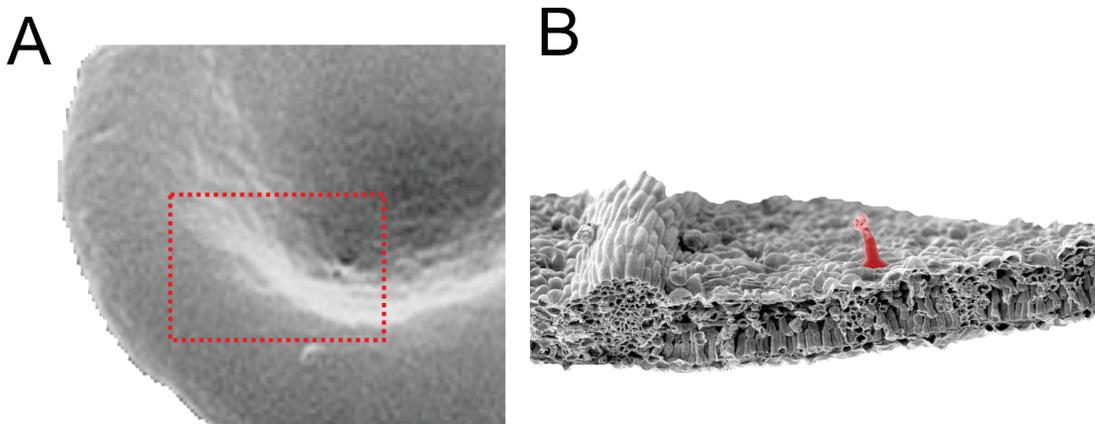


Figura 5: Representação do conceito de assinatura molecular de membrana. A, a ideia inicial de que a membrana celular não é uma superfície estéril. B, a presença de proteínas de membrana que poderiam ser alvos para moléculas que identificassem as células que carregam exclusivamente esse alvo.

Tendo uma ferramenta que possibilitasse o desenvolvimento e/ou seleção de ligantes para esses receptores/epítomos que formam a AMM das PLA, seríamos capazes de purificá-las através das moléculas desenvolvidas e com os ligantes em mãos identificaríamos quem seriam os integrantes dessa assinatura membranar.

Para isso utilizaremos o método SELEX que será introduzida em seguida.

1.4 A TÉCNICA SELEX

O método SELEX (Sistemática Evolution of Ligands by EXponential enrichment), introduzido simultaneamente por Larry Gold e Jack Szostak (Tuerk & Gold, 1990; Ellington & Szostak, 1990), utiliza bibliotecas combinatórias de oligonucleotídeos com sequências aleatórias (RNA ou DNA) capazes de obter ligantes com alta afinidade e especificidade para inúmeros alvos de seleção *in vitro*, incluindo antígenos expressos na superfície de células e membranas de células inteiras.

As bibliotecas combinatórias utilizadas para SELEX (seleção *in vitro*) possuem duas regiões constantes, flanqueando uma região randômica central, que pode variar de 16 a 75 nucleotídeos, sendo as regiões constantes (Figura 6) necessárias à amplificação enzimática (RT-PCR e transcrições) e para a adição de moléculas acessórias, como por exemplo, a biotina, necessária para a separação da fita dupla no

caso de seleções utilizando bibliotecas de DNA simples fita.

O isolamento de ligantes se baseia nas interações já conhecidas dos oligonucleotídeos com proteínas, como no caso de interação DNA ou RNA-proteína, normalmente relacionados com as correlações entre sequência e estrutura, pontes de hidrogênio e *induced fit* por exemplo. Assim, a partir de um número suficientemente grande de sequências únicas e conseqüentemente estruturas diferentes, deveria ser possível identificarmos um oligonucleotídeo para qualquer proteína como alvo de seleção *in vitro*.

Esse conceito utiliza a base da química combinatória, sendo que em nossa região randômica, teríamos o número possível de nucleotídeos para cada posição (4 variantes sendo elas: A, T, C, G) elevado ao número de bases o qual eles iriam se combinar (de 40 bases por exemplo), assim chegamos ao valor de que essa região randômica pode produzir 4^{40} ou aproximadamente 10^{24} sequências únicas.

Esse número se torna muito importante se levarmos em consideração que eles nos remetem à seguinte possibilidade: se a probabilidade de encontrarmos um ligante para nosso alvo seja tão diminuta quanto de $10^{-21}\%$ ainda teríamos ao menos 10 ligantes para nosso alvo! Esse cenário tende a elucidar ao leitor a capacidade dessa técnica em resultar em bons resultados para experimentos corretamente desenhados tendo-a como base.

Para enriquecermos a proporção de moléculas de DNA e RNA com alta afinidade por seus alvos no *biblioteca* de seleção, serão necessários ciclos reiterativos de apresentação dos alvos à biblioteca.

Durante a seleção, esses ciclos mimetizam um processo seleção natural, porém *in vitro*, onde moléculas que apresentem maior afinidade pelo alvo serão selecionadas para irem a um novo ciclo de seleção, ou seja, estarão selecionadas perante essa primeira pressão seletiva sendo que as moléculas não selecionadas estariam de maneira equivalente, extintas.

As moléculas selecionadas serão amplificadas entre os ciclos, equivalentemente a deixarem descendentes, aumentando a sua representatividade na população global e desta forma, com suficientes

ciclos de seleção, teremos ao final, a prevalência de moléculas com alta afinidade por nossos alvos ou em outras palavras, moléculas que tenham um maior *fitness* às pressões seletivas às quais elas foram submetidas. A principal sinalização para encerrarmos os ciclos de seleção é a estagnação do aumento de afinidade da população por seus alvos mesmo ocorrendo um aumento de pressão seletiva (estringência).

As moléculas de DNA/RNA selecionadas, também denominadas aptâmeros (do latim, *aptus* - “to fit” ou encaixar-se) reconhecem especificamente epítomos proteicos de acordo com a seleção.

Durante esses ciclos teremos o aumento efetivo da estringência da seleção, ou seja, teremos diferentes condições entre a proporção alvo:ligantes, ou ainda, adicionaremos competidores inespecíficos a fim de eliminar ao máximo ligantes de baixa afinidade por nossos alvos.

Inicialmente a técnica SELEX foi utilizada para identificação de novos ligantes para moléculas pequenas, peptídeos e proteínas solúveis. Utilizando protocolos de seleção *in vitro* modificados, foi possível identificar aptâmeros para alvos complexos, tais como receptores, canais iônicos e até células inteiras (Ulrich et al., 1998 e 2002, Shangguan et al., 2006; Nery et al. 2009;) sendo comum recentemente encontrar diversos registros na literatura de biosensores para detecção desde parasitas até toxinas (Savory et al 2013; Kim et al 2013).

Além da sua importância na identificação de ligantes ou inibidores específicos a uma proteína alvo, no estudo do papel dessas proteínas em pesquisas, os aptâmeros se tornaram drogas promissoras, como o Macugen, aprovado pelo FDA em meados da última década, para aplicações terapêuticas (revisto em Ulrich et al., 2004 e Ulrich et al., 2006).

Os aptâmeros são bons candidatos para geração de novas moléculas de importância farmacêutica pelas seguintes razões: (I) os aptâmeros isolados de bibliotecas combinatorias têm constantes de dissociação da ordem de nano a picomolar, similares e até melhores às encontradas nas interações entre antígenos e anticorpos monoclonais; (II) aptâmeros são capazes de diferenciar isoformas da mesma classe de proteínas, tais como receptores purinérgicos P2Y1, P2Y2 e P2Y4 (Patente PI11063122) como podem

diferenciar entre vasculatura tumoral e normal (Blank et al., 2001); (III) os aptâmeros podem ser quimicamente alterados a fim de aumentar sua estabilidade em aplicações *in vivo* e (IV) uma vez selecionados e clonados, a biblioteca de clones permite sua produção em grande escala por reações enzimáticas sem haver mudanças de lote durante sua fabricação, como acontece com anticorpos monoclonais.

Com a inserção de possíveis modificações, a meia vida de aptâmeros de RNA em fluidos biológicos, como soro ou urina humana, aumenta de aproximadamente 8 minutos, para um RNA não modificado, a 86 h para o RNA com grupo 2'OH- amino-modificado (Ulrich et al., 2004).

Comparados a anticorpos, os aptâmeros possuem um potencial promissor em aplicações diagnósticas e terapêuticas, devido a sua alta especificidade, baixo peso molecular, baixa imunogenicidade e facilidade de produção/manipulação.

Como dito anteriormente os aptâmeros selecionados podem apresentar moléculas acessórias os quais irão lhes conferir características específicas para sua utilização, sendo ligadas nas extremidades do oligonucleotídeo selecionado, essas moléculas podem ser repórteres fluorescentes, biotina, nano-partículas etc.

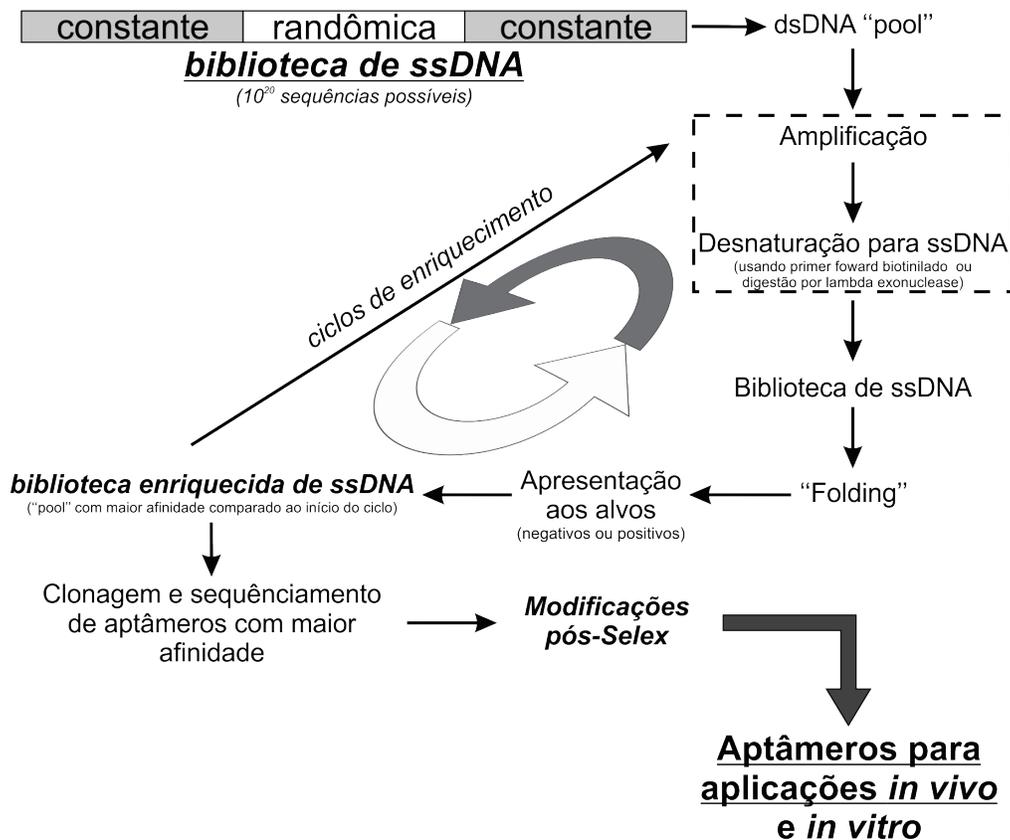


Figura 6: Representação esquemática da técnica SELEX, utilizando biblioteca de DNA para identificação celular (adaptado de Ulrich et al. 2006). Para a produção de aptâmeros simples fita utilizamos a incorporação de primers com biotina, fazendo com que em uma eletroforese desnaturante de DNA em gel de poliacrilamida, a fita com as biotinas se separe do DNA alvo para as próximas seleções. O DNA a ser purificado e utilizados nos ciclos subsequentes pode conter FITC ou outras moléculas fluorescentes para transformar nossas moléculas em marcadores para serem utilizados em citometria. Ainda é possível a anexação de uma molécula de fosfato (PO₄) no terminal 5' da fita complementar à molécula, assim essa fita pode ser digerida enzimaticamente aumentando a eficiência da produção da molécula simples fita para obtermos um produto de alta qualidade e baixo custo de produção.

Desta maneira, aptâmeros biotilados que se liguem especificamente a células tronco, mas não em outras células do lipoaspirado, podem ser ligados a “beads” magnéticos com estreptavidina e quando incubados com a suspensão das células do lipoaspirado, um campo magnético pode ser utilizado para separar as células tronco que irão possuir em sua superfície aptâmeros magnéticos.

Com isso esperamos aumentar significativamente a eficiência e o tempo da purificação dessas células, diminuindo os custos do processo, como custos relacionados à armazenagem, cultivo e purificação, assim como o tempo decorrente dessas atividades, e desta forma viabilizar essa fonte de células tronco adultas para serem utilizadas dentro de um intervalo de tempo e de padrões de qualidade clinicamente viáveis.

2 JUSTIFICATIVA

Existe uma demanda não atendida na medicina regenerativa, que atualmente, se expressa em um gargalo logístico dentro das aspirações de uso das células tronco e todas as possibilidades que elas podem oferecer. Essa demanda se propaga principalmente devido à falta de possibilidade de uso imediato dessas células nas salas de operações, quando o paciente mais precisa delas, logo após um trauma.

Os processos de purificação de células tronco adultas utilizados atualmente, seja com células de tecido adiposo quanto de medula óssea, demoram semanas para chegarem a uma população livre de células contaminantes e com elevado grau de pureza para a realização de aplicações clínicas. Esse processo de purificação, além do alto consumo de tempo e dinheiro, o que inviabilizaria o uso dessas células em diversos hospitais, acarreta em células em contato com *xeno* materiais o que dificulta a aprovação do uso dessas células por parte das autoridades regulatórias.

Buscando solucionar essa limitação e a fim de viabilizar a utilização das células tronco adultas para uso clínico, teríamos de desenvolver um sistema que possa de forma rápida e de baixo custo purificar ou separar as células tronco do tecido aonde estão embebidas, seja na medula óssea ou no lipoaspirado processado.

Essa ferramenta teria de ter baixo custo de produção, nenhuma variação entre seus lotes de fabricação e deveria identificar as células, por um conjunto amplo de moléculas presentes em suas membranas.

Com esses descritores em vista, a melhor tecnologia a ser aplicada seria a seleção de moléculas que pudessem ser produzidas em escala industrial, através de reações enzimáticas de alto rendimento. Assim, escolhemos a técnica SELEX para desenvolvermos aptâmeros capazes de desempenhar tal função e desta forma identificar e conseguir de forma efetiva utilizar diferenças sutis entre tipos celulares, apenas se utilizando ligantes de superfície.

De maneira complementar à necessidade de purificação das células tronco mesenquimais, existe a necessidade de novos protocolos para diferenciá-las em tecidos diferentes dos que de sua origem embrionária, assim diferenciá-las para células de origem ectodermal, por exemplo neurônios, poderíamos demonstrar ser possível ampliar a gama de possibilidades de seu uso terapêutico, ou ainda, aprender como os protocolos atuais podem ser melhorados para obtermos tal objetivo. Nessa tese propomos uma abordagem onde os protocolos utilizados são fatores de crescimento e indutores de diferenciação neuronal fisiológicos, que não induzem um estresse químico nas células, dessa forma tentando uma reprogramação química mais próxima ao do microambiente de diferenciação que deve ocorrer *in vivo*.

Sumarizando, nossas hipóteses são:

- É possível desenvolver um conjunto de moléculas capazes de identificar e purificar células tronco mesenquimais de tecido adiposo e se utilizar dessa ferramenta para disponibilizá-las para uso clínico.
- Utilizando um protocolo de diferenciação adequado, podemos obter um fenótipo neuronal a partir de células tronco mesenquimais para então serem consideradas para uso em terapias celulares para reparo de tecido neural.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Desenvolver aptâmeros através da técnica SELEX para identificar e purificar populações de células tronco mesenquimais em meio ao lipoaspirado processado.
- Testar a viabilidade da diferenciação neuronal das células tronco mesenquimais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a sequência e estruturas de aptâmeros capazes de identificar e purificar células tronco mesenquimais.
- Investigar a funcionalidade e características fenotípicas possivelmente envolvidas na diferenciação neuronal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO.

3.1.1 EXTRAÇÃO E CULTURA.

O processo de extração das células troncos mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) (células de lipoaspirado processado, PLA) ocorreu a partir de tecido adiposo disponibilizado pela equipe médica que colabora com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM)–InCor/HC–USP do Professor Dr. José Eduardo Krieger, sendo que os lipoaspirados eram oriundos de mulheres entre 18-45 anos. O material é oriundo de operações que tiveram a necessidade de que houvesse lipoaspiração ou cirurgias estéticas, o material lipoaspirado é reservado para a extração de células mesenquimais de acordo com o protocolo inicialmente padronizado por Yoshimura et al. 2006. O protocolo foi modificado e otimizado no LGCM pelo Dr. Vinicius Bassaneze e pela Dra. Ayumi Aurea Miyakawa (Pesquisadora/Analista de Laboratório). O estudo obteve a aprovação do Comitê Ético do hospital.

O protocolo consiste em coletar e manter o tecido adiposo recém extraído em um frasco estéril contendo de 20-30ml de PBS. Deve-se então, preparar a solução de digestão de acordo com a massa de tecido a ser processada, sendo que para 10g de tecido utilizamos 20ml de solução de digestão contendo 20mg de colagenase 1-A, 200mg de albumina de soro bovino, 10µl de gentamicina (40mg/ml), q.s.p. 20ml com DMEM Low-Glucose.

A solução é adicionada ao tecido o qual deixamos no processo de digestão por 30 minutos à 37°C, terminamos a reação com o acréscimo de 10ml de soro fetal bovino. Após isso, o tecido digerido é aliquotado em tubos de centrifugação e os centrifugamos por 15 minutos a 300g.

O material se separou em 3 fases, a primeira de cima para baixo, foi constituída basicamente de gordura, seguido de uma fase intermediária de meio de cultura, ambas essas fases foram retiradas e então o precipitado de células que se formou durante a centrifugação foi ressuspendido em meio DMEM Low-

Glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino e então plaqueadas em placas de 100mm², mantidas por aproximadamente duas semanas em estufa contendo 5% de CO₂, 95% de umidade relativa e 37°C.

Essa passagem foi denominada P0 aumentando a contagem para P1 e assim sucessivamente sempre que houver mudança de recipiente de cultura ou tripisinização. Nesse material teremos não apenas as células mesenquimais, em menor número, mas em sua grande maioria células de sangue e de vaso, que não se aderem à placa e não proliferam (Yoshimura et al 2006). Com as sucessivas trocas de meio, que ocorrem diariamente durante os 3 primeiros dias após o plaqueamento, e lavagens com PBS, o material não aderido é eliminado e ao final de uma ou duas semanas, onde o meio é trocado a cada 2 dias, as placas de cultura já apresentam >80% de confluência de células mesenquimais. Existe a possibilidade dessas células serem coletadas para serem utilizadas para os ciclos de seleção negativa, onde ligantes para sítios expressos em ambas as células são descartadas como descrito posteriormente.

Ainda durante a padronização do método, a pureza da população isolada foi verificada pela imunomarcagem das células aderentes em >80% para os antígenos CD29/CD90.

Sobre o perfil dos pacientes utilizados no estudo, as características populacionais foram:

- Pacientes do sexo feminina;
- Entre 18-55 anos;
- Tendo sido submetidas a lipoaspiração e o procedimento tendo ocorrido sem intercorrências;
- As células dessas pacientes foram utilizadas para SELEX entre as passagens 0 e 4.

3.1.2 PADRONIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS MESENQUIMAIS

O processo de diferenciação neural se mostrou como um ponto central para garantirmos, ainda no primeiro ano do projeto, se seria viável a diferenciação de nossas células em linhagens neurais.

Nos baseamos inicialmente em diversos protocolos citados na literatura, que utilizavam desde agentes químicos como DMSO e βmercapto-etanol até interação com outras linhagens neurais para obter a

diferenciação (Woodbury et al 2000).

Porém, o protocolo que mostrou o melhor resultado, apresentado a maior taxa de aparecimento de células com fenótipo neuronal (aproximadamente 50%), foi oriundo da fusão de alguns protocolos utilizados previamente na literatura e que sofreram algumas adaptações para atingir nossas metas, essas adaptações ocorreram visando obtermos um processo usando fatores de diferenciação fisiológicos, presentes no desenvolvimento normal do sistema nervoso como o fator de crescimento neural (NGF), fator neural derivado de cérebro (BDNF), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (Sanchez-Ramos et al 2002) e alguns fatores que se mostraram como intensificadores da diferenciação, como dibutilil cAMP (dbcAMP) (Ho et al 1992), isobutilmetilxantina (IBMX) e indometacina (Ashijan et al 2003; Montiel-Eulefi et al. 2012). O meio base para a diferenciação, foi o mesmo usado em neuroesferas, metodologia dominada pelo laboratório, sendo este composto por DMEM/F-12 (70:30 v/v) suplementado com B-27 e N2, suplementos específicos para cultivo de células tronco neurais (Martins et al 2008).

O protocolo otimizado, visto a produção de células com morfologia neural e com marcação para proteínas específicas de neurônios como neurofilamento maduro (NF-200), consiste em: DMEM/F12 (50:50) onde são adicionados IBMX (500 μ M), para aumento dos níveis intracelulares de cAMP que ao invés de ser re-suspendida em DMSO como no protocolo anterior é re-suspendida em etanol, a solução com o meio DMEM/F12 é deixado em uma garrafa ventilada na estufa à 37°C por 12 horas para a evaporação do etanol, então o meio é suplementado com 2% de B-27 (suplemento Gibco), 1% N2 (Suplemento Gibco), NGF (400ng/ml), dbcAMP (250 μ M) e BDNF (10ng/ml).

As células foram plaqueadas a uma densidade de 10.000 células por cm², diferentemente ao protocolo anterior, pois verificamos que para termos resultados melhores para a expansão de neuritos as células necessitariam de mais espaço, sendo essas cultivadas por até 6 dias para o fenótipo neural em estufa contendo 5% CO₂, em atmosfera saturada com água à 37°C.

3.2 RT PCR E PCR EM TEMPO REAL.

Para a identificação e quantificação da expressão gênica de receptores de neurotransmissores, enzimas e fatores de transcrição chaves relacionados ao processo, os mRNAs foram extraídos pelo método do Trizol (Invitrogen, Califórnia, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para a transcrição reversa foi utilizado 1µg de RNA previamente tratado com 10 U de DNase, 500 µM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 40 U de inibidor de RNase, tampão, 200 U de transcriptase reversa, 50 ng de hexameros randômicos, seguido pela ciclagem 20°C por 10 minutos, 42°C por 45 minutos e 95°C 5 minutos.

Os 20µl obtidos ao final da transcrição *in vitro*, foram então diluídos para 100ul adicionando-se a diferença com água DEPC. A partir dessa solução utilizamos 1ul como *template* para as reações de PCR, onde continhamos 5µl de 10x Tampão para PCR contendo (NH₄)₂SO₄, 3µl de MgCl₂ (25mM), 2µl dNTP mix (10mM), 1ul de cada um dos *primers* (10pmol/ul), 1µl de TAQ DNA Polimerase (5U/µl), completando o volume para 50µl finais com a adição de água MiliQ autoclavada. As amplificações seguiram pelos seguintes ciclos de amplificação: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 40 segundos, temperatura de anelamento padronizada para cada *primer* (aproximadamente 60°C) por 50 segundos e 72°C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final de 72°C a 10 minutos.

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1% (m/v) a 10V/cm por aproximadamente 25 minutos, tendo como peso molecular padrão o produto GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas International Inc. Ontario, Canadá).

Uma vez o gene tendo apresentado expressão através de PCR normal, ele passou a ser considerado um candidato para ter seu perfil de expressão investigado por PCR em tempo real. Como controle interno e para quantificação relativa da expressão gênica, utilizamos a expressão gênica de β-tubulina, β-actina e GAPDH.

Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes foram desenhados com o auxílio do programa *Primer-Blast* disponibilizado em www.ncbi.nlm.nih.gov/PrimerBlast/. Os *primers* foram desenhados para terem um

produto de amplificação entre 800 e 1000 pares de base e uma temperatura de anelamento dentre 57 e 63°C (Anexo IV).

Os PCR em tempo real foram realizados utilizando o reagente SYBR GREEN para quantificar a expressão relativa utilizando o aparelho 7300 PCR real-time System (Applied Biosystems). Para análise da expressão gênica através de Real-Time PCR foi utilizado o método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta Ct$) (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008). Calcula-se inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (*cycle threshold* ou limiar do ciclo) do gene controle (GAPDH ou β -tubulina) dos valores de CT do gene alvo. Após determinação do ΔCt da amostra, escolhe-se a amostra normalizadora, em nosso caso foi a média dos ΔCt s de cada gene para o estado não diferenciado. Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ utiliza-se a fórmula seguinte: [ΔCt (amostra) – ΔCt (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta Ct$, aplica-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que resulta no valor da expressão relativa.

Para utilizarmos o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$, foi necessário determinarmos inicialmente a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno. Para tanto foram feitas curvas com diluições seriadas dos pools de cDNAs para cada um dos genes estudados, partindo dos cDNAs diluídos 1:3 (Cardeal et al 2012). Para comparar a eficiência de amplificação dos dois genes, subtraem-se os valores de CT do gene alvo dos valores de CT do gene controle. A diferença foi plotada contra o logaritmo da diluição de cDNA. Se a inclinação da reta (slope), for menor que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, podendo-se assim utilizar este método. Após padronização e validação do método, foram realizados os ensaios de real-time PCR em triplicatas biológicas com duplicatas dos poços para cada gene estudado. Como controle negativo utilizamos poços sem amostra (NTC = No Template Control), mas na presença do par de primers e o mix de SYBR Green.

3.3 IMAGIAMENTO DE VARIAÇÕES DE CÁLCIO INTRACELULAR LIVRE ($[Ca^{2+}]_i$)

A ativação dos receptores metabotrópicos foram avaliadas por meio de confocalidade, além de ter

sido uma técnica que se mostrou mais eficiente para avaliar a funcionalidade de receptores na população de células indiferenciadas e diferenciadas, sejam receptores ionotrópicos ou metabotrópicos.

As medidas de cálcio foram conduzidas com o plaqueamento de aproximadamente 30000 células em placas de 9,2 cm², os plaqueamentos utilizaram células diferenciadas e nos dias 1 e 2 de diferenciação. As células foram carregadas com 4μM de fluo-3AM em 0,5 % de DMSO e 0,1% de ácido plurônico por 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação as células foram lavadas três vezes com meio contendo 10 % de soro fetal bovino seguida de incubação com tampão contendo 145 mM NaCl; 5.3 mM KCl; 1.8 mM CaCl₂.2H₂O; 10 mM HEPES e 10 mM glicose, ajustado a pH 7.4; sem a presença de magnésio, uma vez que o magnésio afeta a atividade de receptores entre eles os receptores de NMDA. Após a lavagem foi adicionado 1 mM (valor próximo ao ponto de resposta máxima para todos os compostos analisados) de CCh, NMDA, Glut, BK, ATP e Nicotina, sendo as variações de cálcio avaliadas pela excitação do fluoróforo em filtros de 488 nm (excitação) e sua emissão filtrada por 515 nm (emissão). No final de cada experimento foram adicionados ionóforo de cálcio (5μM) e 10mM de EGTA para a detecção da fluorescência máxima e mínima. A concentração de cálcio foi avaliada pela fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F)} \quad (I)$$

Equação 1: Equação para cálculo de concentração de cálcio intracelular. F_{max} é o valor de fluorescência obtido com a presença de ionóforo, F_{min} a fluorescência obtida na presença de EGTA e F o valor do platô de fluorescência obtido com o agonista a ser analisado. K_d de 450μM para fluo-3AM.

As medições foram realizadas em um microscópio Nikon Eclipse Ti (Nikon Corp. Tokyo, Japan) com câmera Photometrics Cool Snap HQ² (Photometrics, Tucson, AZ, USA), Shutter Prior ProScan II (Prior Scientific Inc. Rockland, MA, USA), e adquiridas e analisadas pelo programa Nis Elements Ar (Nikon Corp. Tokyo, Japan).

Os experimentos realizados foram realizados com a aquisição de imagens subsequentes a cada 1

segundo, por um período máximo de 4 minutos. As imagens foram analisadas para quantificarmos a cinética do aumento de fluorescência em escala monocromática. As imagens adquiridas foram tratadas com auxílio do programa Imagem J, onde foi sobreposto o filtro Rabino RGB, veja Figura 8 para exemplo, para transformar a escala de intensidade de fluorescência monocromática para multicromática, passando de baixa fluorescência em preto para azul ou violeta e alta fluorescência em branco para vermelho.

Para a quantificação dos transientes $[Ca^{2+}]_i$ as análises foram realizadas sobre a intensidade da fluorescência das imagens obtidas (Figura 7A). No gráfico oriundo das análises verificamos os pontos de aplicação do neurotransmissor (1), ionóforo (2) e EGTA (3) (Figura 7B), para assim convertermos fluorescência em concentração citosólica de cálcio através da fórmula já mencionada. Esses valores deram origem às quantificações da concentração citosólica de cálcio nas células e análises de resposta proporcional comparando a fluorescência emitida com a aplicação do agonista contra a fluorescência basal da célula antes da aplicação.

Para a realização das análises, consideramos alguns pontos, o primeiro deles de analisar apenas as células que apresentassem fenótipo neural, em acordo com os dados obtidos nas análises de marcadores específicos e segundo, subtraímos os valores encontrados em regiões sem células.

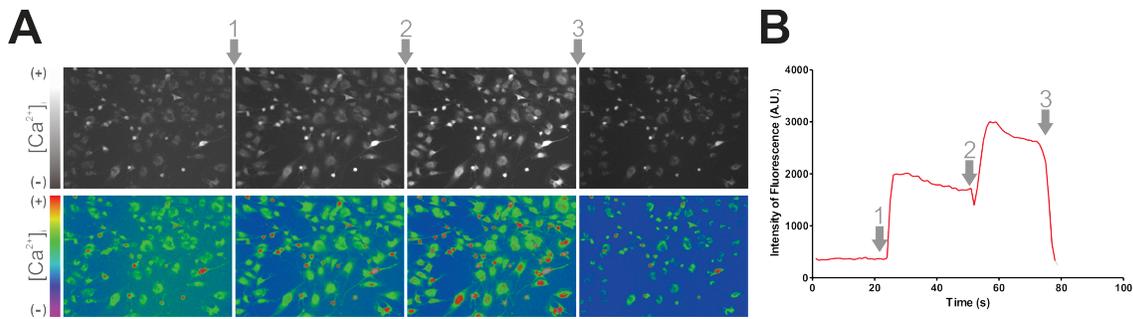


Figura 7: Padronizações das análises de influxo de cálcio para as respostas funcionais. Em A, podemos verificar a sobreposição do filtro rabino RGB pelo programa Image J, em pontos de fluorescência basal, após a aplicação do agonista (e.g.: 100 μ M ATP) (1), após a aplicação do 5 μ M ionóforo (2) e após a aplicação de 10 mM EGTA (3) respectivamente. Os experimentos de padronização foram realizados em células tronco mesenquimais de tecido adiposo. Os pontos de aplicação, as cinéticas das respostas e os patamares de fluorescência quantificada produzidos pelos compostos, são demonstrados em B.

3.4 ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIAS

Os ensaios de imunofluorescências para verificar a presença de marcadores de neurônios durante o processo de diferenciação, foram iniciadas com a fixação das células com 4% de paraformaldeído em PBS por 20 minutos a 4°C, seguido de 3 lavagens com PBS-Triton 0,05%. Para o bloqueio de epítomos inespecíficos foi adicionada salina tamponada por fosfato (PBS) com 2% de soro fetal bovino (SFB) por 1 hora a 4°C e a incubação com os anticorpos primários foi feita com os mesmos em titulações padronizadas (neuro filamento maduro NF200 – 1:400 e beta três tubulina (BIII-tub – 1:400, MAP-2 - 1:300) em PBS com 2% de SFB 12 horas a 4°C.

Seguiu-se três lavagens com PBS-Triton 0,05%, incubação com o anticorpo secundário (*anti-coelho* e camundongo TRITC – 1:200) em PBS 2% SFB por duas horas em temperatura ambiente, seguidas de 3 lavagem com PBS e uma incubação final com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por 5 minutos para visualização de núcleo celular. Finalmente, anteriormente à montagem das lâminas, realizamos uma lavagem com água destilada para a retirada de qualquer sal que pudesse precipitar dentro das lâminas prontas.

A aquisição das imagens ocorreu com o software Metamorph 6.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), com exposições entre 200-800ms para ensaios de imunofluorescências com os anticorpos

avaliados e 20ms para DAPI.

3.5 SELEX

3.5.1 DESENVOLVIMENTO DE APTÂMEROS ATRAVÉS DA TÉCNICA SELEX.

O processo de desenvolver aptâmeros à partir da técnica SELEX é composto de alguns protocolos específicos da técnica acoplado a outros protocolos clássicos de biologia molecular. O primeiro protocolo específico é a capacidade de realizar **amplificações da biblioteca** utilizando diversos tipos de *primers* para incorporar modificações desejadas, no terminal 5' de cada molécula, a cada passo do processo. Os protocolos clássicos são **eletroforese** para verificação de tamanho e pureza dos DNAs produzidos, **eluição** dos mesmos dos géis, seguido pela **extração por fenol/clorofórmio** e **precipitação por etanol**.

A biblioteca combinatória original, consistindo de 10^{16} moléculas de DNA diferentes (como demonstrado anteriormente na introdução tópico **1.4**), pode ser diretamente usada para o primeiro ciclo de SELEX, no caso de ter sido completamente purificado. Contudo, Bruce Beutel e Larry Gold em seu trabalho de 1992 (Beutel and Gold, 1992), preconizaram uma **amplificação por PCR** seguida de nova purificação, para assegurar que sequências únicas irão possuir mais do que uma única cópia na população de DNA, aqui denominado “pool” a fim de simplificar a menção a essas populações, sendo que aptâmero será um termo mencionado para determinar um DNA selecionado com sequência, função e estrutura determinadas.

Para a identificação dos aptâmeros de DNA (ligante de alta afinidade) foi utilizada uma biblioteca randômica de DNA (5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCT-N34-CGCTTATTCTTGTCTCCC-3' Operon Technologies) (Daniels et al. 2003) juntamente com os *primers* forward (PF) e reverse (PR).

Para a preparação do “pool” inicial de DNA, realizamos 20 reações de PCR, cada uma contendo 1x PCR buffer com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5mM MgCl_2 , 1mM dNTP, 1pmol/ul de PR (5'-GGGAGACAAGAATAAGCG-3'), 5% de DMSO, 1M de Betaína, 0,05U/ul de TAQ-Polimerase e 2fmol

de biblioteca randômica, a partir deste ponto foi sintetizada a fita complementar à fita simples, por 5 minutos a 95°C, 5 minutos a 42°C e 10 minutos a 72°C, após essa síntese da dupla fita, adicionaremos o PFBio (5'-BBB-GCCTGTTGTGAGCCTCCT-3', onde BBB significa uma tripla cauda de biotina), para o caso da separação de fitas ou o PF (5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCT-3') para a clonagem em vetor.

Para o restante da amplificação após a adição do *primer* forward (biotinilado ou não), seguimos com o seguinte protocolo: 3 minutos a 95°C para a separação das fitas e ciclos com 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 42°C e 2 minutos a 72°C sendo este ciclo repetido 18 vezes antes de uma extensão final de 10 minutos a 72°C. A adição de betaína e DMSO se deve à tentativa de auxiliar na amplificação por PCR de sequências ricas em C e G.

A verificação do tamanho e pureza dos produtos de PCR foram feitos através de **eletroforese** em gel de acrilamida 8% não desnaturante, seguida da purificação fenol/clorofórmio das reações e precipitadas por etanol, ressuspendendo o precipitado em água. A separação das fitas ocorreu em gel desnaturante contendo 10% acrilamida e 6M final uréia, após desnaturarmos as fitas por 3 minutos à 95°C juntamente com o “*loading buffer*” desnaturante contendo formamida e bromophenol blue (vendido comercialmente).

As fitas contendo o *primer* forward biotinilado migrarão de maneira mais lenta, sendo que quando revelado o gel, teremos duas bandas, uma superior e uma inferior, poderemos eluir apenas as bandas inferiores do gel, ou seja, os aptâmeros sem a incorporação de biotina.

Na **extração Fenol/Clorofórmio** é adicionado ao material a ser extraído uma proporção 1:1 de fenol pH 8,3, centrifugado, recuperado a fase aquosa, que é transferida para um tubo com clorofórmio em uma proporção 1:1, centrifugado e aí recuperação do sobrenadante para precipitação por etanol. Na **precipitação por etanol**, a cada 300ul de material a ser precipitado, foi adicionado 100ul de Acetato de Sódio 3M, pH7,4, 100ul de glicogênio 0,1% m/v e 50ul de MgCl₂ 1M, vortexar essa mistura e adicionar a esse volume, 4x esse valor de etanol 100%, a -20°C. O volume final é novamente vortexado e deixado a -20°C por no mínimo 2 horas.

A eluição das bandas com biotina foi efetuada apenas quando foram utilizadas sequências acopladas a biotina. Para isso realizamos uma PCR com o PR biotinilado e o PF normal para marcação dos pool com biotina para a ligação em partículas magnéticas e posterior purificação magnética das células.

A **eluição** consiste em macerar a banda extraída do gel até que ela fique particulada aparentando a granulidade de uma “farinha fina” de acrilamida, aumentando em muitas vezes a superfície de contato do gel com a solução de extração. Esse particulado de acrilamida contendo DNA simples fita, é lavado 3 vezes com H₂O, com lavagens de aproximadamente 2x o volume do gel após a maceração, sendo que cada lavagem ocorre por no mínimo 15 minutos à temperatura ambiente.

Após a eluição das bandas inferiores a partir do gel, elas foram purificadas (fenol/clorofórmio) e precipitadas (etanol) para então obtermos os aptâmeros para a sua utilização nos ciclos de seleção e para a utilização dos aptâmeros em análise de citometria de fluxo.

Os aptâmeros utilizados nos experimentos de citometria de fluxo utilizaram *primer* específico para citometria durante sua amplificação e purificação, PR_{FITC} - 6FAM-18C-GGGAGACAAGAATAAGCG-3', onde 18C denota um espaçador de 18-carbonos, o qual é incorporado ao aptâmero para minimizar a interação com a estrutura da molécula e o fluoróforo (Ab_{max} 488 nm Em_{max} 520 nm).

Para a preparação dos aptâmeros a serem utilizados, após sua identificação ao fim do processo de seleções, seguimos com uma síntese comercial das sequências identificadas, requerida já com 6FAM e o espaçador de 18 carbonos, a fim de facilitar a utilização nas citometrias de fluxo, quanto a pureza, critérios de qualidade e integridade das sequências assim como quantificação. Processo de Seleção in vitro de aptâmeros.

Os ciclos de seleção para aumento de afinidade dos aptâmeros para identificar as células tronco mesenquimais pode utilizar diversas estratégias para aumento da afinidade dos ligantes selecionados (Figura 8) algumas dessas estratégias serão demonstradas abaixo.

Ao se iniciar o primeiro ciclo, utilizamos 10 μ M de aptâmeros fita simples radio-marcados por [α^{32}]-dATP (200.000 contagens), quantificados por OD (260/280nm), que foram incubados com 10⁶ células tronco entre a segunda e a quinta passagem após a extração do paciente, para obtermos um conjunto de alvos proteicos padronizados. Quando tivemos de marcar a fita com nucleotídeos radio marcados, o equivalente não radio marcado foi limitado em 1000 vezes, se fossemos marcar as fitas usando dATP, usaríamos este nucleotídeo a uma concentração de 0,1 μ M e 5 μ l de [α^{32}]-dATP (6000Ci/mol).

Em ciclos subsequentes, essas células de diferentes passagens e também de diferentes pacientes foram combinadas em iguais proporções para que a exposição de epítomos fosse homogeneizada e chegássemos a ligantes que funcionariam em alvos conservados entre as passagens e entre diferentes indivíduos. Durante esses, a concentração de entrada do “*pool*” no ciclo de seleção era de 1 μ M.

Os aptâmeros foram incubados em tampão de seleção, que mimetiza a concentração iônica do meio extracelular para que os alvos não perdessem sua conformação nativa, sendo a composição do tampão a seguinte: 145mM NaCl, 5.3mM KCl, 1.8mM CaCl₂•2H₂O, e 25mM HEPES, ajustado ao pH 7.4.

A incubação ocorreu com as células por 20 minutos, para o aumento da estringência, t-RNA de levedura foi adicionado nos ciclos subsequentes para o bloqueio de sítios de ligação não específicas, e apresentará concentrações crescentes de 0 a 600 μ g de acordo com o desenvolvimento dos ciclos de seleção como demonstrado esquematicamente na Figura 9, que demonstra as principais estratégias de aumento de estringência utilizada ao longo dos ciclos de seleção.

Após essa incubação, seguiram-se 3 lavagens (de aproximadamente 500 μ l cada) por centrifugação (300xg por 5 minutos), com tampão de seleção, mantendo a concentração do competidor inespecífico a fim de deslocarmos o máximo das sequências com baixa afinidade pelas células PLA, a eliminação das sequências foi monitorada pela cintilação dos sobrenadantes de cada lavagem nos 5 primeiros ciclos de seleção, como foi demonstrado posteriormente nos resultados, esse procedimento era possível pois marcamos a biblioteca com [α^{32}]-dATP.

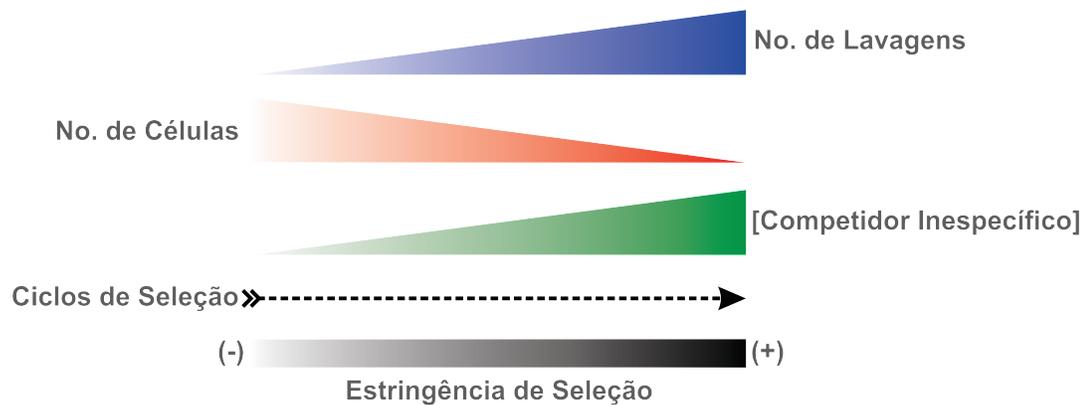


Figura 8: Modelo esquemático de processos que levam ao aumento de estringência durante a realização dos ciclos de seleção. Aumento do número de lavagens, diminuição do número de células, assim como aumento da concentração de competidor inespecífico (no caso t-RNA de levedura) levam ao aumento da pressão de seleção durante a seleção *in vitro* dos aptâmeros, fazendo com que criemos um ambiente mais restrigente para selecionarmos apenas aqueles com maior afinidade.

Os aptâmeros foram então purificados das células e precipitados a fim de reiniciarmos os ciclos até que passássemos a ter pouca heterogeneidade de sequências no “*pool*” selecionado para essas células. Isso ocorreu com os sequenciamentos da biblioteca que serão explicados posteriormente.

Durante a seleção, introduzimos ciclos de seleção negativa (Ulrich and Wrenger, 2009) e aumentamos a estringência dos ciclos de SELEX com auxílio da técnica BRASIL (Giordano et al. 2001). Para o desenvolvido com centrifugações normais, tivemos como ciclos negativos os ciclos 3 e 7, sendo que nos ciclos 10, 11 e 12 foram feitos sendo um ciclo de seleção negativo seguido de um ciclo de seleção contra células alvo. Os ciclos se encontram descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo dos ciclos de seleção

Ciclo	Tipo	Paciente(s)	No. Células	Input Apt	Lavagens	t-RNA	Tempo Incubação
R1	+	26p3	$5 \cdot 10^5$	8,4 μ M	3x	-	30'
R2	+	27p2	$5 \cdot 10^5$	1 μ M	3x	-	30'
R3	-	28p0	$5 \cdot 10^7$	1,2 μ M	N/A	-	40'
R4	+	28p1	$5 \cdot 10^5$	1 μ M	5x	-	30'
R5	+	47p4	10^5	3,8 μ M	2x	100 μ g/ml	40'
R6	+	48p2	10^5	0,5 μ M	4x	250 μ g/ml	40'
R7	+	52p2	10^5	1 μ M	5x	250 μ g/ml	40'
R8	+	53p2	10^5	1 μ M	5x	250 μ g/ml	40'
R9	+	53p3	10^5	1 μ M	5x	-	40'
R10	-/+	RBC/49p3	$5 \cdot 10^6$ e 10^5	1 μ M	3x	500 μ g/ml	15' e 40'
R11	-	RBC	$4 \cdot 10^6$	1 μ M	5x	500 μ g/ml	40'
R12	-/+	RBC/60p2	$4 \cdot 10^6$ e 10^5	1 μ M	5x	1000 μ g/ml	15' e 40'
Br1	+	53p3	$8 \cdot 10^5$	0,5 μ M	-	-	30'
Br2	-/+	RBC/54p3	$2 \cdot 10^7$ e 10^5	5 μ M	-	-	15' e 30'
Br3	-/+	RBC/49p3	$5 \cdot 10^6$ e 10^5	1 μ M	-	250 μ g/ml	15' e 30'
Br4	-	RBC	$4 \cdot 10^5$	1 μ M	2x-préBr	500 μ g/ml	15'
Br5	-/+	RBC/60p2	$4 \cdot 10^5$ e $1 \cdot 10^5$	1 μ M	3x-préBr	1000 μ g/ml	15' e 30'

Para nos resguardarmos de uma eventual perda de todas as sequências, no caso de não haver nenhum sítio conservado, aplicamos à separação das fitas antes de cada ciclo apenas 80% das sequências selecionadas e amplificadas oriundas do ciclo anterior.

O ciclo negativo, ou seleção negativa, se refere à seleção feita com células os quais não temos interesse, no caso, células oriundas do lipoaspirado processado que não são aderentes ao plástico, como eritrócitos, fibras de colágeno, adipócitos etc. Com esses ciclos, a incubação ocorria normalmente mas resgatávamos apenas as moléculas que não se ligam nesses tipos celulares, ou seja, fazíamos a recuperação das moléculas presentes no sobrenadante da incubação, ao invés de recuperar por extração de fenol-clorofórmio as moléculas que se ligam nas células desejadas que ocorre nos ciclos positivos.

Esses ciclos, por terem objetivo de drenarem ao máximo ligantes comuns entre esses tipos de células,

foram realizados com 1µM de DNA para 10⁷⁻⁹ células não tronco, sendo que para esses ciclos não se usa competidor inespecífico t-RNA.

A estratégia de ciclos duplos foi utilizada desde o início para o “*pool*” desenvolvido com a técnica BRASIL, sendo assim os 5 ciclos realizados com ela tiveram primeiramente um ciclo de seleção negativa seguido de um ciclo positivo de seleção contra as células alvo.

Para os ciclos duplos, tanto o material não aderente quanto a população de células alvo, eram uma mistura de iguais proporções de material de pelo menos dois pacientes, a fim de homogeneizar os epítomos expostos durante a seleção. Os ciclos de seleção negativa tem como objetivo principal eliminar sequências de DNA que se ligam a marcadores comuns entre células tronco e células não tronco.

3.5.2 A TÉCNICA BRASIL

A fim de melhorar a técnica de seleção de aptâmeros, anexamos ao SELEX a técnica BRASIL (Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands) (Giordano et al. 2001) em colaboração com o Prof. Ricardo Giordano (IQ-USP) o qual estabeleceu o método utilizando a técnica phage-display.

Essa técnica poderia ser acoplada a qualquer técnica de seleção de biblioteca combinatória além de poder ser utilizada em ensaios de ligação onde existam problemas com ligação não específica nas membranas celulares, mas nunca havia sido padronizada para ser utilizada no procedimento whole-cell SELEX, especialização da técnica de SELEX onde utilizamos células inteiras para identificar ligantes de DNA para sua superfície de acordo com parâmetros de expressão e estimulação das células (Ulrich et al. 2006).

Como nosso processo já estava em andamento pudemos realizar a técnica em paralelo e comparar os resultados com os nossos obtidos de acordo com o método clássico de seleção, o qual foi descrito aqui anteriormente na sessão de material e métodos.

A técnica consiste em utilizar uma interface adicional (mistura de dibutil phthalato:ciclohexano (9:1

[v:v]; $d=1.03 \text{ g.ml}^{-1}$) durante a centrifugação de uma mistura de células e moléculas, com essa nova fase pode-se separar de maneira mecânica e espacial os ligantes que não se ligaram às células daqueles que se ligaram e foram ao fundo do tubo juntamente com as células graças à centrifugação, nesse caso foi utilizada centrifugação de $13.000xg$ durante pelo menos 10 minutos.

Após a centrifugação as células contendo os ligantes se precipitavam no fundo ((Figura 9), diferentemente do protocolo clássico que incubava as células ainda em suas placas de cultura com os aptâmeros e submetia-os a diversas lavagens para então através de uma extração fenol:clorofórmio extrair as moléculas selecionadas de seus alvos.

Na técnica BRASIL, apenas os ligantes que conseguissem se ligar com alta afinidade para atravessar a fase orgânica seriam selecionados, acelerando a seleção. Para a técnica Brasil realizamos 5 ciclos no total com ciclos de seleção negativa em todos os ciclos, para chegar nos mesmos resultados obtidos com o método clássico.

Os ciclos de seleção negativa, onde expomos as moléculas às células que estão presentes como contaminantes na extração de células mesenquimais, utilizou células sanguíneas extraídas do aluno Arthur Andrade Nery, e assim, com aproximadamente 20×10^6 de células, isso para expor as sequências ($1 \mu\text{M}$ de concentração inicial para cada ciclo de seleção) a um imenso número de sítios não específicos pudemos drenar da nossa população marcadores inespecíficos, que se ligavam em sítios comuns entre nossas células alvo e células somáticas, neste caso células de sangue.

Designamos as bibliotecas selecionadas pelo método tradicional com o nome de seu ciclo de seleção (e.g. R4) e as selecionadas pela técnica BRASIL com a adição de uma letra B na frente da sigla (e.g. BR1).

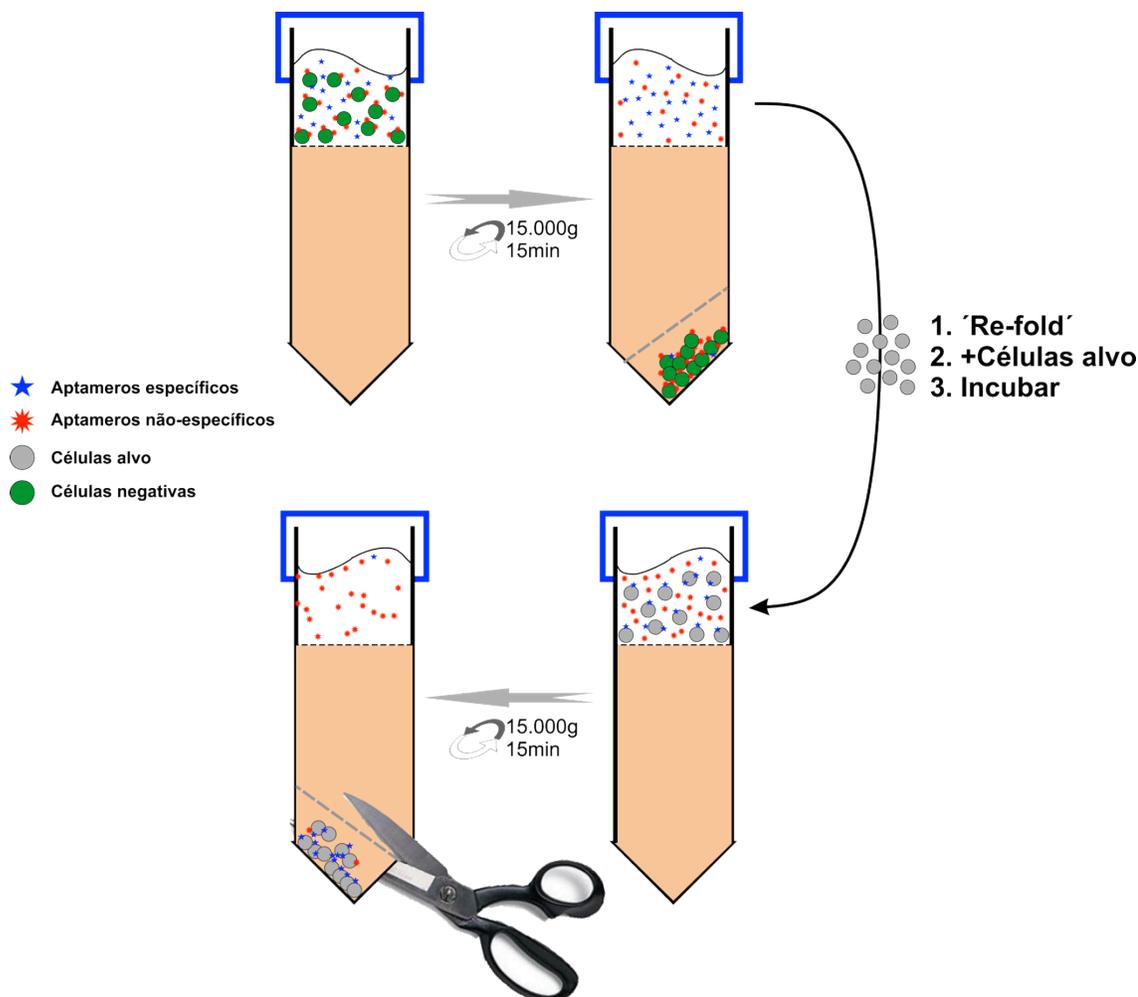


Figura 9: Modelo esquemático de um ciclo duplo realizado com o auxílio da técnica BRASIL.

3.5.3 SEQUÊNCIAMENTO E CLONAGEM.

Quando estimamos não haver mais o aumento na ligação específica, supondo que o processo seria similar a outras seleções que estabilizam sua ligação específica em torno de 12 ciclos, indicando que o “pool”, originalmente randômico, foi purificado a uma fração homogeneia de moléculas de DNA com afinidade a células tronco, conforme confirmado em ensaios de citometria, seguimos para o passo de identificação de aptâmeros.

A clonagem e o sequenciamento seguiram de acordo com os seguintes protocolos: a ligação foi feita de acordo com o protocolo sugerido pela empresa Promega, para o plasmídeo P-GEM T Easy, a 4°C por

12 horas para atingirmos o maior número de transformantes, a transformação seguiu o protocolo onde 20µl da ligação foi adicionado a 80µl de tampão de transformação (contendo 1ml de 10x KCM, 1,5ml 10% poli-etileno-glicol 6000 e 7,5ml de H₂O, sendo que a solução de 10x KCM consiste em 1M KCl, 0,3M CaCl₂ e 0,5M MgCl₂), adicionado a isso 100µl de bactérias competentes DH5α para transformação salina e deixados em gelo por 30 minutos, então colocados a temperatura ambiente por 10 minutos, assim adicionamos 1ml de meio Luria-Bertani (LB) e incubados a 37°C por 1 hora, e então foi plaqueado 100ml em placas LB ágar, com IPTG/X-GAL/Ampicilina.

A extração de plasmídeo seguiu de acordo com o protocolo de kits comerciais, e a reação de sequenciamento seguiu o seguinte protocolo, 100ng de DNA plasmidial, 1ul de *primer* forward M13 de sequenciamento (100pmol/ul), 3ul de Tampão de seleção 5x (350 mM Tris-HCl (pH 9) e 2.5 mM MgCl₂), 2ul de Big Dye 3.1, completando para um volume final de 15ul com água. A reação seguiria por 2 minutos a 95°C, e 40 ciclos com 95°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos e 60°C por 4 minutos, com uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

3.5.4 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE APTÂMEROS

As análises de sequências de aptâmeros foram feitas com o auxílio do Dr. Tiago José Paschoal Sobreira, atualmente no LNBio, Campinas. O processo foi realizado através do desenvolvimento de uma ferramenta computacional que procurava por mínimos alinhamentos comuns dentro das porções randômicas das populações de sequências obtidas nos sequenciamentos, tanto de R12 quanto de BR5.

A ferramenta procedia alinhando-as e assim criando uma planilha de alinhamentos de acordo com similaridade. Dessa forma pudemos achar as sequências que consideramos para os experimentos funcionais de acordo com a conservação da região randômica e diversidade dos “*pools*”.

As famílias observadas eram verificadas também quanto a sua estrutura para verificar se as sequências encontradas remetiam a estruturas equivalentes. A parte estrutural das sequências foi feita utilizando o software online mFold (Zuker 2003) em sua versão para DNA, utilizando como

discriminadores as mesmas concentrações salinas de Na^+ e Mg^{2+} presente no tampão de seleção. Apenas as estruturas com a menor energia livre de Gibbs (ΔG) foram exibidas.

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO PARA CÉLULAS TRONCO

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados no equipamento BD FACS Calibur (BD Biosciences, California, USA), localizado no InCor/HC-USP.

A incubação das células tronco marcadas com aptâmeros anexados com fluoróforo (FITC) foram passadas no aparelho afim de verificar a produção de duas populações distintas, células sem marcação e com marcação de aptâmeros. Além disso realizamos duplas e triplas marcações com CD29 e CD90, clássicos marcadores dessa células, mais aptâmeros, para verificar se nossos aptâmeros marcavam uma população positiva para esses antígenos, e finalmente com CD34 e CD45 para verificar se realmente nossas células eram negativas para esses antígenos.

Para os experimentos foram utilizadas 2×10^6 células juntamente com os anticorpos necessários para cada uma das marcações desejadas. Foram utilizados lasers para os comprimentos de FITC (λ_{max} 488 nm λ_{em} 520 nm, detectados por um filtro Long Pass) e os secundários utilizados para os antígenos de superfície eram APC (ex.: 633 nm; em.: 660 nm) e PE-Cy7 (ex.: 488 nm; em.: 767 nm), respectivamente para CD29 e CD90, assim como CD34 e CD45. Todos os anticorpos foram adquiridos da própria BD Biosciences.

As análises foram realizadas tanto no programa do citômetro quanto no programa Cyflogic (freeware - <http://www.cyflogic.com>) e o processo de *gating* foi realizado a partir das células sem marcação e marcadas com CD29 e CD90, como demonstrados na seção Resultados dessa tese. Assim pudemos discriminar o que eram células tronco, para em seguida verificar a marcação com o aptâmero no canal FL1. Os gates para CD34 e CD45 seguiram o mesmo processo.

Foram realizadas compensações para não haver vazamento de sinal, os quais foram feitas no software do equipamento antes da avaliações com tripla marcação, as compensações seguiram utilizando

cada um dos anticorpos incubados com as células individualmente e depois aos pares para verificar que os parâmetros adotados para cada um dos canais não interferia nos de outros canais.

As especificações para marcação das células com os anticorpos seguiu os protocolos do fabricante de acordo com o *datasheet* de cada anticorpo. As marcações positivas para CD29 e CD90 e negativas para CD34 e CD45 foram previamente publicadas por Dariolli e colaboradores (Dariolli et al 2013).

3.7 PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO POR APTÂMEROS

A fim de realizar a prova de conceito da utilização das sequências de DNA acopladas a nano-partículas magnéticas para purificação de células tronco, partimos do material reservado dos ciclos R12 e BR5 (aproximadamente 20%) que foram amplificados utilizando o PR biotilado (como explicado anteriormente), purificamos a banda correspondente dos aptâmeros no gel desnaturante (desta vez a banda contendo o *primer* biotilado). Seguimos com sua eluição e purificação, quantificamos o material obtido e seguimos as instruções do fabricante das nano-partículas magnéticas (MagPrep® Streptavidin Beads - EMD Millipore) para o devido acoplamento na proporção de uma biotina para uma estreptavidina e subsequente utilização.

As células foram obtidas frescas de um lipoaspirado processado, mas ao final ainda tínhamos tanto as células aderentes quanto não aderentes no tubo. Incubamos as bibliotecas (R12 e BR5) com as células mimetizando um ciclo normal, utilizando tampão de seleção (razão pelo qual ele mimetiza condições extracelulares) com a adição de 1mM de glicose para manutenção da viabilidade celular.

Após 25 minutos de incubação, as células foram adicionadas a tubos eppendorf de 2,0ml e colocados no magneto para tubos recomendado para o fabricante das partículas. As amostras foram deixadas para a ação da força magnética sobre os beads por 5 minutos e conseqüentemente atrair as moléculas para o lado do magneto, e dessa forma esperávamos trazer contiguamente as células tronco mesenquimais.

O material que não migrou para a lateral do tubo foi retirado, sendo que o material que ficou na lateral do tubo foi lavado com tampão de seleção com glicose. O processo de separação magnética e

lavagem foi repetido mais 2 vezes para então adicionarmos meio de cultura e levarmos as células para cultura. As fotos foram tiradas 48 horas depois do experimentos após a troca de meio para eliminar os beads magnéticos.

4 RESULTADOS

4.1 DIFERENCIAÇÃO NEURAL

4.1.1 OBTENÇÃO DE MORFOLOGIA E FENÓTIPOS NEURAIS.

Após a indução de diferenciação neural, foi verificado o aparecimento de fenótipos neuronais nos quais eram expressas proteínas específicas de neurônios e receptores de neurotransmissores, dados que mostravam a evolução de características neurais nas CTM-TA. Essas características visuais, se mantiveram com CTM-TA de diversos pacientes.

De maneira geral, as células se mantinham durante os primeiros 2-4 dias do processo de diferenciação, após esse período se observou um alta taxa de apoptose (20% por dia aproximadamente, dado não mostrado). Esse motivo nos fez considerar apenas os 6 primeiros dias da diferenciação para questões de investigação de critérios genotípicos e funcionais dessas células.

Essas modificações morfológicas são possíveis de se observar nas células, das não diferenciadas (Figura 10A) para as no segundo dia de diferenciação (Figura 10B), e o aparecimento, mesmo que pouco frequente (aproximadamente 20% das células diferenciadas), de longas extensões de neuritos (extensões de células neurais os quais ainda não se sabem ser axônios ou dendritos), tendo diversas vezes o tamanho do corpo celular das mesmas (Figura 10C).

Durante nossos experimentos obtivemos resultados positivos para a presença de marcadores de neurônios (Figura 10 NeuN (D-E), β III-tubulina (F-G), MAP-2 (H-I) e NF-200 (J-K)) já nos primeiros dias de diferenciação, mas não tivemos a marcação para proteínas específicas de glia (GFAP e S100) ou outras células de suporte, o que poderia explicar a taxa de apoptose (Corty and Freeman 2013).

Além da morfologia neural observado ao longo dos 6 primeiros dias da diferenciação, sendo que essas proteínas aparecem em dias iniciais da diferenciação .

Assim, o processo que desenvolvemos para tentar estimular as nossas células a se diferenciarem em neurônios se mostrou satisfatório do ponto de vista de produzir fenótipos neurais e que de fato passavam a expressar proteínas específicas de neurônios.

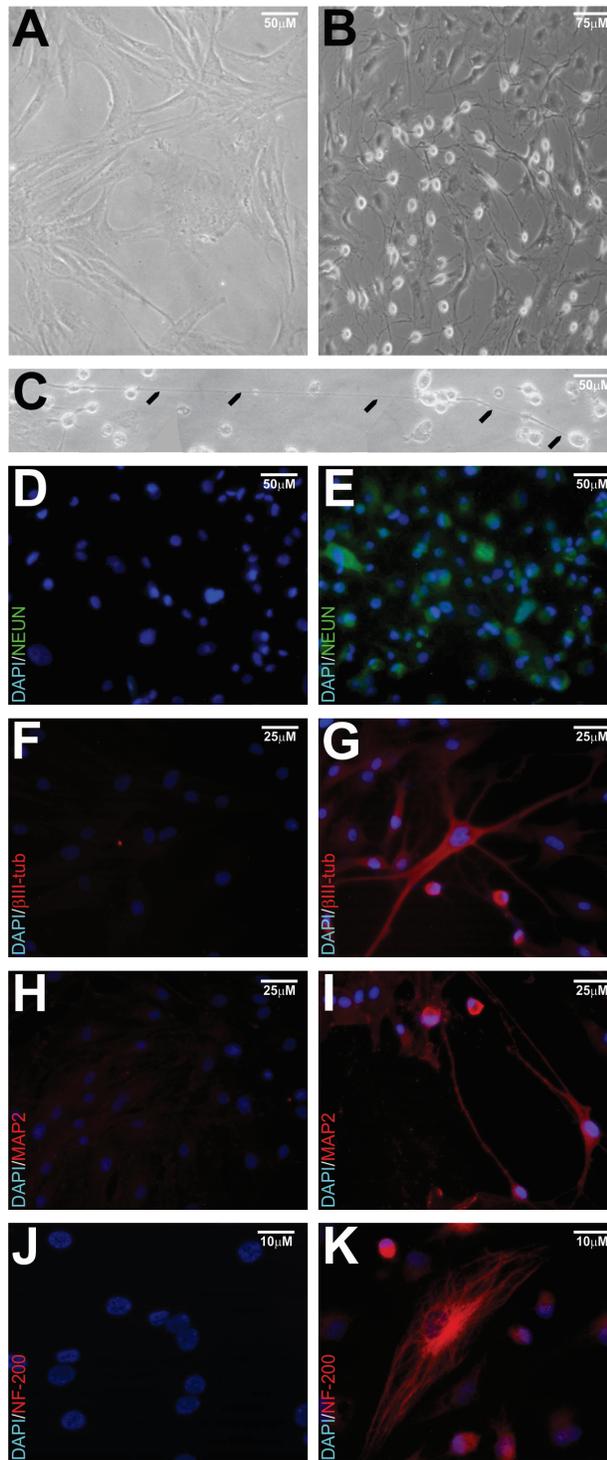


Figura 10: Diferenciação de células tronco mesenquimais em fenótipos neurais. A – Células não diferenciadas, B – Células no segundo dia de diferenciação, C – Exemplo de prolongamento de neurito compreendendo diversos campos focais, D – DAPI, E – Marcação sobreposta de DAPI e NeuN, F – DAPI, G – Marcação sobreposta de DAPI e β III-tubulina, H – DAPI, I – Marcação sobreposta DAPI e MAP-2, J – DAPI, K – Marcação sobreposta DAPI e NF-200.

4.1.2 *FUNCIONALIDADE E ATIVIDADE DE CANAIS DE NEUROTRANSMISSORES*

Prosseguimos com a verificação da possível responsividade dessas células em induzir fluxos intracelulares de cálcio e correntes de íons após estimulação por neurotransmissores, pois já tínhamos evidências de células com morfologia de neurônios e que expressavam marcadores específicos desse tipo celular.

Passamos então a empregar a técnica de eletrofisiologia (modalidade Whole-cell recording) e estimulação com neurotransmissores através de whole-cell recording em conjunto com a técnica cell-flow (Hess et al. 2000), utilizando diversos neurotransmissores, entre eles acetilcolina (utilizando seu análogo estável carbamoilcolina, CCh), nicotina, NMDA (N-metil D-aspartato), glutamato, ATP (adenosina trifosfato) e GABA (ácido gama-aminobutírico) todos testados na concentração de 1mM.

Obtivemos respostas de maneira muito heterogênea entre as células, onde algumas respondiam com correntes elevadas (mais de 1nA) e outras não respondiam, sendo utilizado diversos agonistas, porém a obtenção de uma medida de resposta populacional por eletrofisiologia clássica era limitada, principalmente por não ser uma técnica desenhada para estudos com populações de células, por isso partimos para a utilização de uma técnica que nos permitisse validar de maneira mais abrangente a responsividade da nossa diferenciação.

Foi então que passamos a utilizar imageamento de cálcio em microscópio de fluorescência e assim obter uma visão de maior amplitude sobre a responsividade da população celular para neurotransmissores que causam influxo de íons positivos (Figura 11), comparando o estado não diferenciado do diferenciado já no segundo dia do processo de diferenciação neuronal.

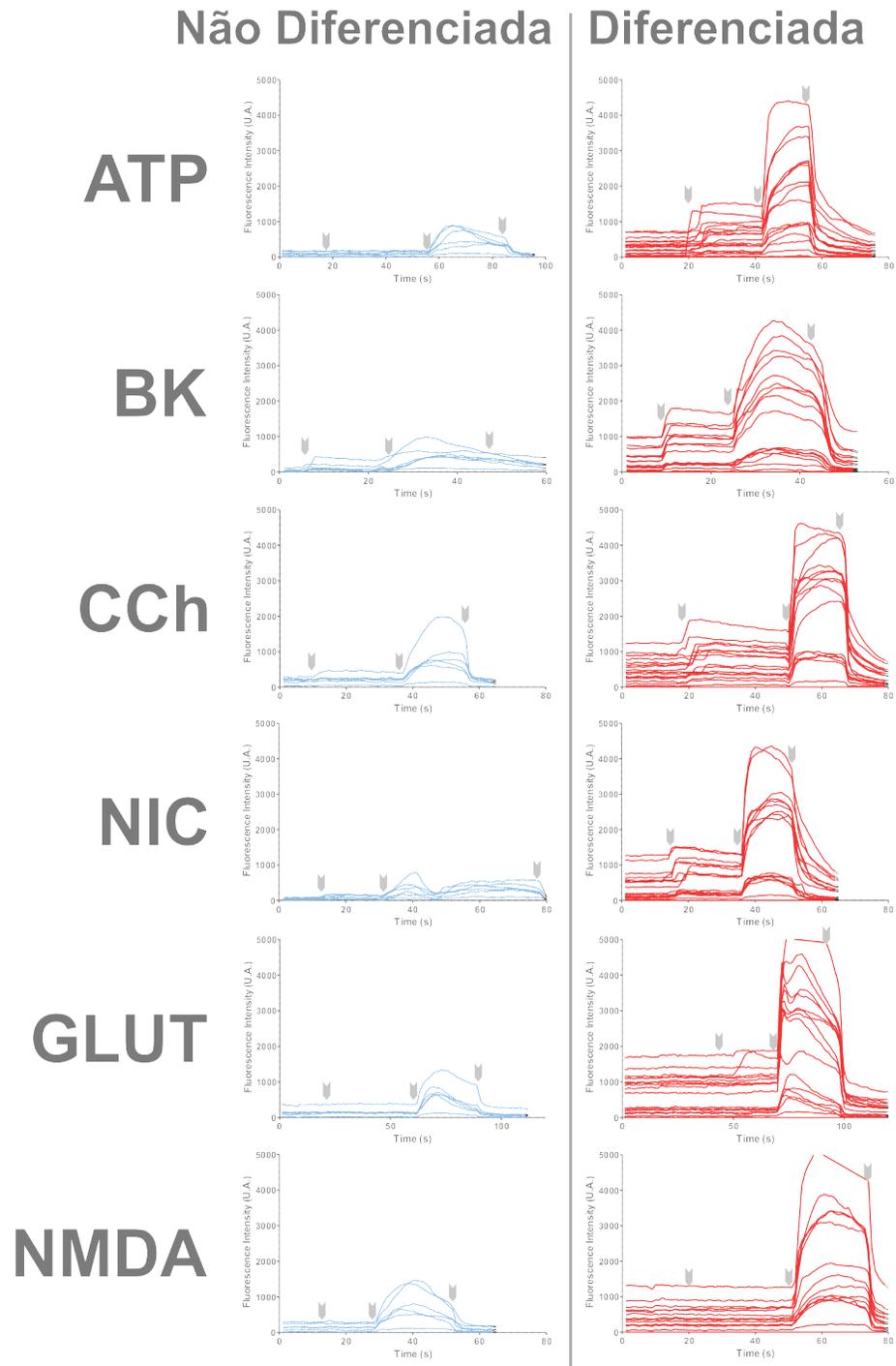


Figura 11: Responsividade a neurotransmissores das células mesenquimais de tecido adiposo diferenciadas, em estado não diferenciado e diferenciado (segundo dia da diferenciação).

As células se mostraram responsivas a partir do primeiro e segundo dia de diferenciação (quando foram realizados os experimentos) para ATP, BK (bradicinina), CCh e nicotina, porém não mostraram

responsividade para glutamato e NMDA (Figura 11). É possível verificar a resposta para cada um dos neurotransmissores em cada um dos dois primeiros dias da diferenciação nos Anexos I, II e III. Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes, em experimentos de diferenciação distintos, com células de pacientes diferentes.

Essas respostas foram quantificadas de acordo com a fórmula I descrita na seção materiais e métodos (Figura 12), sendo os neurotransmissores que estimularam a melhor resposta ATP, BK e Nicotina.

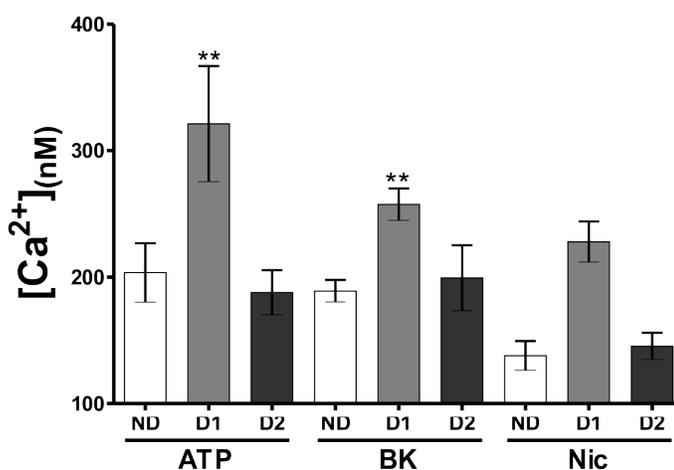


Figura 12: Análise da responsividade a neurotransmissores ao longo do início da diferenciação. Ao longo do processo de diferenciação podemos verificar um aumento do influxo de cálcio ocasionado pela aplicação dos neurotransmissores. Os valores representam a concentração citosólica de cálcio máxima, para ao menos 12 células por experimento, com dois experimentos realizados para cada neurotransmissor. Utilizamos para os experimentos uma concentração de 1mM para todos os agonistas, considerando uma concentração que garantiria a abertura completa dos receptores em questão.

4.1.3 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE NEUROTRANSMISSORES AO LONGO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL.

Com a evidência de que o processo de diferenciação não apenas produzia células com morfologia, com marcação de proteínas específicas e com responsividade a neurotransmissores já no início do processo, passamos para uma investigação do perfil de expressão indo do estado não diferenciado até o sexto dia da diferenciação.

Analisamos algumas famílias de receptores neurais classicamente envolvidos com a neurotransmissão, como receptores de glutamato (NMDA e AMPA), GABA, acetilcolina e purinérgicos (Burel-Jungerman et al. 2011, Gupta et al. 2013) além dos receptores de bradicinina o qual veem sendo alvo de estudos pelo laboratório por demonstrarem que podem modular a diferenciação neural em modelos de células pluripotentes P19 e em células tronco neurais (Martins et al 2005, Martins et al 2008; Trujillo et al 2012). Os subtipos dos receptores estudados estão listados na Tabela 2.

Além da expressão gênica desses receptores também foi estudada a expressão gênica relacionada ao sistema de produção de óxido nítrico, da família das enzimas da óxido nítrico sintases (neural - nNOS, endotelial - eNOS e induzida - iNOS) assim como a argininosuccinato sintase (ASS) envolvida na produção de citrullina no ciclo de produção de óxido nítrico mas que é expressa principalmente em células de rim e fígado. Dessa forma, a evidência de presença do sistema NOS reforçaria a hipótese de diferenciação neural, como por exemplo aumento de nNOS e diminuição de ASS (Lameu et al 2012).

Tabela 2: Denominação dos genes investigados

<i>Família de receptores</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Mecanismo de Ativação</i>	<i>Nome</i>	<i>Agonista Clássico</i>	<i>Genes Analisados</i>
Glutamatérgicos	<i>AMPA</i>	<i>Ionotrópicos</i>	<i>GRIA</i>	<i>Glutamato</i>	<i>GRIA1, 2, 3, 4</i>
	<i>NMDA</i>	<i>Ionotrópicos</i>	<i>GRIN</i>		<i>GRIN1, 2a, 2b, 2c</i>
	<i>mGlu</i>	<i>Metabotrópicos</i>	<i>GRM</i>		<i>GRM1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8</i>
Colinérgicos	<i>Nicotínicos</i>	<i>Ionotrópicos</i>	<i>CHRNA</i>	<i>Acetilcolina</i>	<i>CHRNA 2, 3, 4, 5, 6, 7</i>
	<i>Muscarínicos</i>	<i>Metabotrópicos</i>	<i>CHRM</i>		<i>CHRM 1, 2, 3, 5</i>
Gabaérgicos	<i>GABA A</i>	<i>Ionotrópicos</i>	<i>GABR</i>	<i>Ácido γ-amino butírico</i>	<i>GABRA1, 2, 3, 4, 5, 6; GABRB1, 2, 3; GABRD, GABRE, GABRP, GABRG1, 2, 3</i>
Purinérgicos	<i>P2X</i>	<i>Ionotrópicos</i>	<i>P2X</i>	<i>ATP</i>	<i>P2RX2, 3, 4, 5, 6, 7</i>
	<i>P2Y</i>	<i>Metabotrópicos</i>	<i>P2Y</i>		<i>P2RY1, 2, 4, 6, 12</i>
Cininas	<i>B1 e B2</i>	<i>Metabotrópicos</i>	<i>BDKR</i>	<i>Bradicinina</i>	<i>BDKRB1/BDKRB2</i>

A

expressão da enzima produtora de óxido nítrico

neural (nNOS) se correlaciona com padrões de diferenciação neural e com o “*timing*” e grau de produção de cGMP tendo sido mostrado principalmente em modelos in vivo como *Zebra fish* (Holmqvist et al 2004). Ainda corroboram com essa hipótese o trabalho de Lameu e colaboradores (Lameu et al 2012) onde fica demonstrado que o bloqueio de nNOS em neuroesferas, anula o processo de diferenciação.

Dessa forma, passamos para a identificação da expressão desses genes, inicialmente por PCR normal, onde os genes que mostrassem algum nível de expressão seriam verificados por PCR quantitativo. Os resultados dos PCR normais não são demonstrados nessa tese apenas dos genes que de fato apresentaram expressão e puderam ser quantificados por PCR real-time (veja o Anexo IV para os primers utilizados).

Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes, em experimentos de diferenciação distintos, com células de pacientes diferentes.

Obtivemos resultados que demonstraram um aumento da expressão de um grupo de genes após a indução da diferenciação (Figura 13) assim como um grupo que apresenta diminuição nos níveis de expressão (Figura 14). Dentre os genes que tiveram aumento de expressão estão os genes do receptor B1 (BDKRB1) e B2 (BDKBR2) de bradicinina, o receptor de acetilcolina alfa 7 (CHRNA7) sendo o membro da família dos receptores de acetilcolina com a maior permeabilidade a cálcio, importante mensageiro secundário para o processo de diferenciação (Nery et al 2010; Broide et al 1999; Shen et al 2013). Esses receptores mostraram um aumento de expressão de até 3 vezes quando comparado às células não diferenciadas.

Outro grupo de receptores cuja expressão gênica se encontra aumentada, são os receptores muscarínicos de acetilcolina M1, M3 e M4 (CHRM1, CHRM3 e CHRM4) respectivamente que demonstram um aumento ainda mais pronunciado, chegando a 6 vezes quando comparado às células não diferenciadas.

Outros receptores que apresentaram aumento de sua expressão são, o receptor de glutamato metabotrópico de AMPA 2 (GRM2) com aumento de 3 vezes ao final da diferenciação, o receptor de GABA tipo A subunidade 3 (GABRA3), com duas vezes de aumento.

Entre a família de receptores purinérgicos, as subunidades P2X3 (P2XR3), P2X5 (P2XR5) dentre os canais iônicos e o tipo metabotrópico P2Y4 (P2YR4) apresentaram um aumento na faixa de 2 a 3 vezes. A exceção do painel, o único receptor listado que demonstra diminuição de expressão, é o receptor P2X4 (P2XR4) que classicamente tem sua expressão diminuída em células neuronais ou que entraram em diferenciação neuronal (Resende et al 2007 e 2008).

Três genes se destacaram dentre o painel de genes que demonstrou aumento de expressão, o receptor P2Y1 (P2YR1) mostrou um aumento de expressão da ordem 30 vezes no quarto dia do processo

de diferenciação, a enzima nNOS (NOS1) teve um aumento de expressão de 20 vezes ao fim do processo e o receptor ionotrópico de AMPA subunidade 2 (GRIA2) teve um aumento de mais de 80 vezes ao final do processo de diferenciação.

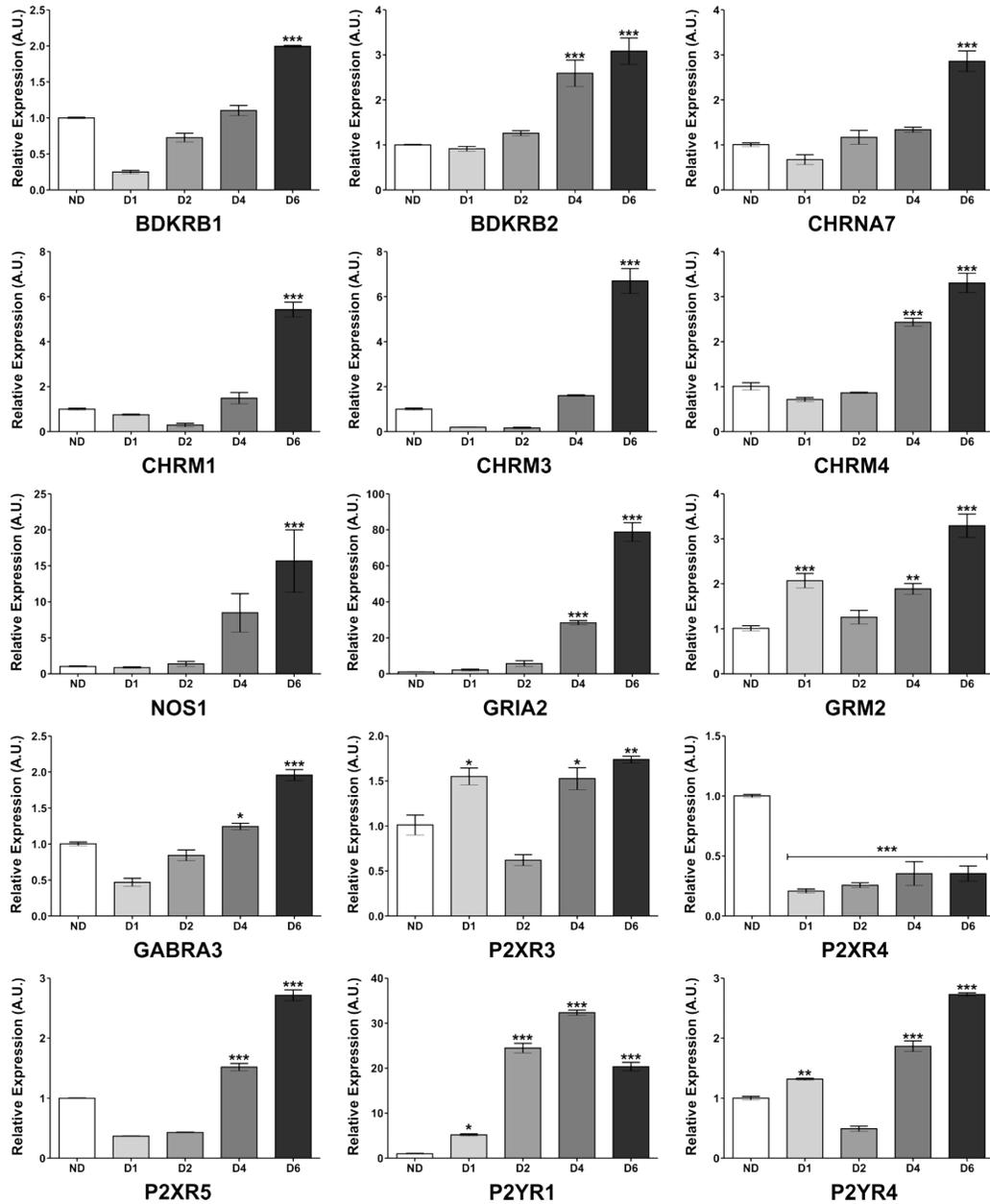


Figura 13: Perfil de expressão de genes que apresentaram aumento de expressão durante o processo de diferenciação neural, o método utilizado está descrito na seção de materiais e métodos (item 3, subitem 3.2).

Assim como houve um aumento de expressão de alguns genes, houveram genes que tiveram sua expressão diminuída e em alguns casos quase que silenciadas durante o processo de diferenciação neural, mas outros genes não mudaram significativamente a sua expressão ao longo da diferenciação (Figura 14).

Alguns dos genes que mostraram uma diminuição pequena, mas ainda estatisticamente significante de expressão, foram os receptores de acetilcolina nicotínicos alfa 6 e beta 2 (CHRNA6 e CHRNB2, respectivamente) os receptores de acetilcolina muscarínicos M2 (CHRM2) e M5 (CHRM5), o receptor ionotrópico de AMPA subunidade 3 (GRIA3), os receptores purinérgicos P2X1 (P2XR1), P2X6 (P2XR6), P2Y2 (P2YR2) , P2Y12 (P2YR12) , P2Y13 (P2YR13) e P2Y14 (P2YR14).

Dentre os genes que mostraram uma queda nos seus níveis de expressão se encontram alguns que praticamente foram silenciados durante o processo como o receptor de acetilcolina alfa 3 (CHRNA3) e os receptores purinérgicos P2X1 (P2XR1), P2X7 (P2XR7) e P2Y6 (P2YR6) além da enzima arginil succinato sintase (ASS). A exceção do painel é a subunidade beta 4 dos receptores de acetilcolina nicotínicos (CHRNB4) que demonstrou ligeira alta de expressão mas com grande variação durante os experimentos (os quais foram realizados para células oriundas de pelo menos 3 pacientes diferentes entre as passagens 3 e 7).

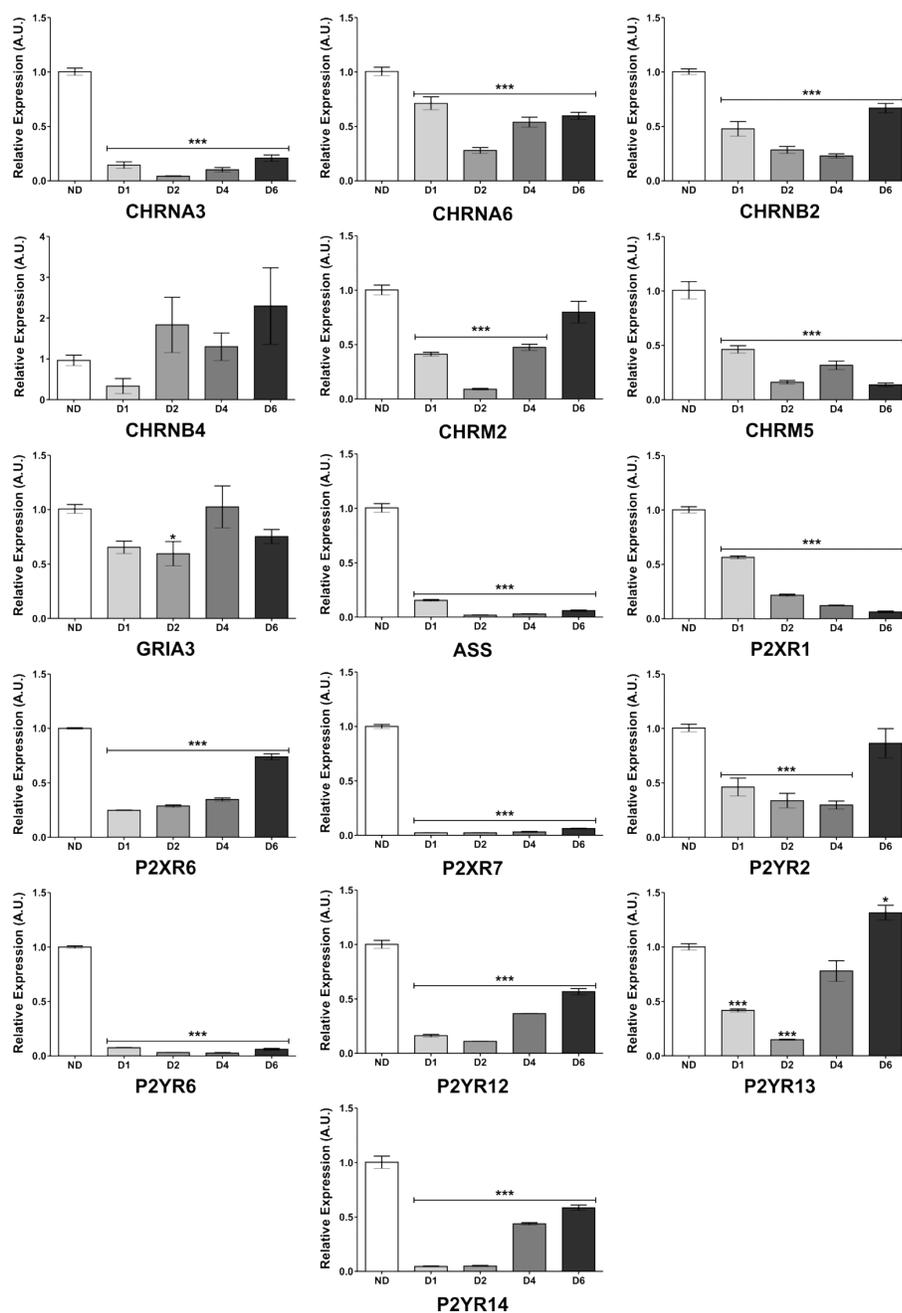


Figura 14: Perfil de expressão de genes que apresentaram diminuição de expressão durante o processo de diferenciação neural, o método utilizado está descrito na seção de materiais e métodos (item 3, subitem 3.2).

Durante os experimentos de funcionalidade, uma das evidências mais marcantes foi a ausência de potencial de nas células diferenciadas, sugerindo que por mais que tivéssemos morfologia, expressão de marcadores específicos, funcionalidade de receptores de neurotransmissores assim como modulação da expressão desses ao longo da diferenciação, não tivéssemos um processo completo de diferenciação em

neurônios funcionais. Dessa forma, investigamos expressão de três fatores de transcrição que haviam sido relacionados recentemente com a indução direta de fibroblastos para neurônios em um processo análogo ao realizado com as células iPS (induced pluripotent stem cells) (Lujan and Wernig, 2012; Lujan et al 2012; Yang et al 2011; Pang et al 2011; Vierbuchen et al 2010). A variação da expressão dos genes MYT1, POU3F2 e ASCL1 ao longo da diferenciação é demonstrada na Figura 15.

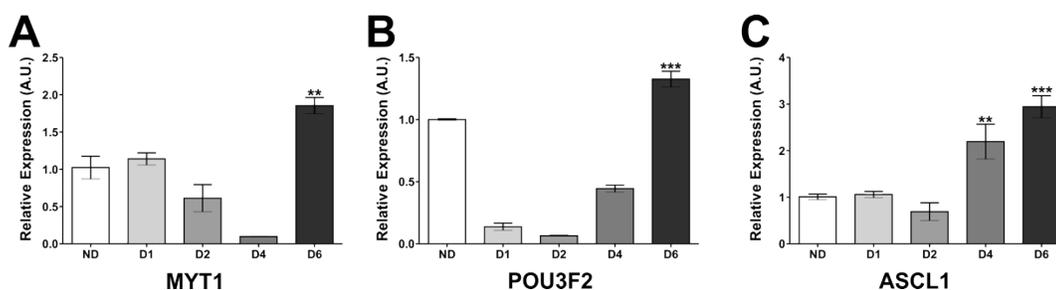


Figura 15: Perfil de expressão de fatores de transcrição específicos para neurônios durante o processo de diferenciação neural, o método utilizado para quantificação relativa da expressão está descrito na seção de materiais e métodos (item 3, subitem 3.2).

4.2 SELEÇÃO DE APTÂMERO

4.2.1 PADRONIZAÇÕES

Para iniciar a técnica SELEX os oligos obtidos por síntese química foram avaliadas quanto sua pureza e capacidade de formar a dupla fita em reação de PCR (Figura16).

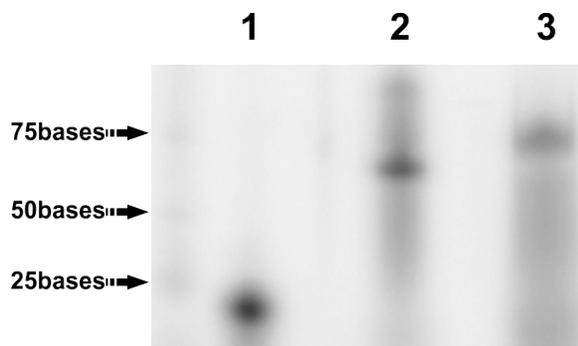


Figura 16: Marcação dos oligos envolvidos no processo de seleção de aptâmeros. **1)** Primer anti-sense com 20 pares de base, o protocolo de marcação do primer foi feito de acordo com o fabricante da enzima T4 quinase (Fermentas, Thermo Scientific, La Jolla, CA), através da reação de troca do fosfato (Exchange reaction) tendo como base o [32P]- γ -dATP. **2)** Biblioteca simples fita marcada, o protocolo de marcação do primer foi feito com T4 Kinase através da reação de troca do

fosfato (Forward reaction) tendo como base o $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-dATP}$. **3)** Extensão do primer marcado com biblioteca não marcada, a extensão do primer foi apenas um único ciclo de extensão a 42°C por 5 minutos, seguido de uma extensão de 72°C por 10 minutos. O tamanho esperado para a dupla fita é de 80 pares de base. O experimento foi feito em gel não desnaturante de poliacrilamida 8%.

Após o processo de marcação, verificamos que a o primer apresentava um alto grau de pureza, porém a biblioteca mostrava diversos outros tamanhos de fita, próximos ao seu tamanho de 75 bases, o que nos mostrou, inclusive com a extensão do primer marcado com a biblioteca não marcada, que dessa forma produziríamos diversos tamanhos de DNA simples fita, o que iria ser prejudicial ao processo de seleção dos mesmos.

Desta forma purificamos o biblioteca utilizando gel de acrilamida 8% desnaturante, porém sem utilizarmos brometo ou marcação radioativa, nos utilizamos da técnica de “shadowing”, que consiste em emitir UV sobre uma placa de cromatografia, que fica fluorescente (Herrera et al 1989) (Figura 17).

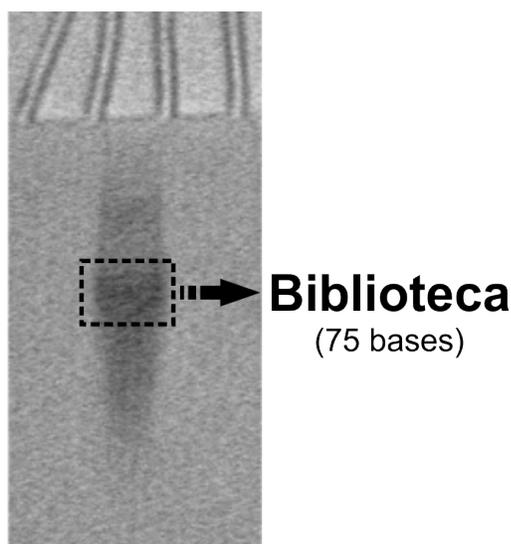


Figura 17: Purificação da biblioteca por eluição da banda cortada do gel, visualizada por “shadowing”. A área tracejada indica o local do corte da banda que posteriormente foi eluída. Gel de acrilamida 8% desnaturante.

Após a purificação realizada, novamente realizamos uma marcação, como descrito na Figura 18, para avaliar a purificação da biblioteca e a extensão do primer, e verificamos que havíamos obtidos resultados bastante satisfatórios comparados com os anteriores quanto à biblioteca, mas a formação de dupla fita (reação de primer extension) ainda produziu fitas de menores tamanho (Figura 18),..

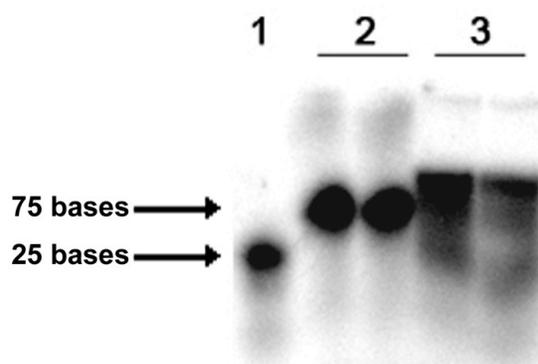


Figura 18: A verificação do primer **(1)** da purificação da biblioteca que se mostrou satisfatória **(2)**, porém o mesmo não aconteceu com a extensão radioativa do primer, com a biblioteca não marcada **(3)**, mostrando a necessidade de padronização da reação de PCR para produção de amplicons com tamanho único.

O processo de padronização da técnica SELEX, continuou com a necessidade de obtermos um protocolo de amplificação da biblioteca randômica que não produzisse tamanhos menores do que a biblioteca originalmente tinha, problema detectado nas marcações para verificação da integridade dos oligonucleotídeos. Os resultados mostraram que a adição de betaína 1M e DMSO 5% levaram a uma amplificação mais eficiente (Figura 19), sem a produção de outros tamanhos.

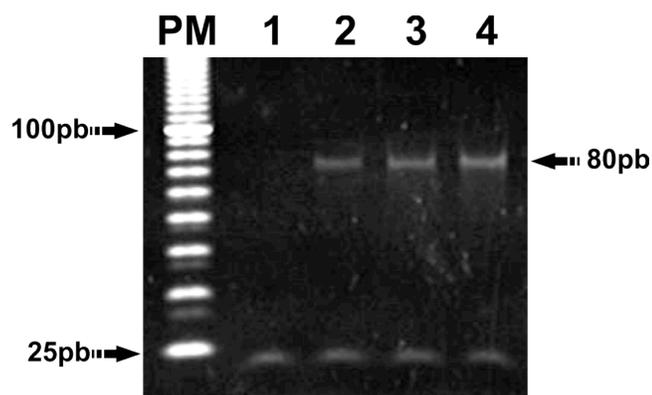


Figura 19: Padronização dos aditivos para PCR, onde temos 1M de betaína para todas as bandas com adições crescentes de DMSO, sendo **1)** 2%, **2)** 3%, **3)** 4% e **4)** 5%. Gel 8% de acrilamida não desnaturante. A banda de 80pb representa o tamanho determinado para a amplificação da biblioteca e a de 20pb o excesso de primers colocado na reação de teste.

A partir desse ponto, tivemos de nos assegurar que a amplificação com o primer biotinilado realmente iria produzir uma diferença significativa para a separação das bandas no passo de purificação e eluição da biblioteca. Para isso fizemos uma amplificação mostrando que com primer biotinilado, mesmo em um gel não desnaturante e o DNA em dupla fita, já podíamos ver uma diferença suficiente para

diferenciação dos tamanhos (Figura 20).

A diferença entre os tamanhos se mostrou suficiente para em um gel de maior tamanho diferenciar as duas fitas, a com primer biotinilado e a outra com primer não biotinilado, sendo essa última as sequências de interesse para utilizarmos no processo de seleção *in vitro*.

Isso se mostrou como uma melhoria significativa para a técnica, pois nos livramos de um limitante que seria a adição para cada separação de estreptavidina, o que diminuiu os custos e o tempo despendido para cada separação de fitas (Daniels et al 2003). Assim a simples separação das fitas por eletroforese desnaturante poderia nos fornecer as sequências de DNA simples fita, oriundas da fita amplificada com primer sem biotina, necessárias para a continuidade do processo.

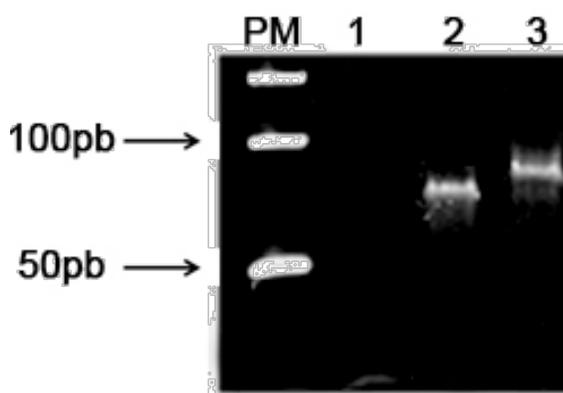


Figura 20: Padronização da amplificação das fitas com primer sense biotinilado, sendo **1)** amplificação sem o template, a fim de mostrar que não tínhamos amplificação entre os primers em nossas reações, **2)** amplificação com os primers normais, **3)** amplificação usando o primer sense biotinilado. Gel 8% de acrilamida não desnaturante de 7cm.

Por mais que tivéssemos padronizado a reação de PCR, ainda faltava um detalhe, otimizar o número de ciclos para tingirmos a maior produção de massa de DNA sem incorrer em reações limitantes, assim não teríamos a amplificação viciada de algumas sequências em detrimento de outras, prejudicando dessa forma a dinâmica populacional entre as sequências durante os ciclos, pois teríamos a diminuição da heterogeneidade da biblioteca independente da seleção contra o alvo.

Para atingirmos esse objetivo, nos utilizamos de uma padronização prévia, onde fizemos reações de

amplificação utilizando nucleotídeos radio marcados e não radio marcados para testarmos dois pontos: 1. a incorporação de nucleotídeos durante o PCR, verificando em qual ciclo de amplificação atingimos uma reação saturante e 2. a verificação de possíveis multímeros durante a amplificação. Verificamos que para uma massa inicial de biblioteca aleatória a ser utilizada para a seleção de 2 fmol em 100µl de reação, a faixa entre 18 e 20 ciclos é o ideal (Figura 21).

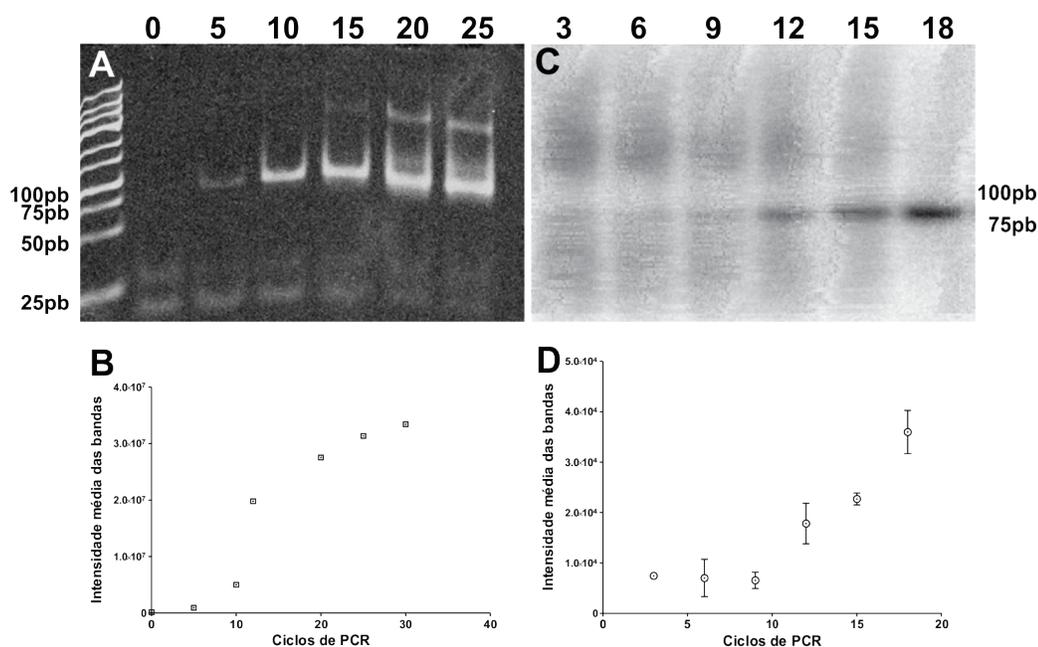


Figura 21: Padronização dos ciclos de amplificação. **A** - Amplificações de biblioteca não radio marcadas, feitos em intervalos de 5 ciclos de PCR (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30). **B** - O gráfico mostra a quantificação das bandas presentes no gel onde as amplificações não foram radio marcadas, feitas a partir do software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). **C** - O painel da direita mostra as amplificações de biblioteca radio marcadas, feitos em intervalos de 3 ciclos (0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18). **D** -quantificação das bandas presentes no gel onde as amplificações foram radio marcadas, feitos em intervalos de 3 ciclos para mostrar a incorporação de nucleotídeos radio marcados. Os experimentos foram analisados em gel 8% de acrilamida não desnaturante de 7cm.

O próximo passo seria a verificação da viabilidade de separação das bandas e sua eluição, seguimos com reações de PCR, de acordo com a padronização, utilizando [α^{32}] P-dATP para a marcação radioativa, sendo avaliados em um gel desnaturante. Isso nos mostrou que a separação das fitas em um gel de 21 cm de comprimento é satisfatória e nos levou a ter apenas os dois tamanhos esperados para a separação das fitas, um maior contendo a fita simples com o primer sense biotilado e um tamanho menor contendo a biblioteca para ser eluída e utilizada para os ciclos de seleção (Figura 22A).

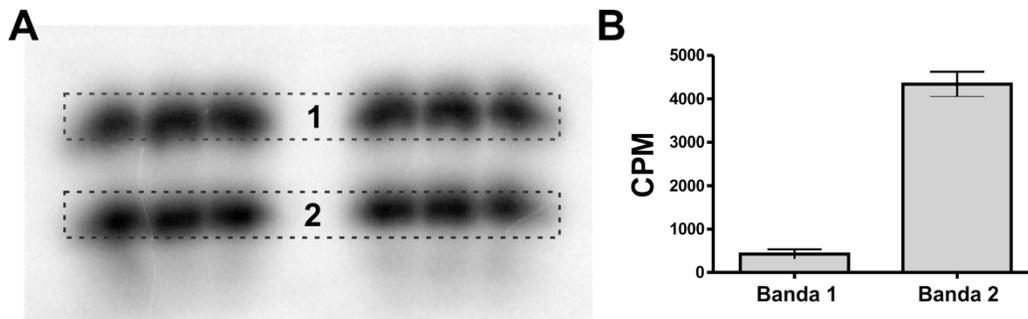


Figura 22: **A** - Separação das fitas por gel 8% de acrilamida desnaturante de 21cm, onde tivemos uma separação satisfatória das bandas para que a banda inferior fosse eluída e purificada para a utilização nos ciclos de seleção. **1** - fita biotinizada, **2** - biblioteca simples fita. **B** - Cintilação dos sobrenadantes oriundos da eluição das Bandas **1** e **2** do gel de separação, após a incubação com resina de estreptavidina-agarose. As barras indicam o desvio padrão médio de 3 experimentos.

A verificação de qual fita continha a biotina, veio ao eluímos as duas bandas presentes no gel de separação, em tubos diferentes, precipitando o DNA eluído e seguindo incubação com resina de estreptavidina-agarose, desta forma, a fita contendo biotina apresentaria menor contagem na cintilação do sobrenadante, pois após centrifugação e consequente deposição de resina no fundo do tubo, as sequências seria carregadas e o sobrenadante deveria estar livre de DNA radio marcado (Figura 22B).

De maneira complementar, a fita sem biotina, depois do mesmo processo, deveria apresentar altas contagens na cintilação, pois o DNA radio marcado ficaria no sobrenadante (Figura 22B). Para esse experimento foi padronizado 30000 CPM de cada banda eluída (contendo as fitas marcadas com $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP) nas incubações com resina, com a adição de 10 μl da resina estreptavidina-agarose (cada μl da resina se liga em 10 μmol de biotina). Após a incubação por 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação, centrifugamos as amostras por 5 minutos à 12000g e quantificamos a radioatividade retida por cintilação nos sobrenadantes.

Desta forma, pudemos afirmar que realmente a banda que aparecia no gel com maior tamanho, era a banda que continha o primer biotinizado e assim eluir sempre a banda inferior para a continuação dos ciclos.

4.2.2 *PROGRESSO DA SELEÇÃO*

Para início da seleção e ciclos subsequentes, utilizamos aproximadamente 1 μ M de biblioteca de DNA simples. Para o primeiro ciclo nos asseguramos que a marcação com $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP estava satisfatória, contendo boa quantidade e pureza da amplificação da biblioteca(Figura 23).

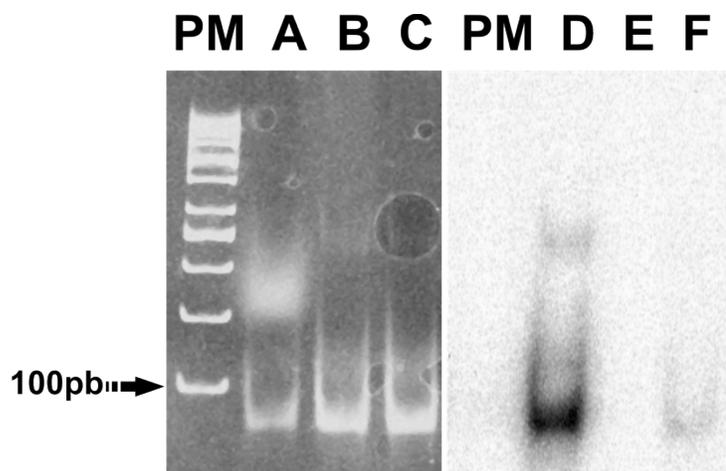


Figura 23: Amplificação inicial da biblioteca, onde algumas amplificações foram feitas na presença de $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP. Mostramos em gel de acrilamida 8% a visualização de massa obtida para cada amplificação (gel à esquerda), assim como marcação radioativa de cada banda (gel à direita). As amplificações foram realizadas através de 20 ciclos contendo os nucleotídeos radio-marcados, nos levando a produção de boa quantidade de massa e com muita marcação radioativa (**A** e **D**), as amplificações não radio marcadas apresentam maior quantidade de material amplificado, porém com nenhuma marcação radioativa (**B** e **E**) e finalmente a mistura dos dois PCR na proporção de 1:5 de PCR de radio marcado para PCR não radio marcado, apresenta massa e marcação radioativa para serem utilizadas durante as seleções(**C** e **F**).

Notamos que nas amplificações com primer $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP radio marcado, aparece no gel de acrilamida uma banda acima dos 150pb (Figura 23A), que não apresenta marcação radioativa, o que nos levou a desconsiderar tal banda depois de termos verificado que se tratava da banda de corante presente no nucleotídeo radio marcado.

Para o primeiro ciclo tivemos a eliminação da maior parte das sequências durante as lavagens, 80% da biblioteca foi eliminada nesse processo, nos restando apenas 20% da biblioteca inicial que se ligou nas superfícies das células mesenquimais do primeiro paciente (Figura 24A).

Assim passamos para a amplificação, separação e utilização da biblioteca para o segundo ciclo, onde nos utilizamos de células tronco mesenquimais de um segundo paciente, para eliminarmos variações

na assinatura molecular de membrana das células, uma vez que o perfil de epítomos é variável entre os pacientes.

No segundo ciclo (Figura 24B), restaram 2% das sequências apresentadas durante a seleção, o que sugere que efetivamente temos epítomos conservados entre pacientes e que possam vir a ser marcadores exclusivos de células mesenquimais.

O terceiro ciclo (Figura 24C) se iniciou com uma etapa de contra seleção (utilizando células não tronco como alvo) que se baseou na premissa que na biblioteca, mesmo após dois ciclos de seleção, teríamos sequências que se ligariam em sítios comuns entre células mesenquimais e células não mesenquimais presentes no processo de purificação. Para isso, separamos as células não mesenquimais presentes no sobrenadante depois de um dia de cultura a fim de usa-las como alvo dessa seleção negativa, desta forma eliminando as sequências com alvos comuns entre os dois tipos celulares (Shangguan et al 2006).

O ciclo se iniciou com a apresentação de 1,2 μM de biblioteca contra 5×10^9 células do sobrenadante sendo que aproximadamente 82% das sequências não se ligaram às células, mesmo que tenhamos apresentado quatro ordens de grandezas a mais de alvos do que normalmente utilizamos. A proporção tão elevada de células foi baseada no volume total de células e componentes do lipoaspirado não aderentes presentes no primeiro plaqueamento pós extração, com isso pretendíamos emular o cenário real da possível utilização dos aptâmeros. Ao fim do processo aproximadamente 1 μM não se ligou às células, assim pudemos continuar com uma seleção contra as células mesenquimais que foram extraídas do paciente 3, mesmo paciente que forneceu as células da contra seleção do terceiro ciclo.

Para o quarto ciclo, utilizamos as sequências oriundas do terceiro ciclo, usando-as diretamente nas células mesenquimais do paciente 3. Iniciamos o ciclo com aproximadamente 1 μM de biblioteca e ao final do ciclo, obtivemos uma taxa de eluição de apenas 63% e uma taxa de ligação nas células de 36% (Figura 24D), sendo que mesmo com o aumento do número de lavagens, tivemos o indício que a afinidade estava

aumentando ao decorrer dos ciclos, de maneira rápida (Ulrich et al 2004).

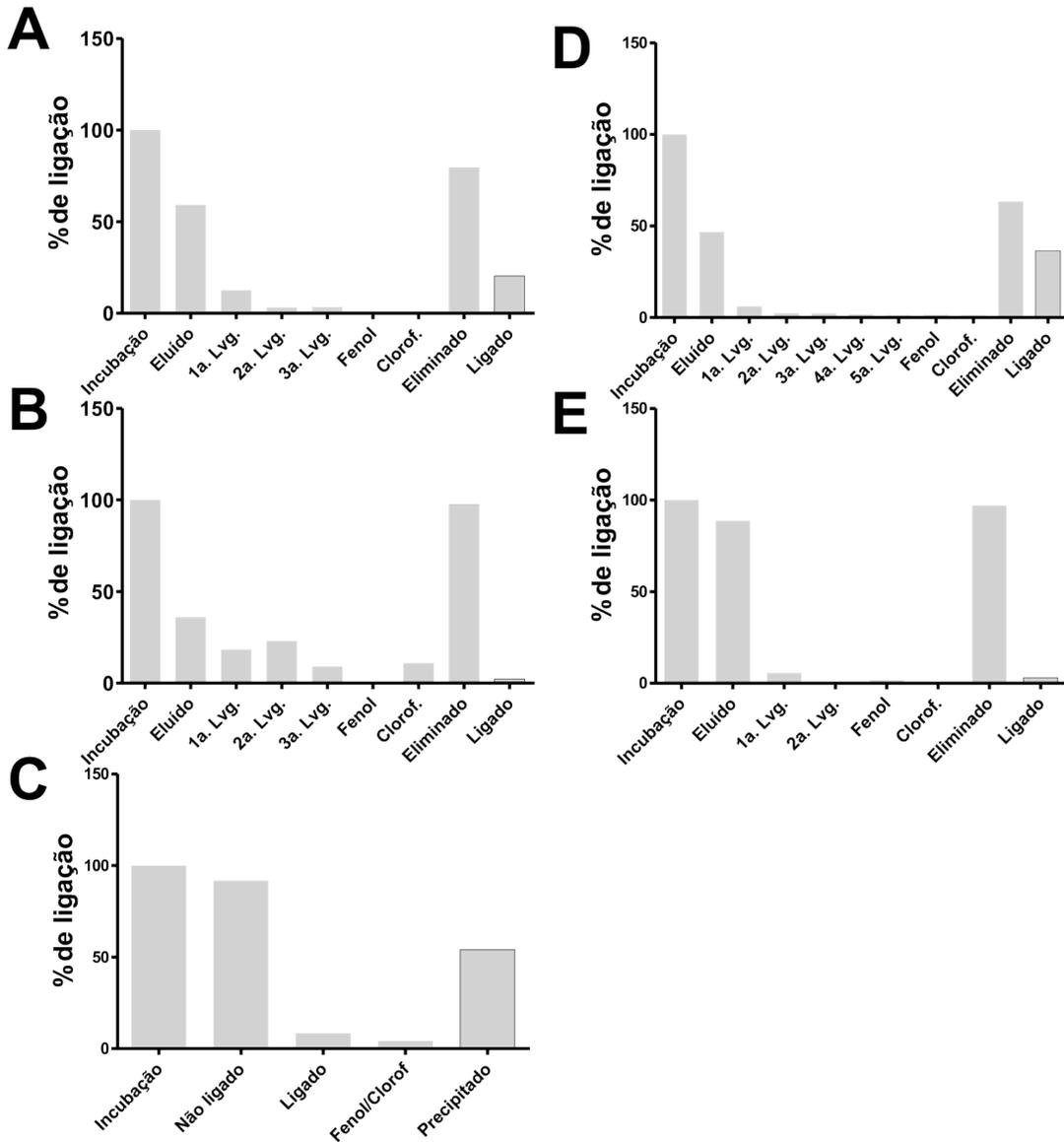


Figura 24: **A** – Determinação da porcentagem de biblioteca marcada com α^{32} -dATP ligada a cada um dos passos durante o primeiro ciclo. Neste ciclo de seleção dos $8,4\mu\text{M}$ de biblioteca que iniciaram a seleção contra células do paciente 1, apenas 20% se manteve ligado ao final do processo de seleção (eliminação de 80% das sequências) que transcorreu contra 5×10^5 células tronco mesenquimais em uma garrafa de cultura de 25cm^2 . **B** – Determinação da porcentagem de biblioteca marcada com α^{32} -dATP ligada a cada um dos passos durante o segundo ciclo. Neste ciclo de seleção contra células tronco mesenquimais do paciente 2, tínhamos $1,0\mu\text{M}$ de biblioteca que foi incubado na seleção, onde apenas 2,3% não foi retirado durante o processo (eliminação de 97,7% das sequências) que transcorreu contra 5×10^5 células tronco mesenquimais em uma garrafa de cultura de 25cm^2 . **C** – Determinação da porcentagem de biblioteca marcada com α^{32} -dATP ligada a cada um dos passos durante o terceiro ciclo. Neste ciclo tivemos a seleção contra células não-tronco do paciente 3 onde tivemos

1,2µM de biblioteca incubadas na seleção, 81,7% não se ligou às células, a seleção ocorreu contra 5×10^9 células não-tronco, oriundas do sobrenadante pós extração de uma placa de cultura de 100mm. **D** - Determinação da porcentagem de biblioteca marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP ligada a cada um dos passos durante o quarto ciclo. Neste ciclo cada tivemos a seleção contra células tronco mesenquimais do paciente 3. De 1µM de biblioteca que entraram na seleção, 63,5% não se ligou às células e obtivemos uma alta taxa de ligação nas células, de 36,5%. A seleção ocorreu contra 5×10^5 células mesenquimais em uma garrafa de cultura de 25cm². **E** - Determinação da porcentagem de biblioteca marcada com α^{32} -dATP ligada a cada um dos passos durante o quinto ciclo. Neste ciclo tivemos a seleção contra células mesenquimais do paciente 4. De 1µM de biblioteca que entraram na seleção, 97% não se ligou às células e obtivemos 3% de ligação às células. A seleção ocorreu contra 5×10^5 células tronco mesenquimais em uma garrafa de cultura de 25cm², contendo 100µg/ml de t-RNA de levedura como competidor inespecífico. Os gráficos mostra % CPM relativo à solução de incubação contendo a biblioteca de DNA radio marcada com α^{32} -dATP, 1ª.Lvg - valor referente ao sobrenadante na primeira lavagem com tampão de seleção, as lavagens subsequentes também são representadas nos gráficos, Fenol - valor referente ao %CPM retido na fase orgânica da extração por fenol, Clorof - valor referente ao % CPM retido no clorofórmio.

Continuando a seleção no quinto ciclo (Figura 24E) e com o objetivo de aumentar a estríngência da seleção, adicionamos como competidor inespecífico t-RNA de levedura, iniciando na concentração de 100µg/ml (König et al 2007). Com essa estratégia, realizando a seleção contra células do paciente 4, pudemos verificar uma diminuição da ligação das sequências às células mesenquimais, de 36,5% do terceiro ciclo para 3% ao final do quarto ciclo.

Desta forma, seguimos com a estratégia de ciclos duplos do ciclo 5 ao ciclo 12, sempre selecionando inicialmente contra as células não mesenquimais de um paciente e depois sobre as células mesenquimais desse mesmo paciente, considerando esse ciclo duplo como apenas um na contagem de ciclos. As concentrações de t-RNA de levedura também foram sendo elevadas até atingir 500µg/ml no ciclo 12.

Entre os ciclos 10 e 12, realizamos ciclos com células misturadas em iguais proporções de mais de um paciente, ciclos 10 com 2 pacientes e ciclo 12 com 3 pacientes, isso para homogeneizar os epítomos apresentados durante a seleção.

Em paralelo ao processo de seleção clássico, desenvolvemos um protocolo alternativo, incorporando a técnica BRASIL (Giordano et al 2001) ao processo e seleção, com objetivo de comparar a composição das bibliotecas obtidas ao final desses dois processos distintos de seleção e assim verificar se chegaríamos às mesmas sequências. Foram realizados 5 ciclos de seleção com essa técnica anexa ao SELEX e assim ao final, tanto da seleção normal quanto da seleção por BRASIL tivemos a biblioteca R12

(SELEX) e BR5 (SELEX + BRASIL).

4.2.3 COMPROVAÇÃO DE LIGAÇÃO ÀS CTM ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.

Durante o desenvolvimento das duas populações de aptâmeros (Rx e BRx, onde “x” representa o número de ciclos de seleção que cada população passou) tivemos de verificar se o processo de seleção estava identificando DNA que de fato se ligavam às nossas células alvo e conseguiam discriminar outras células somáticas que comumente se encontra no lipoaspirado processado. O tipo mais comum de células presente no lipoaspirado processado são células sanguíneas (Zuk et al 2002) e por isso o experimento de verificação de ligação inespecífica foi realizado tendo essas células como alvo e as células mesenquimais como alvo das bibliotecas BR3 e R10 (Figura 25).

Tivemos a marcação de mais de 90% das células, porém havendo diferenças na marcação. Isso demonstrou que teríamos de realizar experimentos mais quantitativos para poder responder se estávamos marcando uma subpopulação de nossas células ou 100% de nossas células.

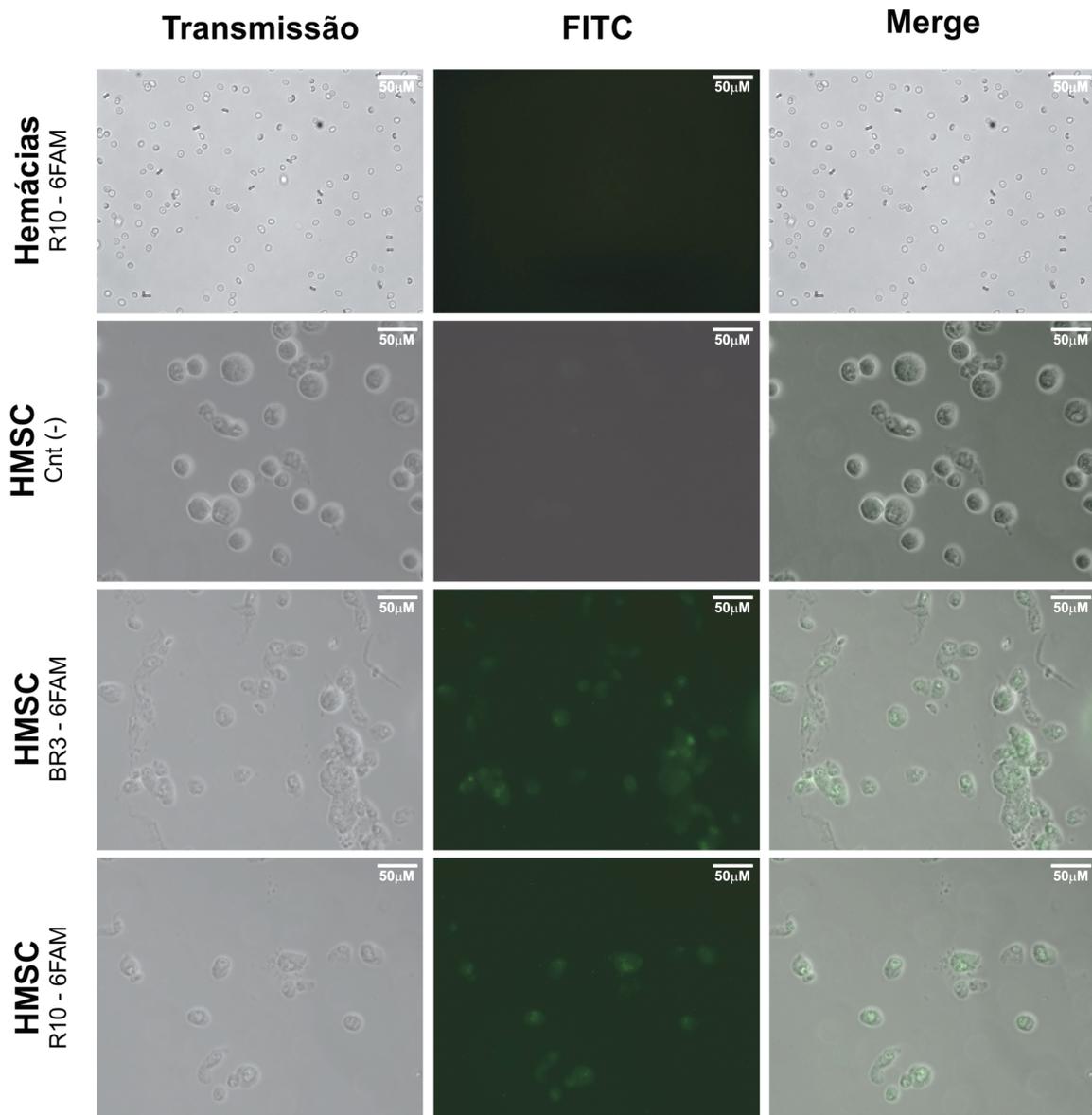


Figura 25: Especificidade das bibliotecas R10 e BR3 na ligação em células mesenquimais estudados por microscopia de fluorescência para aptâmeros marcados com 6FAM (FITC). Foram utilizados células tronco mesenquimais sem marcação de aptâmeros (Cnt -) para verificação de autofluorescência. Hemácias foram marcadas com a biblioteca R10-6FAM para verificar a marcação inespecífica da biblioteca em um tipo celular diferente da que foi alvo das seleções. Por fim, as células tronco mesenquimais foram marcadas tanto com as bibliotecas R10 e BR3 acopladas a 6FAM para verificação da marcação das mesmas.

Com base nesse resultado pudemos verificar a possibilidade de investigar a ligação dos aptâmeros à nossas células utilizando uma técnica mais quantitativa, no caso citometria de fluxo. A marcação dos aptâmeros poderia ser diferenciada de autofluorescência pela correção dos valores de compensação dentro dos canais de fluorescência, fazendo com que diminuíssemos o *background* para entender se de fato

estávamos identificando nossas células ou uma subpopulação delas.

4.2.4 QUANTIFICAÇÃO DA LIGAÇÃO APTÂMEROS FAM NAS CTM POR CITOMETRIA DE FLUXO.

A fim de verificar como as bibliotecas de moléculas, BR5 e R12, marcavam as células mesenquimais de maneira quantitativa, realizamos ensaios de citometria de fluxo para verificar, não apenas quanto das CTM eram marcada por aptâmeros, mas também quais tipos celulares estavam sendo marcados. Por isso realizamos marcações triplas, contendo não apenas a marcação dos aptâmeros, 6FAM equivalente a FITC no canal FL1, como também, CD29 (APC, FL4), CD90 (PE-CY5, FL3), CD34 (PE, FL2) e CD45 (PE, FL2).

Iniciamos os experimentos verificando a marcação das CTM pelas bibliotecas BR5 e R12 juntamente com a marcação de CD90 e CD29, marcadores clássicos de células mesenquimais (Nery et al 2013) (Figura 26). Os experimentos evidenciaram de maneira geral, que a maior parte de nossa população apresentava marcação para CD29 e CD90 com porcentagens similares encontradas na literatura (aproximadamente 80% para CD29 e para CD90) (De Bruyn et al 2011, Pilz et al 2011). Os resultados da marcação para as bibliotecas R12 e BR5, 9 e 12% respectivamente, chama atenção por mostrarem que podem ser uma marcação mais específica do que as apresentadas pelos anticorpos contra os antígenos CD29 e CD90.

Ou seja, provavelmente, se as seleções ocorreram de maneira a eliminar ligantes que as células mesenquimais tem em comum com as outras células somáticas, presentes no tecido adiposo e encontrar epítomos que se mantêm conservados entre diversos indivíduos, teremos ligantes dentro das bibliotecas capazes de distinguir as células que apresentem apenas esses antígenos altamente conservados e específicos das células tronco mesenquimais.

Seguindo com as análises da padronização, tivemos de verificar se a marcação dos aptâmeros não era inespecífica, o que nos gráficos de *dot plot* iriam deslocar a população como um todo no eixo de FL1

(Figura 26).

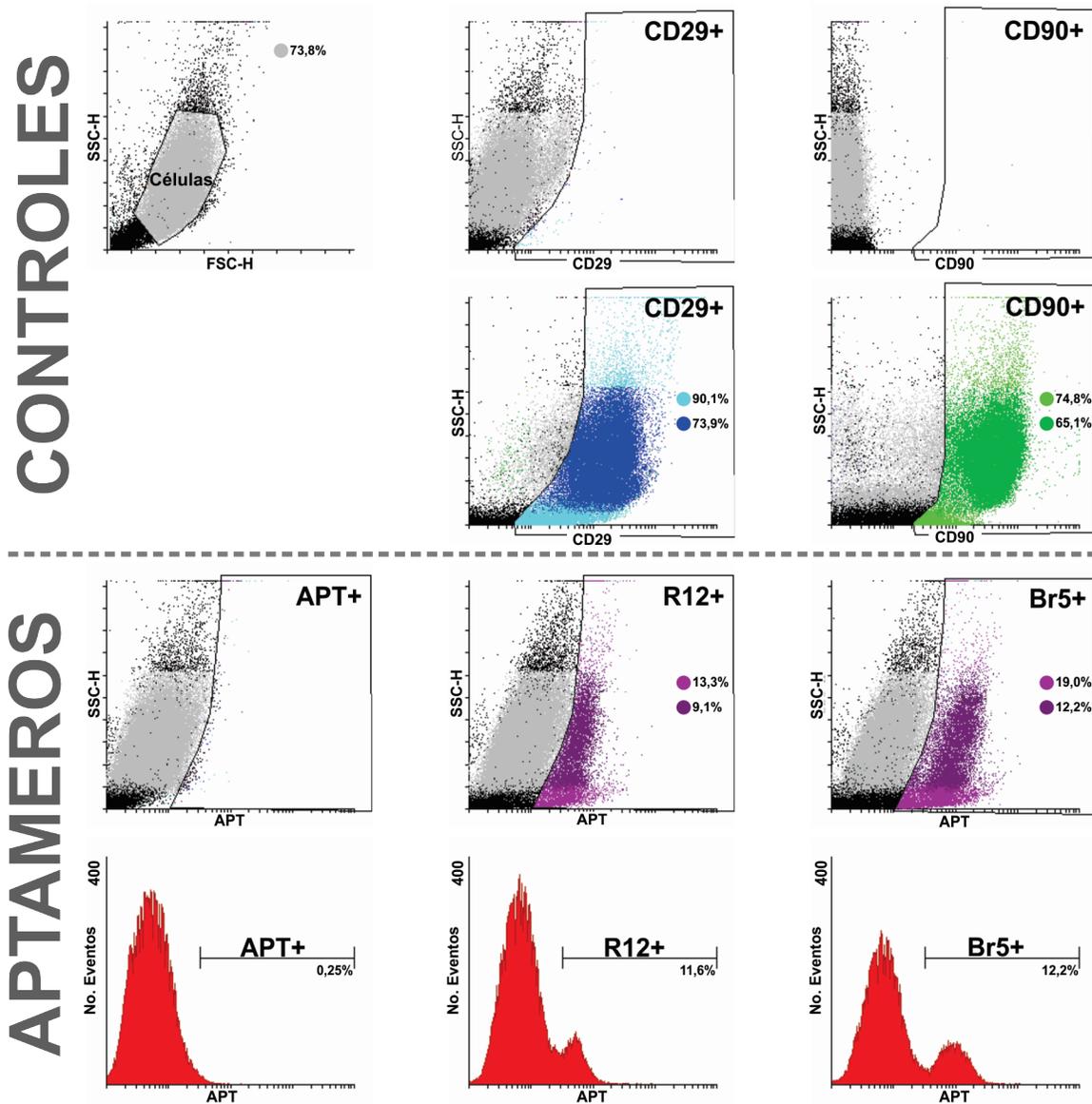


Figura 26: Padronização das marcações das células tronco mesenquimais em citometria de fluxo incluindo eventos não celulares. Na parte dos controles, fizemos a seleção da região com os eventos celulares, livres de *doublets* e de restos celulares, como membranas, essa região (*gating*) denominamos “Células” onde aproximadamente 74% dos eventos correspondiam a células (■). A partir da determinação dessa região avaliamos a marcação de nossas células para CD29, considerando todos os eventos atingimos 90% de marcação(■) e 74% dos eventos “Células” sendo marcados (■). O mesmo se seguiu para a marcação para CD90 ocorrendo a marcação de 75% todos os eventos (■) e dos eventos dentro do *gating* “Células” de 65% (■). Para o teste da marcação das células por aptâmeros, para R12 e BR5 tivemos a marcação de 13% e 19%, respectivamente, para todos os eventos (■) e 9% e 12%, respectivamente, para população de células (■). Para a verificação por análise de histograma ao invés do *dot plot* atingimos a marcação de 11,6% para R12 e 12,2% para BR5, em ambos os casos, delimitando um segundo pico de marcação bem evidente. Os anticorpos secundários para CD29 e CD90, estavam acoplados a PE-Cy5 (FL3) e APC (FL4) respectivamente, enquanto os aptâmeros estavam marcados com 6-FAM (FL1).

Filtrando os dados para somente os eventos dentro do *gating* “Células”, passamos a ter a verificação da verdadeira taxa de marcação das células tanto para CD29 (95%) e CD90 (85%) quanto para as bibliotecas de aptâmeros (R12-12% e BR5-20%). Esses experimentos sugerem a identificação de uma subpopulação de células tronco mesenquimais e não a marcação inespecífica de toda a população (painéis de R12 e BR5, Figura 27).

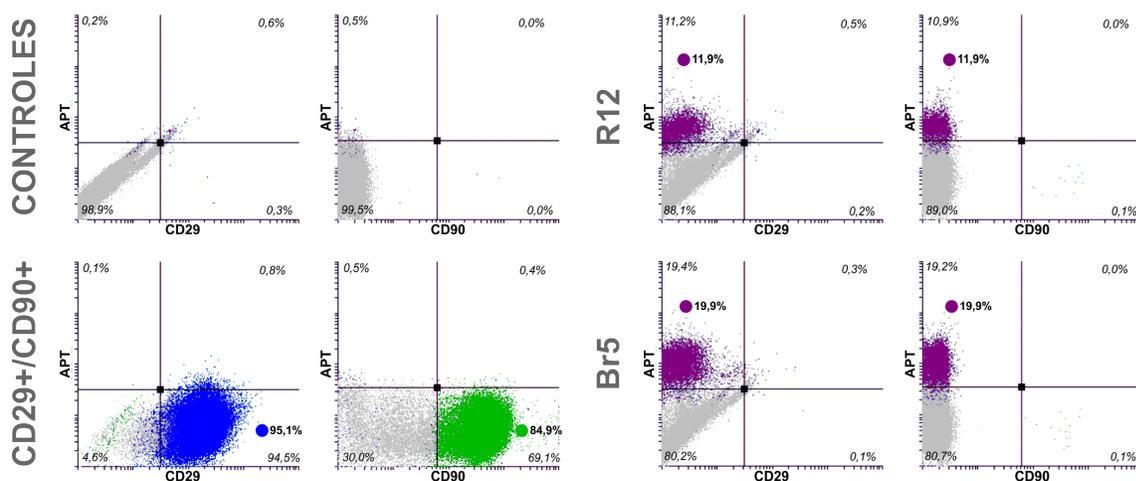


Figura 27: Definição da população de aptâmeros ligados à CTM. No painel dos controles, filtramos os eventos que ficaram dentro do *gate* definido anteriormente e mostramos que eliminamos quaisquer traços de autofluorescência. Observamos que 95% dos eventos são CD29+ e 85% CD90+ após a aplicação do *gating*. No painel das bibliotecas R12 e BR5 observamos a marcação de subpopulações que se deslocam no eixo de FL1, sugerindo que não foi toda a população de células que ganhou fluorescência de maneira indiscriminada. Assim os valores de 12% e 20% para R12 e BR5, respectivamente, demonstram uma marcação de um subgrupo de células dentro da população até então denominada células tronco mesenquimais. Os anticorpos secundários para CD29 e CD90, estavam acoplados a PE-Cy5 (FL3) e APC (FL4) respectivamente, enquanto os aptâmeros estavam marcados com 6-FAM (FL1).

Com esses experimentos pudemos distinguir a marcação dos aptâmeros da possível autofluorescência das células, além de demonstrar que existe uma subpopulação de células sendo identificadas por esses aptâmeros.

Após esses experimentos passamos para a verificação de tripla marcação onde poderíamos demonstrar qual era a composição dessa subpopulação marcada, uma vez que estávamos trabalhando com uma biblioteca de aptâmeros e portanto a marcação dificilmente seria homogênea. Os experimentos foram realizados com a mistura de células oriundas de 2 pacientes (pacientes 8 e 10).

Identificarmos o perfil de marcação tripla para R12 que as células apresentavam (Figura 28) e mostramos que $5,6\pm 1\%$ eram R12+/CD29+/CD90+ sendo que dentre as células não marcadas por aptâmeros, $79\pm 3\%$ eram CD29+/CD90+. Cabe aqui evidenciar que por termos uma biblioteca de aptâmeros, tivemos $2\pm 0,5\%$ de eventos R12+ apenas, $1,3\pm 0,7\%$ de eventos R12+/CD90+ e $3,2\pm 1,1\%$ de eventos R12+/CD29+.

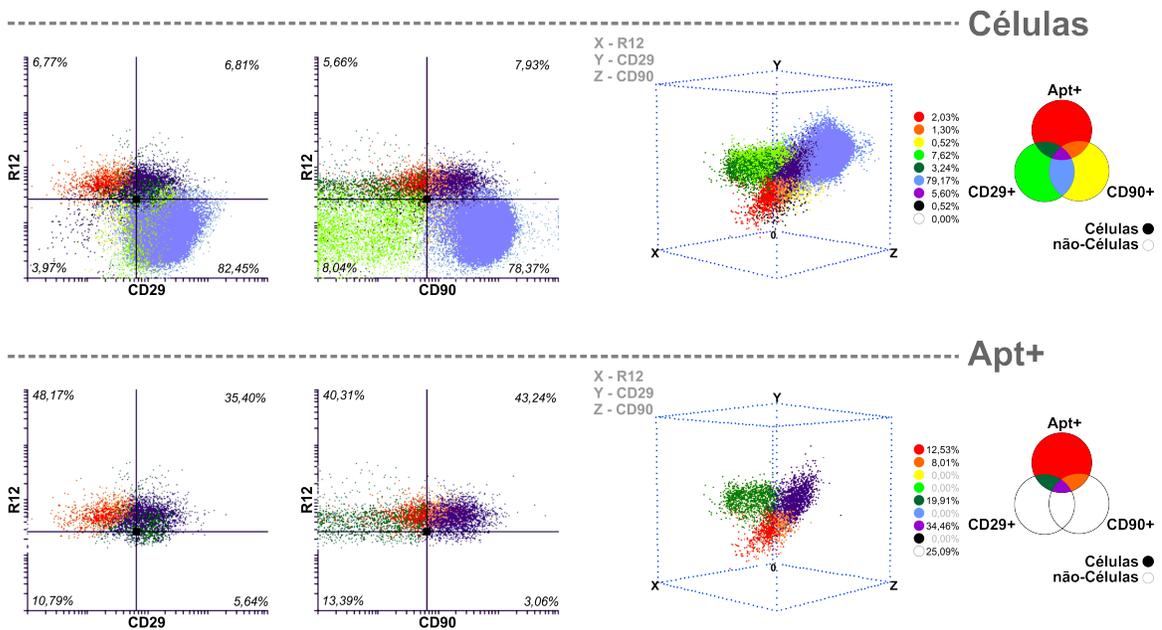


Figura 28: Marcação de células mesenquimais para CD29, CD90 e R12. Painel superior mostra a marcação dos eventos dentro do *gate* células e suas porcentagens de marcação para CD29/CD90 e R12, enquanto no painel inferior mostramos a marcação de todos os eventos R12+ e suas porcentagens quando considerados as co-marcações para R12/CD29, R12/CD90, R12/CD29/CD90 e apenas R12.

Quando avaliamos apenas as células marcadas pelos aptâmeros R12+, foi obtido o seguinte resultado: $12\pm 1\%$ somente R12+, $8\pm 1\%$ R12+/CD90+, $19\pm 2\%$ R12+/CD29+ e $34\pm 2,5\%$ R12+/CD29+/CD90+.

Identificarmos o perfil de marcação tripla para BR5 que as células apresentavam (Figura 29) e mostramos que $5,3\pm 1,5\%$ eram BR5+/CD29+/CD90+ sendo que dentre as células não marcadas por aptâmeros, $78\pm 4\%$ eram CD29+/CD90+. Concluímos que os aptâmeros selecionados reconheçam uma subpopulação das células tronco mesenquimais, sendo que no experimento tivemos $3\pm 0,5\%$ BR5+ apenas,

2,6±0,2% BR5+/CD90+ e 2,6%BR5+/CD29+.

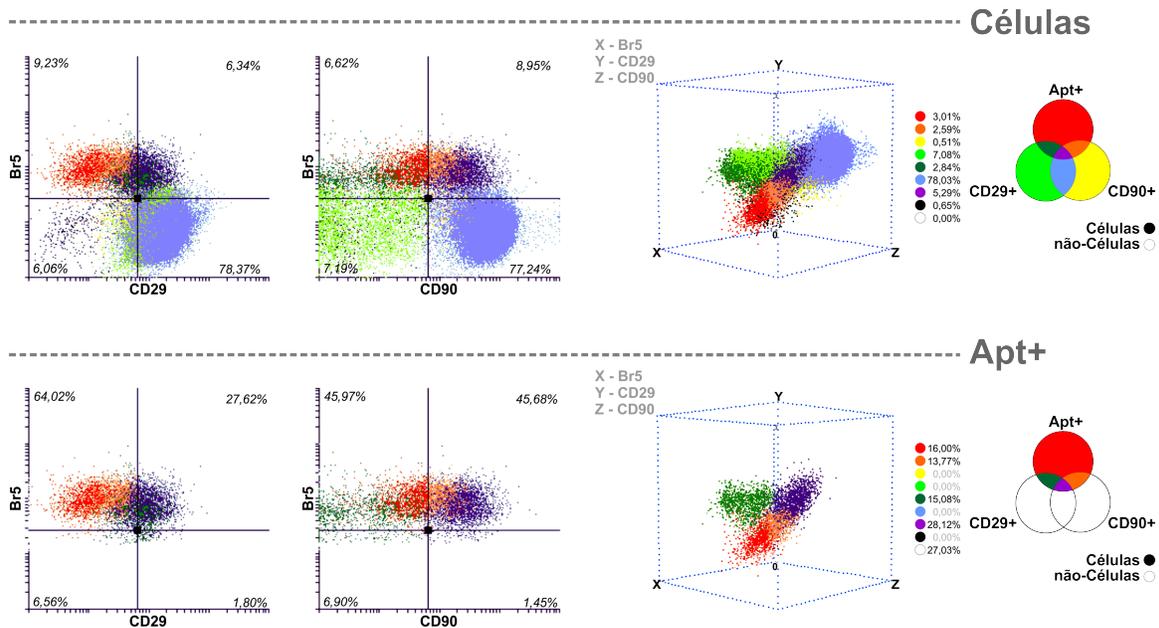


Figura 29: Marcação de células mesenquimais para CD29, CD90 e BR5. Painel superior mostra a marcação dos eventos dentro do *gate* células e suas porcentagens de marcação para CD29/CD90 e BR5, enquanto no painel inferior mostramos a marcação de todos os eventos BR5+ e suas porcentagens quando considerados as co-marcações para BR5/CD29, BR5/CD90, BR5/CD29/CD90 e apenas BR5.

Quando avaliamos apenas os eventos BR5+, temos 16% de eventos BR5+, 14% BR5+/CD90+, 15% BR5+/CD29+ e 28% BR5+/CD29+/CD90+.

Com essas avaliações demonstramos que duas formas distintas de seleção tivemos resultados muito semelhantes quanto à marcação das células tronco, assim necessitaríamos investigar a composição das bibliotecas de aptâmeros (R12 e BR5) para ver se além de resultados próximos elas apresentavam composição similar, o que sendo positivo, validaria o processo de seleção com a inclusão da técnica BRASIL.

4.2.5 PROVA DE CONCEITO DA PURIFICAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS POR APTÂMEROS DE DNA.

Antes de seguirmos com o a averiguação da composição das biblioteca de aptâmeros selecionados, tínhamos de validar se o processo base no qual se baseia nossa premissa de hipótese, da que aptâmeros de

DNA que apresentem alta afinidade por células tronco seriam capaz de purificar essas células de maneira rápida, eficaz e com pureza adequada para subseqüentes ensaios.

A fim de testar essa hipótese, realizamos a marcação das bibliotecas R12 e BR5 com biotina 5' para então ligarmos a nano partículas magnéticas com estreptavidina e assim produzir compostos capazes de purificar essas células do lipoaspirado processado com ajuda de um magneto (Figura 30).

O processo de purificação das células mesenquimais se mostrou possível, principalmente ao atingir um grau de pureza interessante ao uso clínico, sendo de grande interesse para novos desenvolvimentos, uma vez que viabilizaria células tronco mesenquimais em um intervalo de horas factível para o uso clínico das mesmas.

Como pode-se verificar na Figura 30, células purificadas por aptâmeros foram diferente na sua morfologia quando comparadas culturas que não foram processadas com o auxílio dos aptâmeros

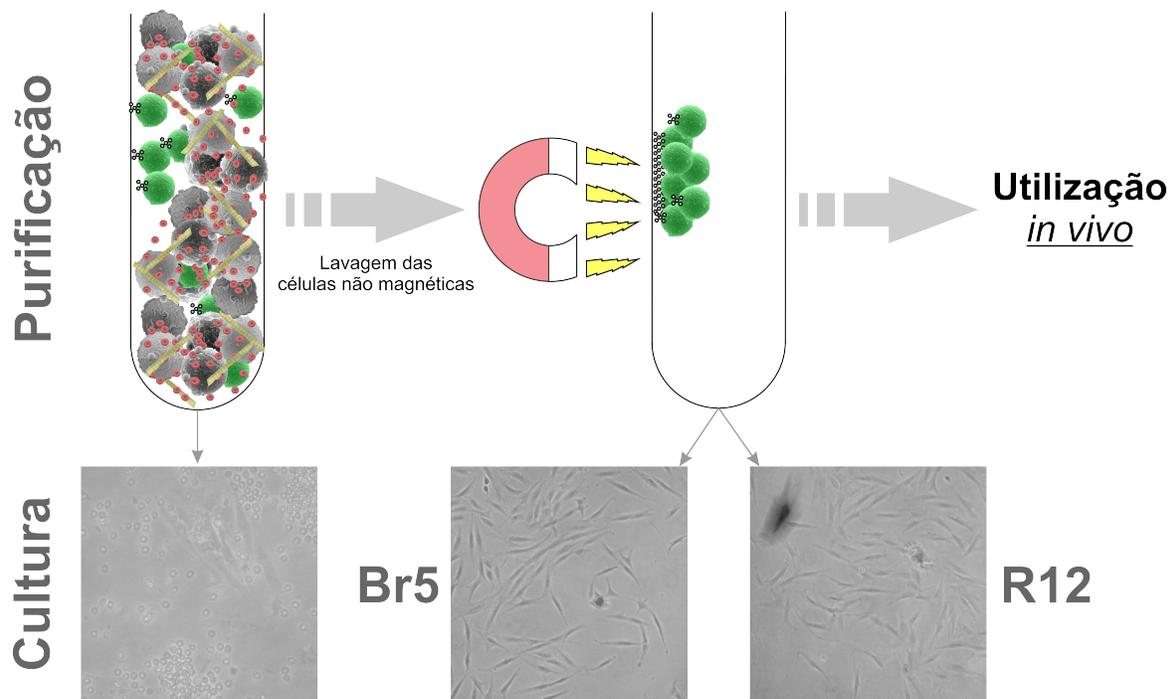


Figura 30: Prova de conceito da purificação de células tronco por separação magnética com a utilização de aptâmeros. É possível verificar que após a primeira troca de meio, a fim de eliminar aglomerados de partículas magnéticas e resto celulares em todas as culturas, a diferença entre as células que passaram pela purificação com aptâmeros é principalmente delimitada pela pureza da cultura (BR5 e R12) enquanto que nas células não processadas, mesmo após a troca de meio continua a contaminação por eritrócitos e outros possíveis tipos celulares, sendo que é possível visualizar ao fundo a cultura celular em desenvolvimento. As taxas de imunomarcagem para CD29 e CD90 após as purificações, foram semelhantes à população purificada pela metodologia de processamento do lipoaspirado (dado não mostrado).

4.2.6 IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS BIBLIOTECAS BR5 E R12.

A fim de identificar qual era a composição de cada uma das bibliotecas e verificar se tínhamos uma convergência de similaridade entre as sequências dos aptâmeros, sequenciamos 800 sequências de cada biblioteca e comparamos a incidência e conservação de estruturas em regiões anteriormente aleatórias, assim identificamos 32 sequências com alto grau de repetição e conservação tanto em R12 quanto em BR5 (Figura 31).

A fim de termos um critério de avaliação desenvolvemos o índice de presença, que na verdade diz respeito ao número de vezes que uma sequência apareceu em BR5 dividido pela frequência em R12, assim se a sequência aparecesse de maneira similar em ambas as bibliotecas ela teria um índice de presença

próximo de 1, sendo que consideramos um limite de meio ponto na escala, deixando o intervalo para essa primeira avaliação de 0,5 a 1,5 no índice de presença. Esses valores representam a possibilidade de que sequências que apareçam duas vezes a mais em uma biblioteca do que em outra, poderiam chamar nossa atenção para futuros ensaios, uma vez que variações dessa magnitude podem ocorrer por termos amostrado uma população pequena (800 sequências) frente às suas possibilidades de diversidade.

Nome Seq.	Frequência total (BR5/R12)	Conservação (%)	Índice de Presença	Sequência
Seq 1	43(9BR5/34R12)	100	0.26	GCCGGGGGGCGTCGGAGCGGCCATCACAGGGGCA
Seq 2	43(9BR5/34R12)	96	0.26	GTCGGGGGGCGTCGGAGCGGCCATCACAGGTGGA
Seq 3	43(9BR5/34R12)	94	0.26	GCCGAAGGGCGTCGGAGCGGCCATCACAGGGGGA
Seq 4	43(9BR5/34R12)	96	0.26	GGCGGGGGCGCCGGAGCGGCCATCGCAGGGGGA
Seq 5	115(25BR5/90R12)	82	0.28	GGGGAGCGCGCCGGAGCGATGGGTTCCGGGGGTA
Seq 6	117(26BR5/91R12)	90	0.29	GGGGCCGCCTGGAACGATGGGTTCCGGTGCGA
Seq 7	119(27BR5/92R12)	90	0.29	GGGGATCGCCTGGAACGATGGGTTCCGGCACGA
Seq 8	123(28BR5/95R12)	96	0.29	GTGGGGACCGCCTGGAACGATGGGTTCCGGCGGA
Seq 9	117(27BR5/90R12)	90	0.30	GGGGCCGCCTGGAACGATGGGTTCCGGCTGTA
Seq 10	43(10BR5/33R12)	94	0.30	GCCGGGGGGCGTCGGAGCGGCCCTCCAGGGGGA
Seq 11	123(29BR5/94R12)	100	0.31	GGCGGGGGCGCCTGGAACGATGGGTTCCGGCGGA
Seq 12	118(28BR5/90R12)	100	0.31	GGGGCACCGCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGTA
Seq 13	113(27BR5/86R12)	100	0.31	GGGCACCGCCTGGAGCGATGGGCTCGGGTGCA
Seq 14	113(27BR5/86R12)	100	0.31	GTAGGCACCGCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGTA
Seq 15	46(12BR5/34R12)	82	0.35	GGGGAGCGCGCTGGACGCTGGGGTCGCCGGGGGA
Seq 16	57(15BR5/42R12)	97	0.36	GCACGGACGGGCGCACGCGCTTGAGCCCGGGGA
Seq 17	58(16BR5/42R12)	91	0.38	GGGGACCGCCTGTAACGGTGGGTTCCGGCGCA
Seq 18	179(50BR5/129R12)	93	0.39	GAGGGCCGCCTGGAACAATGGGTTCCGGCGGA
Seq 19	57(17BR5/40R12)	100	0.43	GCAGGGCGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGGGGA
Seq 20	57(18BR5/39R12)	97	0.46	GCAGGGCGGGCCGCATACGCTTGAGCCCGGGGA
Seq 21	65(24BR5/41R12)	97	0.59	GGGGCATCCCGCTTGGCACAAATGCGTGCGCGAGGA
Seq 22	65(25BR5/40R12)	100	0.63	GGGGCATCCCGCTTGGCACAAATGCGTGCGCGGGTA
Seq 23	65(25BR5/40R12)	94	0.63	GGGGCATCCCGCTTGGCACAAATGCGTGAGCTGGCA
Seq 24	63(25BR5/38R12)	85	0.66	GGGGCATCCCGCTGGACCATGGCGTGCGCGGATA
Seq 25	65(26BR5/39R12)	97	0.67	GGGGCATCCCGCTTGGCACAAATGCGTGCGCGGATA
Seq 26	64(26BR5/38R12)	97	0.68	GGGGCATCCCGCTTGGCACAAATGCGTGCCCGGATA
Seq 27	15(8BR5/7R12)	91	1.14	TACCCTAGCTCAAGCGCATGCGGCCGCTCCCTGC
Seq 28	32(20BR5/12R12)	100	1.67	TCGCGCCGAACCCATCGTTCAGGCGGTCCCCC
Seq 29	18 (18BR5)	97	18.00	TCCACCCCGACTCAAGGGAACCCGTCGGCCCGGC
Seq 30	23 (23BR5)	100	23.00	GGGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGA
Seq 31	49(47BR5/2R12)	83	23.50	GACCAAGCCGACCGCCCCCATGAGTCGGGGTGA
Seq 32	49(48BR5/1R12)	100	48.00	GCCCGAGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGA

Figura 31: Painel de sequências presentes nas bibliotecas R12 e BR5. As sequências em negrito são aquelas que apresentaram um índice de presença similar nas duas bibliotecas analisadas. Na coluna **frequência total** demonstramos o número de vezes que cada molécula aparece tanto em R12 quanto em BR5, em seguida a **conservação (%)** é um valor médio da porcentagem da variação da sequência dentro das repetições encontradas e finalmente o **índice de presença** que é o resultado da divisão entre o número de vezes que a sequência apareceu em BR5 por R12, assim se a molécula aparecesse de maneira similar em ambas as bibliotecas ela teria um índice de presença próximo de 1, sendo que consideramos aproximadamente de 0,5 a 1,5 para critérios de investigação. Os fragmentos de DNA aqui analisados, correspondem às regiões randômicas das bibliotecas R12 e BR5.

Seguindo com os critérios de avaliação das bibliotecas, alinhamos todas as sequências em busca de padrões de conservação, buscando dessa forma sequências que pudessem produzir classes de categorização devido à sua similaridade (Figura 32).

Nome Seq.	Frequência total (BR5/R12)	Índice de Presença (%)	Sequência	Nome Apt.	Classe
Seq 31	49(47BR5/2R12)	23.50	GACCCAAGCCGACCGCCCCCATGAGTCGGGGTGT	APT1	
Seq 18	179(50BR5/129R12)	0.39	GAGGGCCGCTGGAACAATGGTTTCGGCGCGA	APT2	
Seq 16	57(15BR5/42R12)	0.36	GCAACGGACGGGCGGCGCGCTTTCAGCCGGGGA	APT3	CLASSE I
Seq 20	57(18BR5/39R12)	0.46	GCAGGGGCGGCGCGCATACGCTTTCAGCCGGGCGA	APT4	
Seq 19	57(17BR5/40R12)	0.43	GCAGGGGCGGCGCGCATGCGCTTTCAGCCGGGGA	APT5	
Seq 32	49(48BR5/1R12)	48.00	GCCGACGGCCGACCGGTTCCCTTTCAGTCGGGGTGA	APT6	<i>BR5</i>
Seq 3	43(9BR5/34R12)	0.26	GCCGAAGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGGGA	APT7	CLASSE II
Seq 1	43(9BR5/34R12)	0.26	GCCGGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGGGA	APT8	
Seq 10	43(10BR5/33R12)	0.30	GCCGGGGGGCGTCGGAGCGCGCGCTCCAGGGGGA	APT9	
Seq 11	123(29BR5/94R12)	0.31	GGCGGGGGCGCTGGAACGATGGGTTTCGGCGCGA	APT10	
Seq 4	43(9BR5/34R12)	0.26	GGCGGGGGCGCGCGGAGCGCGCCATCACAGGGGGA	APT11	<i>R12</i>
Seq 30	23 (23BR5)	23.00	GGGACGGCCGACCGGTTCCCTTTCAGTCGGGGTGA	APT12	
Seq 7	119(27BR5/92R12)	0.29	GGGGATCGCTGGAACGATGGGTTTCGGCACGA	APT13	
Seq 12	118(28BR5/90R12)	0.31	GGGGACCGCCCTGGAGCGATGGGTTTCGGGCTGTA	APT14	CLASSE III
Seq 13	113(27BR5/86R12)	0.31	GGGACCGCCCTGGAGCGATGGGTTTCGGGCTGCA	APT15	
Seq 24	63(25BR5/38R12)	0.66	GGGGCATCCCGCTGGACCATGGCGTCGCGGATA	APT16	
Seq 23	65(25BR5/40R12)	0.63	GGGGCATCCCGCTGGACCAATGCGTTCAGCTGGCA	APT17	CLASSE IV
Seq 26	64(26BR5/38R12)	0.68	GGGGCATCCCGCTGGACCAATGCGTTCGCCGATA	APT18	
Seq 21	65(24BR5/41R12)	0.59	GGGGCATCCCGCTGGACCAATGCGTTCGCGGAGGA	APT19	
Seq 22	65(25BR5/40R12)	0.63	GGGGCATCCCGCTGGACCAATGCGTTCGCGGATA	APT20	
Seq 25	65(26BR5/39R12)	0.67	GGGGCATCCCGCTGGACCAATGCGTTCGCGGATA	APT21	
Seq 17	58(16BR5/42R12)	0.38	GGGGGACCGCTGTAACGGTGGGTTTCGGCGCGA	APT22	
Seq 5	115(25BR5/90R12)	0.28	GGGGGAGCGCGCGGAGCGATGGGTTTCGGGGGTA	APT23	
Seq 15	46(12BR5/34R12)	0.35	GGGGGAGCGCGCTGGACGCTGGGTTTCGCCGGGGA	APT24	
Seq 9	117(27BR5/90R12)	0.30	GGGGGCCGCTGGAACGATGGGTTTCGGCGTGA	APT25	
Seq 6	117(26BR5/91R12)	0.29	GGGGGCCGCTGGAACGATGGGTTTCGGTTCGA	APT26	CLASSE V
Seq 8	123(28BR5/95R12)	0.29	GTGGGACCGCTGGAACGATGGGTTTCGGCGCGA	APT27	
Seq 14	113(27BR5/86R12)	0.31	GTAGGCACCGCCCTGGAGCGATGGGTTTCGGGCTGTA	APT28	
Seq 2	43(9BR5/34R12)	0.26	GTCCGGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGTGA	APT29	
Seq 27	15(8BR5/7R12)	1.14	TACCTAGCTCAAGCGCATCGGCCCTCCCTGC	APT30	<i>ÍNDICE</i>
Seq 29	18 (18BR5)	18.00	TCCACCCGACTCAAGGGAACCGGTCGGCCCGCGC	APT31	
Seq 28	32(20BR5/12R12)	1.67	TCGGCCGAACCCATCGTTCAGGCGGTCCCC	APT32	<i>ÍNDICE</i>

Figura 32: Classes de seqüências presentes nas bibliotecas R12 e BR5. As seqüências em negrito são aquelas que apresentaram um índice de presença próximo nas duas bibliotecas analisadas. Percebe-se que no alinhamento por similaridade, 5 classes de aptâmeros foram identificadas (I, II, III, IV e V) e mais quatro seqüências ficaram evidenciadas, duas com índices de presença entre 0,5 e 1,5 que não tiveram similaridade com nenhuma outra (Seq27 e Seq28 respectivamente) e duas seqüências que tiveram o maior e o menor índice de presença, indicando forte presença em BR5 e R12 respectivamente, ou seja, essas duas seqüências apresentaram, provavelmente devido ao método empregado na seleção, maior fitness seletivo em uma metodologia do que em outra, tornando-se essencial investigarmos essa peculiaridade. Em azul é possível verificar quais seqüências foram selecionadas para ser caracterizadas com aptâmeros isolados, que por sua vez receberam os nomes de APT1-32 de acordo com o processo de alinhamento descrito acima.

O passo seguinte a esse, foi desenvolver uma análise estrutural de cada uma das famílias e aptâmeros considerados para síntese, que podem ser encontradas nos ANEXOS V, VI, VII, VIII, IX e X, podendo dessa maneira caracterizar a ligação dos aptâmeros isolados e ver se reproduzirmos os dados produzidos pelas bibliotecas.

4.2.7 CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS ISOLADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Iniciando a caracterização dos aptâmeros isolados a partir das bibliotecas BR5 e R12, realizamos experimentos de citometria de fluxo onde utilizamos como marcador de células mesenquimais um

anticorpo direcionado contra CD90, marcador mais específico quando comparado a CD29 (De Bruyn et al 2011, Pilz et al 2011), juntamente com anticorpos contra CD34 e CD45, classicamente marcadores de células pericíticas e hematopoiéticas respectivamente (Tárnok et al 2010).

Assim, a fim de padronizar as marcações para expressão de CD90/34/45 e aptâmeros acoplados a 6-FAM, realizamos os experimentos iniciais (Figura 33) nos mesmos moldes que realizados anteriormente. Porém, para os testes dos aptâmeros, foi utilizado um “*pool*” dos aptâmeros selecionados para síntese, onde a concentração final dos aptâmeros foi de 1 μ M, sendo que cada um dos componentes representava uma porção equivalente dentro dessa concentração.

Para controle de ligação inespecífica, sintetizamos uma sequencia onde a região randômica era formada por uma repetição de 34 adeninas, assim sendo, esse oligonucleotídeo poderia nos fornecer os valores de marcação inespecífica para então determinarmos a marcação específica de cada aptâmeros.

O *gating* para a população denominada “Células” abrange 95% dos eventos excluindo restos celulares e eventos duplos. Mais do que isso, fica evidente que de fato temos uma marcação pelos aptâmeros, mesmo em conjunto (totalizando uma concentração final de 1 μ M final) comparando com a marcação de mesma concentração do controle negativo (CNT1).

Depois de determinado as marcações para os antígenos e aptâmeros, seguimos para a caracterização dos aptâmeros isoladamente, sendo que mantivemos os experimentos com a tripla marcação contra APT/CD90/CD34 ou APT/CD90/CD45, assim em cada um dos gráficos, compilamos os resultados de ausência de marcação para CD34 e CD45 em um mesmo *dot plot* tendo como eixo FL-2 (Figura 34). Os fluoróforos foram APC para CD90, PE-Cy5 para CD34 e CD45 e 6-FAM para os aptâmeros.

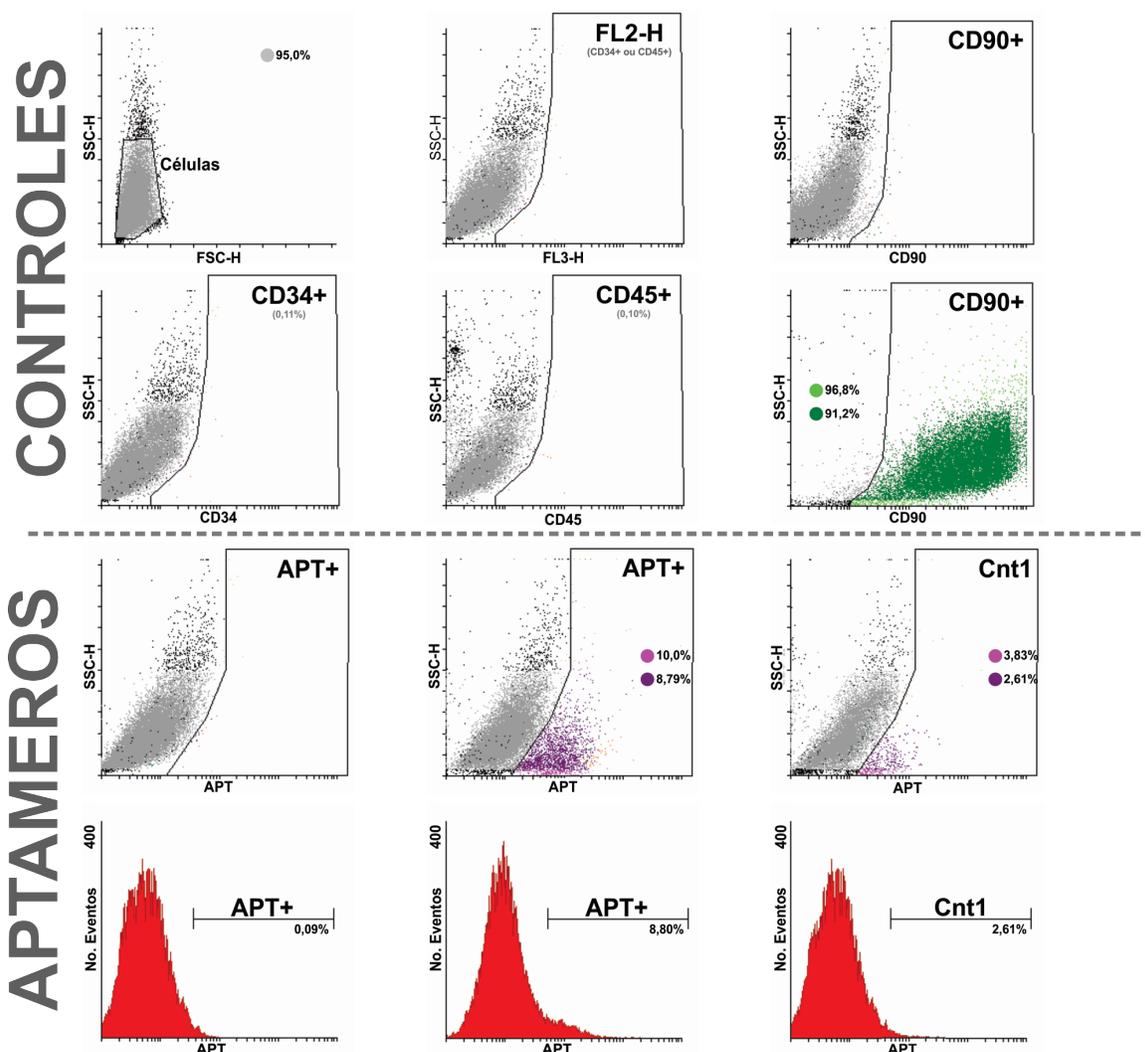


Figura 33: Padronização para experimentos com aptâmeros isolados. Para a região “Células” (■) aproximadamente 95% dos eventos correspondiam a células. A partir da determinação dessa região avaliamos a marcação de nossas células para CD34, considerando todos os eventos (■) tivemos 0,11% dos eventos sendo marcados. O mesmo se seguiu para marcação para CD45, onde, considerando todos os eventos (■) tivemos 0,10% dos eventos sendo marcados. Para a marcação para CD90 onde tivemos a verificação da marcação de todos os eventos (■) com marcação de 96,8% dos eventos, assim como apenas os eventos celulares (■) com marcação de 91,2% dos eventos. Para o teste da marcação das células por aptâmeros tivemos a mesma consideração onde para o “pool” de aptâmeros e o controle negativo CNT1, tivemos a marcação de 10% e 3,83%, respectivamente, para todos os eventos (■) e 8,79% e 2,61%, respectivamente, para os eventos celulares (■). Para a verificação por análise de histograma ao invés do *dot plot* tivemos a marcação de 8,8% para o “pool” de aptâmeros e 2,6% para CNT1.

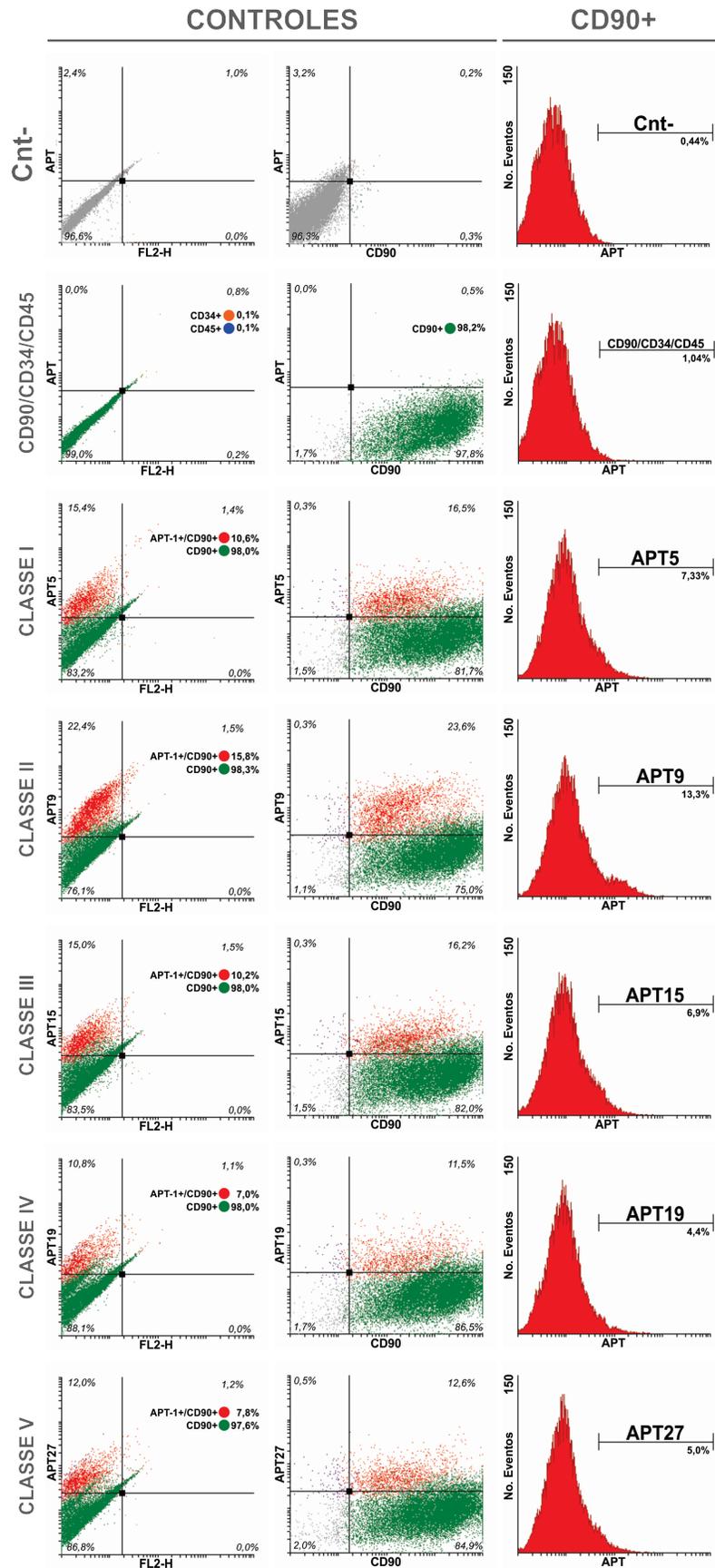


Figura 34: Caracterização por citometrias de fluxo com Aptâmero 1. Para os experimentos consideramos apenas os eventos “Células” (■). No painel Cnt- são os experimentos de determinação dos perfis de marcação sem nenhum anticorpo ou aptâmero, assim como no segundo painel CD90/CD34/CD45 temos a padronização de marcação para esses marcadores, onde CD34 (■) e CD45 (■) são localizados no mesmo painel, tendo como eixo FL-2. Isso ocorreu pois o painel com eixo FL-2 representa 2 experimentos, um com marcação para CD34 e outro com marcação para CD45, evitando repetição de resultados negativos na figura, uma vez que ambos não apresentarem marcação para as CTM. A marcação para CD90 (■) foi de 98,0%. Assim tivemos caracterizadas cada uma das classes de aptâmeros encontradas nos sequenciamentos, onde poderíamos avaliar quais delas teriam uma maior eficiência em marcar subgrupos celulares. Assim tínhamos células que acabaram marcadas apenas por CD90 (■) e APTx/CD90 (■).

Foram verificadas as cinco primeiras classes, sendo detectado que tínhamos uma variação na eficiência de marcação, pois por serem moléculas diferentes, cada um dos aptâmeros pode marcar grupos celulares diferentes por se ligarem a alvos distintos, mas de maneira geral, passamos a considerar em um primeiro momento, moléculas que tivessem ao menos uma taxa de detecção/marcação similar ao encontrado com as bibliotecas R12 e BR5 (12 e 20% respectivamente).

Dessa forma, de acordo com a figura 34, tivemos as respectivas taxas de ligação a epítomos de superfície celular para cada classe de aptâmeros:

Classe I - Apt5 10,6%,

Classe II - Apt9 15,8%,

Classe III - Apt15 10,2%,

Classe IV - Apt19 7,0% e

Classe V - Apt27 7,8%.

Sendo a Classe II expressa pelo Apt9, a classe/aptâmeros que apresentaram melhor marcação (15,8%). Além disso, um fator determinante para a indicação nessa primeira análise da Classe II - Apt9, foi a capacidade de deslocar a população marcada pelo aptâmero no eixo de Y dos gráficos, gerando uma subpopulação bem definida, se diferenciando da população não marcada e revelando uma segunda população no histograma.

Durante a investigação das classes restantes e do aptâmero controle (Figura 35) verificamos as seguintes taxas de ligação aos epítomos de superfície celular:

Classe BR5 - Apt6 16,8%,

Classe R12 - Apt11 23,7%,

Classe INDICE Apt30 - 11,3% ,

Classe INDICE Apt32 - 13,4% e

Cnt1 - 6,6%.

Sendo a Classe R12 expressa pelo Apt11, a classe/aptâmeros que apresentaram melhor marcação (23,7%). Assim como nos experimentos anteriores, fica evidente o aparecimento de uma subpopulação bem definida, bem deslocada da população não marcada e produzindo um segundo pico no histograma.

CONTROLES

CD90+

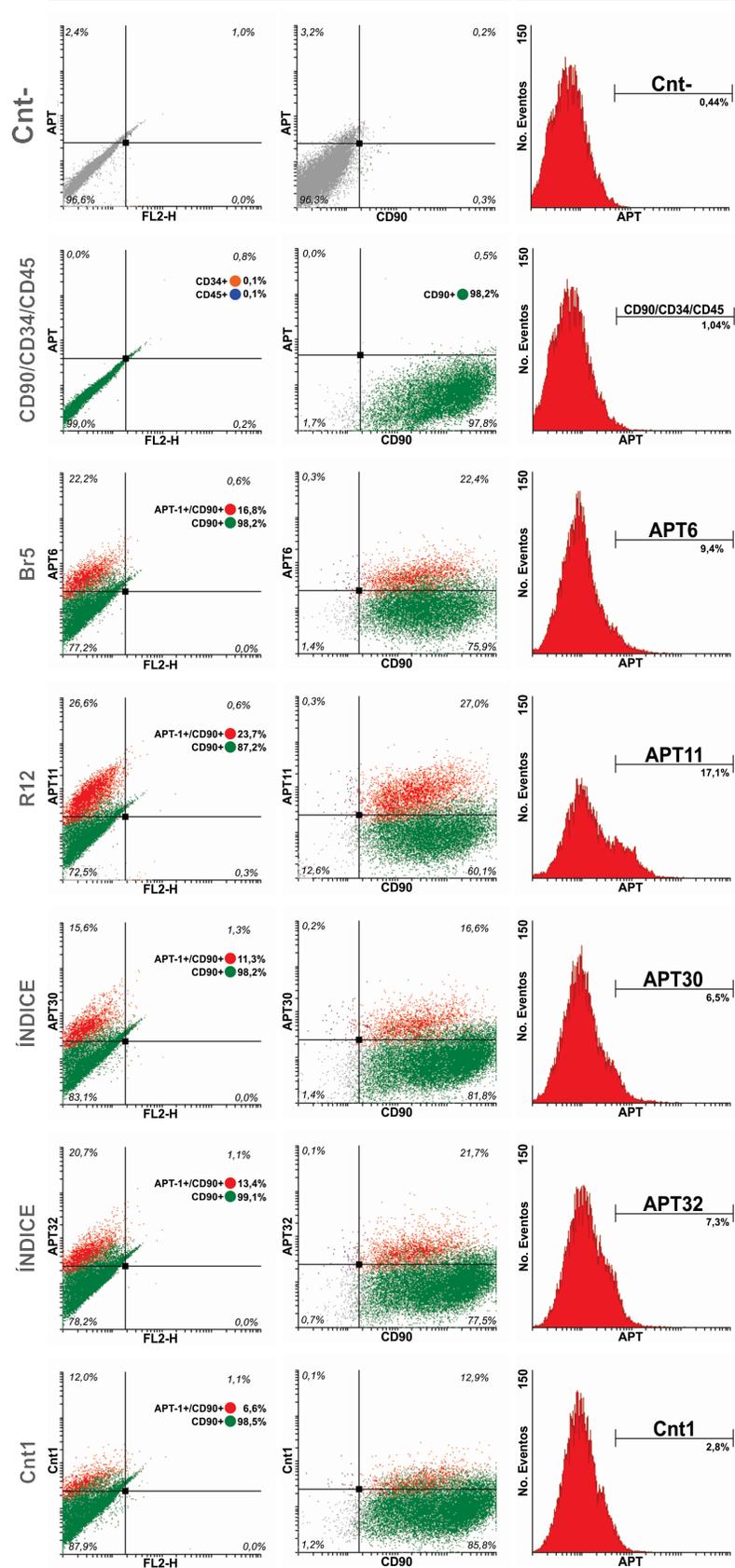


Figura 35: Caracterização por citometrias de fluxo com aptâmeros isolados Para os experimentos consideramos apenas os eventos “Células” (■). No painel Cnt- são os experimentos de determinação dos perfis de marcação sem nenhum anticorpo ou aptâmero, assim como no segundo painel CD90/CD34/CD45 temos a padronização de marcação para esses marcadores, onde CD34 (■) e CD45 (■) são localizados no mesmo painel, tendo como eixo FL-2, uma vez que ambos não apresentarem marcação para as CTM. A marcação para CD90 (■) foi de 98,0%. Assim tivemos caracterizadas cada uma das classes de aptâmeros encontradas nos sequenciamentos, onde poderíamos avaliar quais delas teriam uma maior eficiência em marcar subgrupos celulares. Assim tínhamos células que acabaram marcadas apenas por CD90 (■) e APTx/CD90 (■).

Considerando a marcação encontrada na sequência controle (Cnt1) como ligação à epítomos de superfície celular inespecífica e descontando esses valores dos valores obtidos nos experimentos de citometrias de fluxo, as porcentagens de ligação específica dos aptâmeros selecionados foram no caso da ClasseII - Apt9 9,2% e para Classe R12 - Apt11 17,1%, sendo que eles apresentaram a melhor definição da população marcada.

5 DISCUSSÃO

5.1 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Com relação à diferenciação neural de células tronco mesenquimais de lipoaspirado, nossa hipótese se baseia na premissa que seria possível, com o uso de fatores de transcrição, induzir um perfil de expressão gênica nessas células que culmine na sua total diferenciação em neurônios, para isso produzimos um protocolo que se utilizava de neurotrofinas (NGF e BDNF) para realizar tal indução, diferente de outros trabalhos vigentes na literatura para essas células (Ashjian et al 2003, Zuk et al 2001/2002, Muñoz-Eliáz et al 2001, Sanchez-Ramos et al 1998/2000/2002, Han et al. 2014, Lo Furno et al. 2013, Bossio et al. 2013, Chung et al. 2013, Ferroni et al. 2013) que se entre outras metodologias utilizavam de protocolos com diversos compostos químicos que não produziram uma diferenciação plenamente funcional e sugerida como artefato.

É sabido que não apenas as neurotrofinas utilizadas no protocolo de diferenciação apresentado estão envolvidas no processo de formação e funcionalidade de sinapses (Poon et al 2013) mas de maneira geral nos utilizamos dessas principais neurotrofinas para forçar um processo de diferenciação.

Essa abordagem visava genes e fatores de transcrição que no desenvolvimento são ativados por NGF e BDNF. Essas neurotrofinas são conhecidas por aumentarem a densidade de espinhas dendríticas, modular a expressão de diversos receptores e canais iônicos tipicamente relacionados à atividade neuronal além de modular a ativação de diversos fatores de transcrição relacionados à diferenciação neuronal (Park and Poo et al 2013, Fariñas et al. 2002, Tonchev 2011, Ernsberger 2009, Cirulli and Alleva 2009, Fargali et al. 2012, Porcher et al. 2011, Christie et al 2013,).

Durante a evolução da diferenciação neuronal, foi possível observar o aparecimento de morfologia neuronal (Figura 10 B e C) assim como foi observado a expressão de marcadores específicos de neurônios

(Figura 10 E, G, I e K). A expressão desses marcadores é característica de células neuronais e se tornou um indicio de que as células tronco mesenquimais de lipoaspirado que estavam sobre a influência de fatores neurotróficos, estariam se diferenciando em neurônios. Essa diferenciação poderia ser apenas um estágio inicial, mas suscitou a necessidade de investigações mais profundas para comprovar a nossa hipótese de que era possível induzir um fenótipo neuronal nessas células utilizando fatores químicos específicos.

Tendo sido verificado a presença de marcadores de diferenciação o passo seguinte foi verificar a responsividade dessas células para neurotransmissores, como ATP, NIC, CCh e BK (Figura 11) os quais foram mais proeminentes as respostas para ATP, NIC e BK, que demonstraram um claro aumento já no segundo dia de diferenciação (Figura 12).

Esse aumento de funcionalidade permitiu que o perfil de expressão de genes de receptores ligados à neurônios fosse investigado, sendo determinado aumento de expressão de genes relacionados a receptores de BK (BKRB1 e BKRB2), Nic e CCh (CHRNA7, CHRM1,3 e 4), ATP (P2XR3, P2XR5, P2YR1 e P2YR4) além de receptores de Glutamato, tanto NMDA como AMPA(GRIA2 e GRM2) e receptores de GABA (GABRA3) (Figura 13).

Além de genes mais comumente associados a transmissão sináptica, tivemos o aumento da expressão da NO sintase 1 (NOS1) que tem sido relacionadas com diferenciação neural em adultos, principalmente no giro denteado, sugerindo que NOS1 tenha um papel regulador na neurogênese (Zhou e Zhu, 2009).

Diversos genes também apresentaram diminuição em sua expressão, muitos deles não relacionados com o fenótipo neural, como P2XR1, sugerindo um comprometimento das células com uma possível linhagem neural (Figura 14). Entre esses genes estão o receptor purinérgico, P2XR4, o qual já foi demonstrado sua diminuição de expressão ao longo do processo de diferenciação neuronal, chegando a

níveis praticamente indetectáveis por PCR real-time em células precursoras de neurônios e células P19 (Resende et al. 2007, 2008), da mesma forma como ocorreu com nossas células.

Outro gene que foi avaliado e demonstrou expressão diminuída ao longo do processo de diferenciação neural foi a arginilsucinato sintase (ASS), porém esse gene não acompanha achados em outros modelos como por exemplo células precursoras de neurônios (Lameu et al 2012), o que poderia ser um indício de uma diferenciação incompleta ou deficiente.

A possibilidade de uma diferenciação incompleta suscitou a necessidade de investigações relacionadas ao comprometimento de redes de transcrição específicas para neurônios, nesse cenário diversos fatores de transcrição, como ASCL1, MYT1 e Pou3f2 (também conhecido como Brn2), foram descritos como responsáveis para a diferenciação de células adultas diretamente para neurônios, principalmente em reprogramação de fibroblastos, uma célula mesodermal (Vierbuchen et al 2010).

Para células humanas existe a adição de mais um fator de transcrição, descrito posteriormente, NeuroD1, que foi demonstrado ser ativado pela ativação de ASCL1 (Pang et al 2011). A investigação de fatores de transcrição e sua influência na diferenciação de fibroblastos em diversos tipos de células, como miócitos, macrófagos, cardiomiócitos chegando a tipos específicos de neurônios, avançaram rapidamente nos últimos anos (Vierbuchen and Wernig, 2012), demonstrando a importância de avaliar esses importantes mediadores do destino celular e sua possível reprogramação.

Na diferenciação neuronal induzida em células tronco mesenquimais de lipoaspirado, os fatores de transcrição MYT1 e POU3F2 não demonstraram aumento de expressão após a indução de diferenciação mediada por NGF e BDNF, mas ASCL1, não apenas demonstrou que sofre um aumento de sua expressão como também o padrão de aumento de expressão é semelhante aos genes que tiveram sua expressão aumentada (Figura 15, GRIA2, NOS1, GRM2, CHRM1,3 e 4, P2YR1, P2YR4 e GABRA3), demonstrando que provavelmente o padrão de expressão desses genes deve ser regulado por esse fator de transcrição, desta forma sendo necessário investigações futuras que possam validar essa afirmação.

O que podemos inferir sobre os experimentos de diferenciação neuronal de células tronco mesenquimais de lipoaspirado, é que a estimulação das células por NGF e BDNF e as cascatas celulares deflagradas por seus receptores de tirosina quinase (A e B) acarretou na ativação de ASCL1, mas não de MYT1 e Pou3f2 (Figura 36).

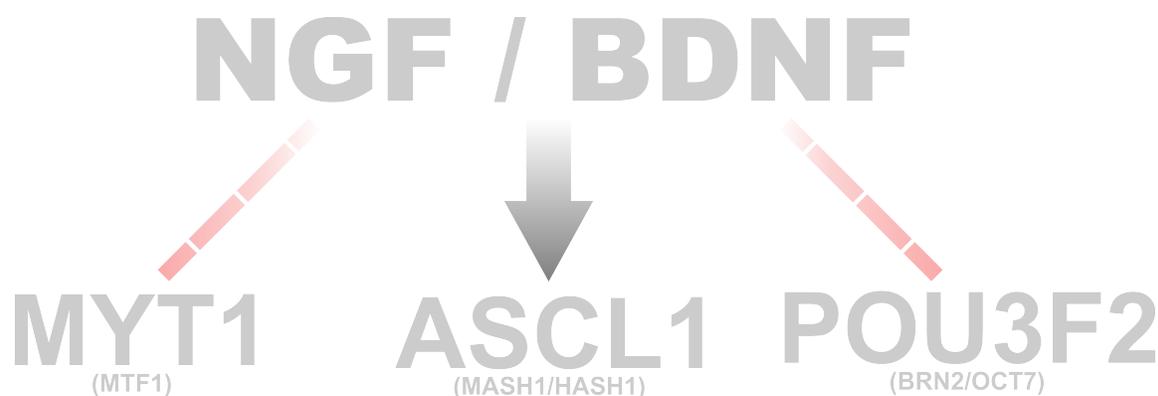


Figura 36: Modelo esquemático do processo de ativação de fatores de transcrição associados à diferenciação neuronal.

Dessa forma, fica evidenciado que o aumento da expressão de ASCL1 deflagrou padrões de ativação gênicas similares ao do fator de transcrição, regulando genes relacionados à diferenciação neural, desde marcadores específicos de neurônios a genes relacionados à responsividade para neurotransmissores.

As evidências indicam que ao produzir características de morfologia neuronal, expressão de marcadores neuronais, possível polarização da célula, assumindo um potencial de repouso próximo a -50/-70mV (dado não mostrado) e consequente expressão e funcionalidade de receptores de neurotransmissores, mas apenas com a ativação de ASCL1, foi atingido um nível de reprogramação parcial. As evidências podem ser colocadas em perspectiva de publicações que demonstram tal processo (Yang et al 2011), mas diferentemente do que discutido na literatura, a maior evidência de não comprometimento das células com sua diferenciação neuronal, não parte da falta de funcionalidade pré e pós sinápticas ou ainda de plasticidade sináptica, acreditamos que a principal evidência que suporta nossa afirmação de diferenciação parcial, é a desdiferenciação após a retirada dos fatores tróficos (Figura 37).

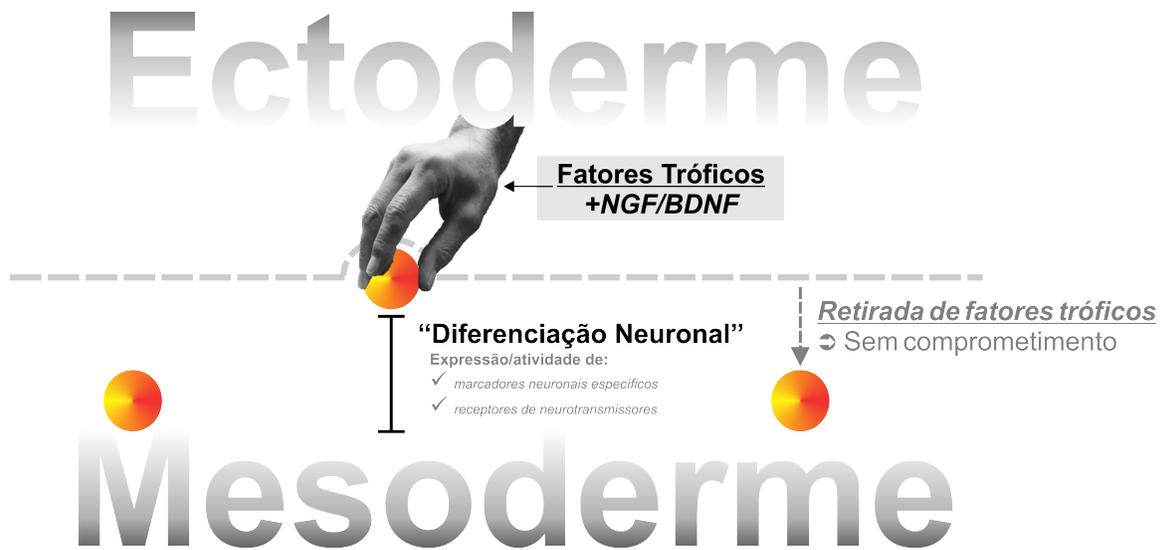


Figura 37: Processo de “diferenciação neuronal” de células tronco mesenquimais de lipoaspirado induzido por NGF/BDNF.

O processo como um todo, é semelhante a uma alavanca, uma ferramenta que força a célula a tentar cruzar a barreira entre folículo mesodermal (célula mesenquimal) e ectodermal (neurônio). Porém, tal ferramenta expressa sua inabilidade pela falta de funcionalidade ou silenciamento latente de fatores de transcrição essenciais para o comprometimento e reprogramação permanente das células estudadas.

Podemos inferir que a ferramenta possa apenas estar incompleta, já que produzimos um intermediário entre a transição mesoderme-ectoderme que tem diversas possíveis aplicações, como estudo de receptores mutados, teste de drogas a fim de serem mais efetivas sobre um grupo específico de pacientes chegando à medicina personalizada.

Finalmente, acreditamos que o processo descrito produz uma base para estudos futuros onde, utilizando fatores químicos (como neurotrofinas), reprogramar células tronco mesenquimais a se diferenciarem em neurônios, uma vez que precisaríamos encontrar fatores que possam ativar MYT1 e Pou3f2. Dessa forma, sendo utilizados em conjunto com fatores que levam à ativação de ASCL1 (descritos aqui) e possíveis outros fatores, teríamos uma maneira de reprogramação sem a necessidade de utilizarmos transcrições gênicas, o que facilitaria o uso dessas células por parte de autoridades regulatórias.

Investigar essas possibilidades, deflagraria para milhões de pacientes que ficam presos a uma cadeira de roda ou a uma cama por exemplo, a possibilidade de repovoarmos as regiões danificadas de seu sistema nervoso e desta forma aliviar os impactos de acidentes e danos neuronais, mas acima de tudo impactos irreversíveis sobre suas vidas.

5.2 SELEÇÃO DE APTÂMEROS PARA PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE LIPOASPIRADO

A hipótese por trás da seleção de aptâmeros capazes de identificar e isolar células tronco mesenquimais de lipoaspirado, se baseia na existência de antígenos presentes nessas células que são capazes de diferenciá-las de outras células vizinhas. Esses antígenos teriam de ser conservados entre diversos pacientes e também durante as primeiras passagens das células, para que pudéssemos utilizar as células durante o processo de seleção.

Diversos antígenos tem sido caracterizados como marcadores de células tronco mesenquimais de lipoaspirado, como CD29, CD44, CD90 e CD166, tendo alguns marcadores como CD34 e CD45 demonstrados marcações negativas para esse tipo celular (Nery et al 2013).

Baseado na existência de diversos antígenos, incluindo a possibilidade de haver antígenos ainda desconhecidos, que estejam presentes nas CTM de lipoaspirado, a utilização de uma técnica com suficiente poder para encontrar tais antígenos, desvendaria novos alvos assim como entregaria para os investigadores ligantes para serem utilizados na identificação das células. Com base nessas premissas, passamos a utilizar a técnica SELEX para selecionar moléculas que reconhecessem biomarcadores e a assinatura molecular de membrana específica das CTM de lipoaspirado. Assim poríamos utilizar as moléculas selecionadas como agentes de captura ou identificação (Nery et al 2009).

Foi avaliado endereçar uma necessidade latente dentro do campo de células tronco, a obtenção dessas células, com alto nível de pureza, dentro de um intervalo de tempo clinicamente viável. Produzindo uma ferramenta para purificação e isolamento das células, diminuindo o tempo consumido em sua

purificação e entregando a equipes médicas o potencial de uso dessas células dentro de uma sala de cirurgia.

A seleção de aptâmeros apresentada nessa tese, é a primeira seleção conduzida em nosso laboratório utilizando aptâmeros de DNA, o que acarretou a necessidade de uma documentação minuciosa da padronização do método para futuros projetos (Figuras 16-22).

A seleção ocorreu em ciclos iniciais de seleção positiva (Ciclos 1 e 2) seguidos de um ciclo de seleção negativa (Ciclo 3) (Figura 24). Ciclos subsequentes tiveram a inclusão de concentrações crescentes de competidores para sítios inespecíficos, a incorporação de ciclos duplos de seleção assim como aumento de lavagens e diminuição de número de alvos (Figura 8 – Tabela 1).

Em paralelo à seleção dos aptâmeros, iniciamos uma segunda seleção incorporando a técnica BRASIL (Giordano et al. 2001). Essa abordagem tem como vantagem aumentar a estringência de seleção por dificultar a presença de sequências contaminantes ao adicionar uma fase orgânica na separação das células com moléculas aderidas e moléculas não ligadas. (Figura 9). Essa seleção foi realizada a fim de verificar se em seleções distintas, chegaríamos a resultados semelhantes.

Foi observado em estágios intermediários de ambas as seleções (RX e BrX), a marcação específica de CTM em detrimento de marcação de eritrócitos, os principais contaminantes presentes no lipoaspirado (Figura 25).

A fim de investigarmos a marcação ao final das seleções (R12 e Br5), foram realizados experimentos de citometrias para verificar, tanto a marcação das células por aptâmeros como a comarcação com outros antígenos de CTM (CD29 e CD90). Na verificação das bibliotecas selecionadas, foi observado uma marcação de 9 e 12% para R12 e Br5 respectivamente (Figura 26). Essas marcações, quando analisadas apenas para células inteiras e unitárias (subtraindo restos celulares e células em duplicatas) chegaram a valores de 12 e 20% para R12 e Br5 respectivamente (Figura 27)

As evidências indicavam que dentro de nossas bibliotecas, R12 e Br5, haviam uma diversa população de moléculas que marcava tanto células CD29+/CD90+ como células apenas CD29+ ou CD90+, ou ainda células que não apresentavam nenhum dos dois antígenos (Figuras 28 e 29), tornando necessário o estudo das moléculas individuais que compunham ambas bibliotecas.

Em paralelo às avaliações da composição de ambas bibliotecas, foi realizado a prova de conceito para a purificação das células tronco diretamente de lipoaspirado processado. Esse procedimento utilizou as bibliotecas acopladas a nano-partículas magnéticas, sendo demonstrado que a purificação das células de contaminantes presentes no lipoaspirado é possível dentro de um tempo clinicamente viável e eliminando seu principal contaminante, eritrócitos (Figura 30).

Fica evidente a diferença de pureza e quantidade de presença de contaminantes celulares nas células não purificadas com aptâmeros, o qual é muito maior. Traduzindo isso para uma possível prática clínica, poderia evitar respostas celulares prejudiciais pela inserção de outros tipos celulares não multipotentes como as células mesenquimais. Um exemplo disso seria a utilização e CTM de lipoaspirado em regiões onde eritrócitos não são desejáveis, como SNC, recuperação de retina e outros locais, onde uma resposta contra um “edema” causado pela presença de células sanguíneas poderia arruinar os resultados dos testes clínicos para verificar a superioridade ou não inferioridade de um tratamento com células mesenquimais.

Aqui pode-se comparar nossa tentativa de desenvolver um método de purificação de células em comparação ao outros métodos já utilizados na literatura, como por exemplo o uso de anticorpos magnéticos. A principal vantagem do uso de aptâmeros seria, que por serem moléculas de ácidos nucléicos, elas poderiam ser sintetizadas de maneiras industrial, e dessa forma não apresentar diferenças entre lotes nem sensibilidade térmica, o que impede a perda de atividade ou reconhecimento que acontece com os anticorpos. Embora, os métodos citados, por estarem a mais tempo desenvolvidos, apresentam uma potencia de purificação e grau de pureza já estabelecidos e ainda superiores ao aqui demonstrados.

Dando seguimento às investigações sobre a composição das bibliotecas de aptâmeros, foram realizados sequenciamentos, tendo sido amostradas 800 sequências para cada biblioteca (R12 e Br5). A partir da obtenção dos dados, contamos com auxílio de bioinformática para alinharmos as regiões randômicas e clusterizar as sequências de acordo com a conservação da região randômica. Esses dados nos forneceram a frequência total de cada sequência, tanto em R12 como em Br5, com o qual produzimos o índice de presença dessas sequências (Figura 31).

Esse índice foi um dos discriminadores para realizarmos a primeira seleção de moléculas, pois nos permitiu achar sequências que apareceram prioritariamente em R12 e outras em Br5, assim como algumas que apareceram de maneira muito semelhante em ambas seleções, no caso as que apresentaram um índice de presença entre 0,5 e 1,5.

A partir desse ponto, foi realizado o agrupamento das sequências de acordo com sua similaridade o que revelou 5 classes distintas de aptâmeros, classes I, II, III, IV e V (Figura 32). A partir disso foram selecionados um aptâmero de cada classe, baseado nos aptâmeros com menor ΔG possível, além de dois aptâmeros que apresentaram índice de presença entre 0,5 e 1,5 e dois aptâmeros com aparição majoritária em cada uma das bibliotecas (R12 e Br5) (Figura 32).

Dessa forma obtivemos uma visão mais clara do processo de seleção de moléculas de ácidos nucleicos através da técnica SELEX, onde dentro de um grupo inicial de sequências únicas, com as mais diversas características, ao longo dos ciclos de seleção, vão sendo selecionadas sequências com K_d cada vez mais baixos e com uma população cada vez mais homogênea quando comparado à biblioteca inicial, ao ponto de podermos agrupar as sequências encontradas em poucas famílias, ou classes, de aptâmeros (Figura 38).

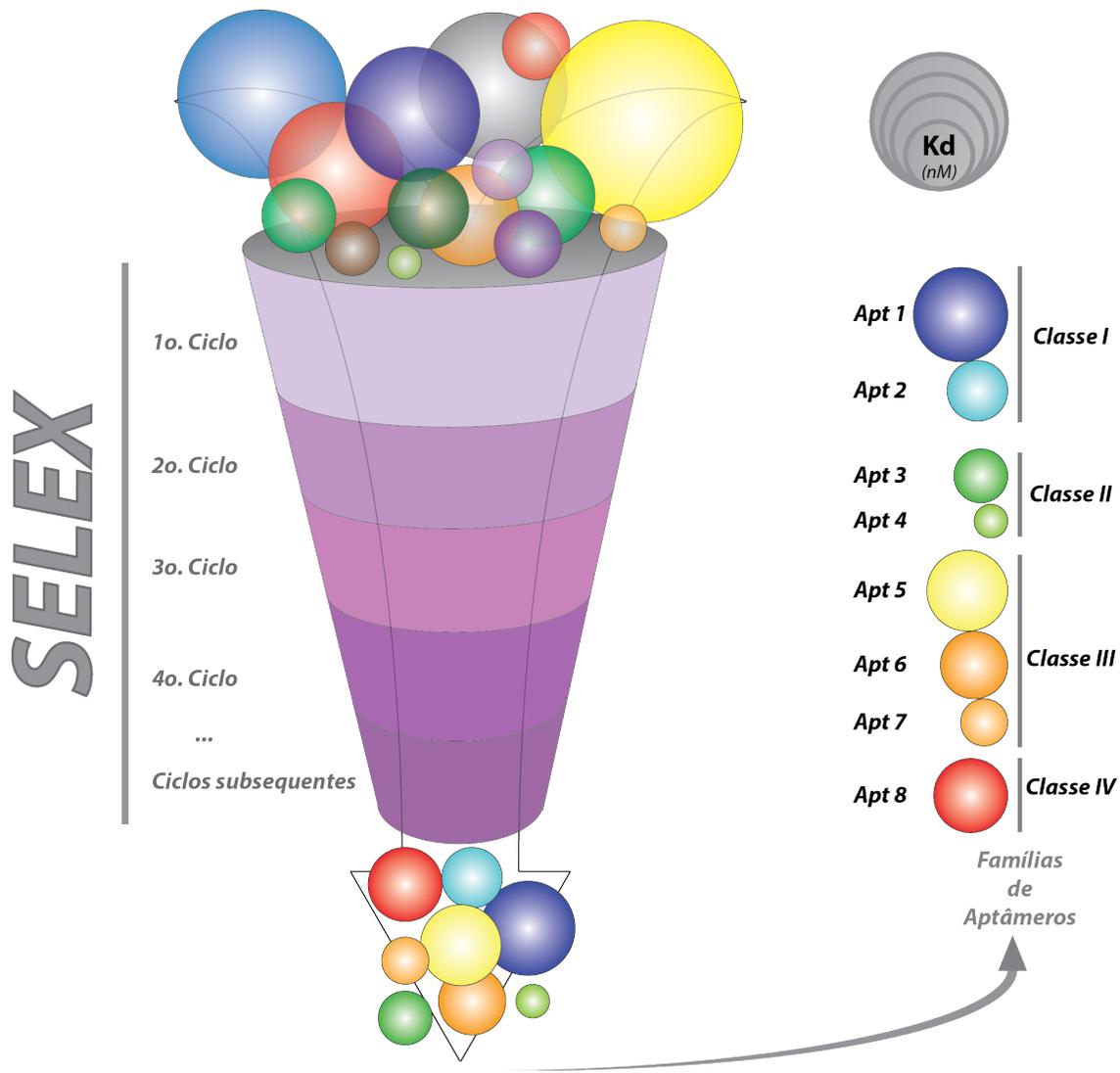


Figura 38: Modelo do processo de seleção de seqüências de DNA através da técnica SELEX. Ao final de diversos ciclos de seleção, que excluem seqüências com baixa afinidade pelo alvo, conseguimos agrupar uma população antes heterogênea, em poucas famílias ou classes de aptâmeros.

As estruturas possibilitaram para nós identificar que além das seqüências similares (ANEXOS V, VI, VII, VIII, IX e X), a informação estrutural contida nos aptâmeros também era conservada entre famílias, como podemos verificar na classe IV e como essa informação era diferente de outros aptâmeros como a classe II ou ainda do aptâmeros 11-R12.

A dependência entre estrutura e sequência é relatada (Hoinka et al 2012) por ser essencial para que parte das sequências conservadas sejam apresentadas nas regiões de *loops*, o que denotaria uma conservação de informação estrutural referente a regiões de interação do aptâmero.

As sequências que foram selecionadas e categorizadas em classes de aptâmeros, (Classes I, II, III, IV, V) demonstram uma grande relação entre sequência e estrutura, o qual é composta tanto pelas regiões flanqueadoras constantes, quanto a região central randômica.

A Classe I (ANEXO V), apresenta 3 aptâmeros identificados, com alta conservação entre suas regiões randômicas, o que produzem estruturas com dois *loopings* principais sendo que o APT3 e AP5, apresentam apenas 2 letras diferentes entre si, e ΔG dentro de toda família muito próxima na casa de -12Kcal/mol.

A Classe II (ANEXO VI), também com 3 indivíduos, apresenta uma maior diferença entre as sequências randômicas do que a Classe I mas ainda com uma semelhança próxima de 90%, porém nesse caso, as estruturas já apresentam diferenças visíveis e intimamente ligadas às suas sequências randômicas. A principal diferença ocorre nos dois *loopings* mais proximais do corpo do aptâmero, quando considerando braço maior da estrutura base formada na Classe II.

No APT7 podemos ver a formação de dois *loopings* completos e então um *looping* distal que se mantém no APT8, porém esse apresenta *loopings* proximais deformados, ambos aptâmeros apresentando um ΔG de -9Kcal/mol aproximadamente. O APT9, dentro da família apresentou o valor mais baixo de energia livre, chegando a -11Kcal/mol, e apresentando uma estrutura mais harmônica com relação aos *loopings* proximais do que o APT8, mas com um *looping* distal menor do que o APT7, atribuindo à molécula uma grampo muito mais fino e longilíneo.

Na Classe III, apresentando apenas 2 integrantes, a principal diferença fica no terceiro braço (a partir do terminal 5') onde no terminal 3, ocorre a formação de um par de base não pareado na base do braço.

A Classe IV, apresenta o maior número de indivíduos dentro das classes analisadas, e também a maior variação entre as sequências e suas estruturas, sendo que a estrutura principal apresenta dois braços principais conservados ao longo das moléculas, devido a diversidade de valores de ΔG , o que nos levou a escolher uma molécula que tinha tanto, a principal parte da estrutura conservada da Classe IV quanto o menor ΔG , nos levando a selecionar o APT19 para testes.

Finalmente a Classe V, apresentando também 2 integrantes, as diferenças ficaram no primeiro e terceiro braços, tendo sido a escolha baseada na molécula com menor energia livre, no caso o APT27.

Com os candidatos selecionados, foram realizados experimentos para verificação de sua eficiência na marcação das CTM de lipoaspirado. Nesses experimentos foram adicionados testes para verificação de marcação de células CD34+ e CD45+, os quais apresentaram resultados negativos. Nesses experimentos de padronização um "pool" dos aptâmeros sintetizados apresentou marcação nas células de 9% enquanto o controle negativo de 3% (Figura 33).

Com os experimentos das sequências selecionadas de cada família, obtivemos dois principais candidatos, aptâmero 9-Classe II e aptâmero 11-R12, os quais apresentaram taxas de ligação às células de 16% e 24% respectivamente (Figuras 34 e 35).

A ligação de um aptâmeros a seu alvo, ocorre com base em suas formas tridimensionais específicas e complexas, caracterizadas por hastes (troncos), loops (voltas), grampos, pseudos-nós, triplexes e quadruplexes de DNA interagindo com o alvo (Strehlitz et al 2012). Quando os aptâmeros que apresentaram os melhores desempenhos são analisados quanto a sua estrutura, verificamos que ambos apresentam estruturas de grampos muito bem definidas.

A Classe II apresenta de maneira geral uma estrutura majoritária de grampos, com dois grampos, sendo o segundo (no sentido 5'-3') um grampo de grande extensão, contendo dois nós de tamanho variáveis dentro da família, mas com um *loop* distal conservado. É observado no aptâmero 11 uma estrutura principal de grampo, similar ao segundo grampo da Classe II, onde ocorrem dois nós internos ao grampo com um *loop* distal.

Observa-se que as bases expostas em ambos os *loops* distais são ricas em GC, sendo para aptâmero 9-ClasseII o *loop* formado por CCC•AGG•GGG e para o aptâmeros 11-R12 formado por GCGC•CCGA•GCGC. A presença de GC nas regiões de *loops* distais em estruturas de grampo favoreceria a interação por disponibilizar mais pontes de hidrogênio possíveis para interação da molécula com seu alvo, quando comparado a *loopings* ricos em AT (ou AU para aptâmeros de RNA).

Essa característica não é um determinante para seleção de regiões conservadas, mesmo porque cada alvo irá ter uma sequência/estrutura que será selecionada. Isso fica evidente em trabalhos que selecionaram para testes funcionais algumas regiões truncadas, onde uma observação mais aprofundado sobre regiões conservada mostra distribuições diversas entre A•C•G•T•U (Rockey et al 2011; Sivaprakasam et al 2011)

Outros candidatos, além dos selecionados aqui, ainda precisam ser avaliados pois podem haver diferenças entre as eficiências de ligação dentro de cada uma das famílias, ou ainda, termos bons candidatos que não entraram e nenhum de nossos discriminadores. Baseado nesse fato, as sequências selecionadas e identificadas foram patenteadas (26.08.13, protocolado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - I.N.P.I./S.P. o depósito do pedido de patente de sob o título “POLINUCLEOTÍDEOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLINUCLEOTÍDEOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS”, o qual recebeu o nº. BR 10 2013 021701-8).

Com a proteção intelectual podemos prever a exploração de cada uma das moléculas selecionadas visto as suas utilidades na terapia celular e entender o que significa essas subpopulações celulares os quais elas parecem selecionar. Essa subpopulação poderia ser um grupo de células mais conservadas, apresentando características de replicação ou de potência de diferenciação maiores ou diferentes do que as células purificadas classicamente, fato que já foi suscitado recentemente na literatura (Heneidi et al 2013).

Assim, ao desenvolvermos aptâmeros que se ligam a células tronco mesenquimais humanas, devemos ter novos ligantes para alvos conhecidos entre nossas moléculas, como por exemplo, aptâmeros que se ligam em CD29 ou CD90, embora os candidatos selecionados não apresentam indícios de se ligarem nesses alvos. De maneira análoga, novos ligantes para alvos desconhecidos, alvos que podemos apenas hipotetizar estar presentes nas células, e se adicionarmos mais um modelo celular na seleção, como por exemplo, células tronco mesenquimais de medula óssea, poderemos encontrar ligantes para CD117 (c-Kit), chegando assim à conclusão que as células oriundas de lipoaspirado também devem apresentar tal antígeno (Figura 39).

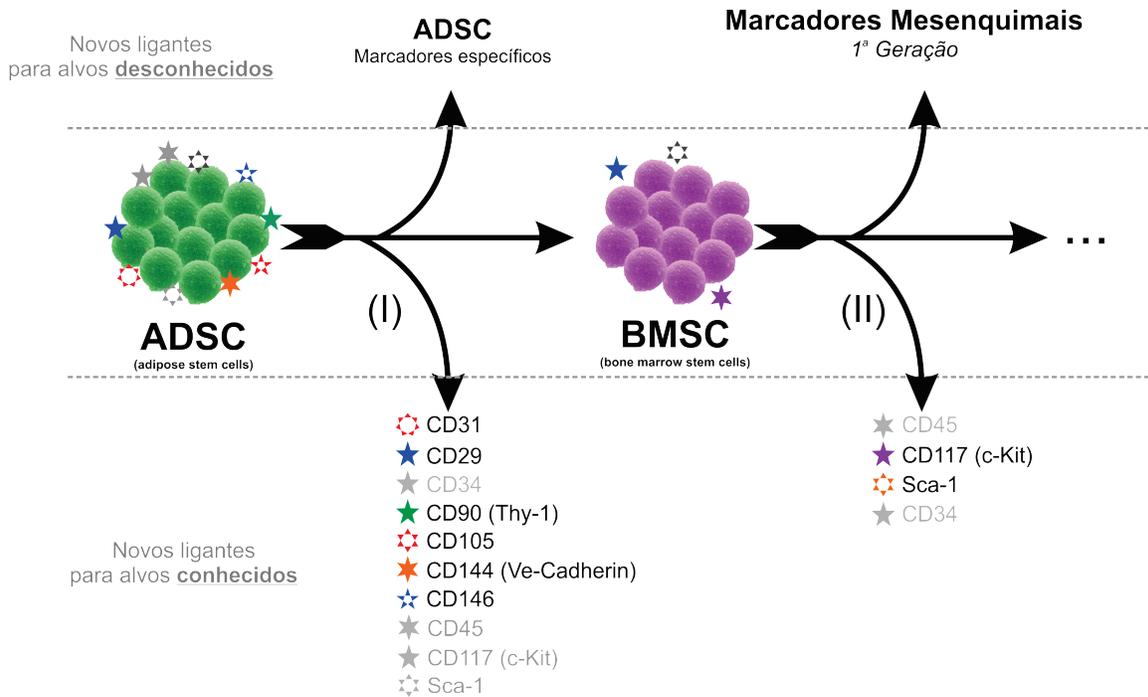


Figura 39: Modelo esquemático dos tipos de alvos aos quais os aptâmeros das bibliotecas R12 e BR5 podem se ligar. Dentro dessas bibliotecas devemos ter ligantes para alvos conhecidos e desconhecidos, inclusive compartilhados por outros tipos de células tronco mesenquimais, dessa forma, podendo viabilizar-nos encontrar marcadores mesenquimais mais amplos, para outros tipos celulares como medula óssea.

Se ao final da seleção (a partir das bibliotecas R12 e BR5) em um segundo tipo celular ainda tivermos novos ligantes para alvos comuns desconhecidos, poderemos já de antemão chamar esses novos alvos de marcadores mesenquimais de primeira geração, pois estarão presentes em dois tipos celulares mesenquimais com características de células tronco, fazendo com que esses alvos se tornem muito oportunos para futuros usos dessas células, já que passam a ser um marcador muito mais estrigente do que os já descritos (Figura 39).

Nesta mesma direção, podemos ir acrescentando à seleção das duas bibliotecas, R12 e Br5, novos tipos celulares, como por exemplo, células tronco de polpa dentária, e obtermos assim, para cada incorporação de um tipo celular, uma nova geração de marcadores mesenquimais (Figura 40), abrindo campo para encontrarmos um único marcador presente em todas as células tronco de origem mesenquimal, ao invés de apenas um tipo dessas células, no caso de tecido adiposo como descrito nesta tese.

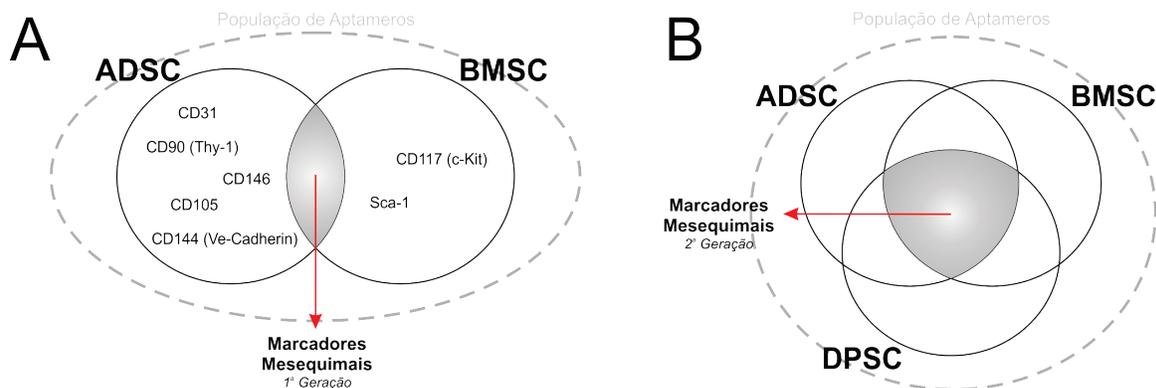


Figura 40: Modelo esquemático de como as seleções podem evoluir. No exemplo demonstrado, a seleção evoluiria na direção de serem obtidos marcadores mesenquimais mais amplos, no caso adicionando células de polpa dentária.

O processo de identificação de aptâmeros para usos terapêuticos e diagnósticos fica evidenciado com essa abordagem (Germer et al 2013). Tomando por exemplo a possibilidade de selecionarmos contra células de um tumor, e utilizar suas células vizinhas (de tecido saudável) em seleções negativas (Shangguan et al 2006), poderemos achar moléculas que se liguem em alvos terapêuticos, que levem a morte dessas células por exemplo, mas também presente em nossa biblioteca, poderemos ter tanto moléculas capazes de encontrar as células desejadas, entregando outros fármacos e finalmente sequências que podem simplesmente serem ferramentas de diagnóstico para achar uma célula metastática daquele tumor específico na corrente sanguínea. Assim ao custo de uma única seleção a técnica SELEX entrega ao desenvolvedor um grande espectro de possibilidade de ferramentas ao final do processo.

Dessa forma, a possibilidade de utilizar aptâmeros selecionados contra a AMM de diversos tipos celulares, viabiliza o emprego dessas moléculas para identificação de células tronco de câncer, para terapia direcionada (Ababneh et al. 2013, O'Connor et al. 2014) ou ainda viabilizar CTM para terapias celulares, como por exemplo terapias cardíacas (Schäfer et al. 2007, Hoffmann et al. 2008).

Assim, aptâmeros passam a apresentar tantas possibilidades quanto anticorpos, porém com ainda mais possibilidades, permitindo que essa tecnologia passe a ser considerada em diversas aplicações que antes apresentavam apenas anticorpos como candidatos (Lollo et al. 2014, Kong and Byun 2013, Smuc et al. 2013).

Fica demonstrado que o processo de seleção de aptâmeros que identificam um tipo específico celular baseado em sua assinatura molecular de membrana é possível, mesmo esse sistema já tendo sido demonstrado anteriormente (Shangguan et al 2008, Guo et al., 2006) incluindo tendo como alvo células tronco mesenquimais de porco, porém não contra células tronco mesenquimais humana. A questão mais inovadora da seleção aqui demonstrada, foi a capacidade achar um ou mais antígenos de superfície que são conservados em uma população diversa, tendo a seleção ocorrido sobre uma população até então denominada pura, com base em antígenos clássicos de superfície (CD29 e CD90 por exemplo).

Além disso, a prova de conceito que aptâmeros podem purificar células tronco dentro de um intervalo de tempo clinicamente viável, permite abrir espaço para diversas possibilidades de uso dessas células em testes clínicos, que podem tratar desde doenças cardíacas, lesões ósseas, musculares e neuronais (Nery et al 2013).

De maneira geral, não pode ser deixado de ser mencionado que ainda falta algumas questões a serem respondidas, como por exemplo, temos uma especificidade por um tipo celular, mas essa marcação apresenta sensibilidade suficiente para uso comercial e dentro dessa pergunta, teríamos de responder qual a nossa porcentagem de encontrar falsos negativos e falsos positivos em purificações utilizando nossos aptâmeros, e finalmente, a ligação dos aptâmeros deflagra uma resposta biológica nas células que depois poderão ser transplantadas ou não.

6 CONCLUSÕES

6.1 DIFERENCIAÇÃO NEURAL

O processo de diferenciação neural proposto, utilizando fatores tróficos e de crescimento ao invés de metodologias mais agressivas, como ácido retinóico aumentando a morte celular, para a diferenciação, atingiu relativo sucesso, por produzir células que apresentaram marcadores específicos de neurônios como MAP-2, NeuN, NF200 e BIII-tubulina.

Foi observado além de marcadores específicos a mudança da morfologia celular para uma morfologia neural que apresentava responsividade para diversos neurotransmissores, inclusive com muitos dos receptores para essas moléculas, apresentando aumento de expressão ao longo do processo, incluindo receptores de glutamato, GABA, acetilcolina e óxido nítrico sintase neural.

Outros receptores que classicamente estão associados a outros tipos celulares ou tem sua expressão diminuída na diferenciação neural apresentaram resultados confirmatórios para a diferenciação proposta no projeto. Infelizmente o processo de determinação do destino neural não foi sustentado, explicado pela não ativação de todos os fatores de transcrição que vêm sendo associados à determinação do destino neural na literatura.

Assim com a ativação de apenas um dos 3 fatores de transcrição durante o processo pudemos explicar o sucesso parcial do proposto. Desta forma, buscar fatores tróficos que possam ativar os outros dois fatores de transcrição juntamente com o protocolo desenvolvido aqui poderá levar ao desenvolvimento de um processo de indução de diferenciação neural que tenha sucesso em obter células plenamente funcionais e capazes de se integrar em uma rede neural para prover para diversos pacientes a possibilidade de reparo de tecido neural lesionados.

6.2 SELEX

O processo de desenvolver aptâmeros que fossem capazes de purificar células tronco mesenquimais diretamente de tecido adiposo oriundo de lipoaspiração processada foi bem sucedido, tendo obtido uma prova de conceito contundente da viabilidade do processo.

Dentre todos os candidatos levantados, dois aptâmeros se destacaram, sendo esses que devem seguir para futuras avaliações, seja dos alvos aos quais eles se ligam ou sobre quais são as características das subpopulações que eles identificam.

De maneira geral, conseguimos produzir uma ferramenta capaz de estar na base de todas as pesquisas clínicas envolvendo células tronco mesenquimais, uma vez que independente da aplicação das células, seja para recuperação cardíaca após um enfarto, recuperação de tendões, cartilagem, músculo e até possivelmente tecido nervoso, obter essas células de maneira rápida e com alta pureza seria essencial.

Ao mostrarmos que a técnica é capaz de obter esse tipo de performance e ainda por cima melhorá-la com a fusão com técnicas de separação efetiva, como BRASIL, mostramos como poderemos desenvolver no futuro, novas moléculas com atividade biológica para diversas aplicações, seja purificação de células, inibidores de receptores específicos e até inibidores de enzimas específicas que possam ser alvos em finalidades terapêuticas.

7 BIBLIOGRAFIA

- Ababneh N, Alshaer W, Allozi O, Mahafzah A, El-Khateeb M, Hillaireau H, Noiray M, Fattal E, Ismail S. (2013) In vitro selection of modified RNA aptamers against CD44 cancer stem cell marker. *Nucleic Acid Ther.* Dec;23(6):401-7.
- Ahmed TA, Hincke MT. (2014) Mesenchymal stem cell - based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. *Histol Histopathol.* Jan 23. [Epub ahead of print]
- Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim, P, Hedrick MH (2003). In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plastic Reconstructive Surgery*, 111(6), 1922-1931.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats: similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3908–3913.
- Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann S. (1990) Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* 5(5):583-595.
- Beutel BA, Gold L. (1992) In vitro evolution of intrinsically bent DNA. *J Mol Biol.* Dec 5;228(3):803-12.
- Bibber B1, Sinha G1, Lobba AR2, Greco SJ3, Rameshwar P4. (2013) A Review of Stem Cell Translation and Potential Confounds by Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int.* 241048.
- Blank M, Weinschenk T, Priemer M, Schluensener H. (2001). Systematic Evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. *J Biol Chem.* 276, 16464-16468.
- Bojic S, Volarevic V, Lujic B, Stojkovic M. (2014) Dental stem cells - characteristics and potential. *Histol Histopathol.* Jan 21. [Epub ahead of print]
- Bossio C, Mastrangelo R, Morini R, Tonna N, Coco S, Verderio C, Matteoli M, Bianco F. (2013) A simple method to generate adipose stem cell-derived neurons for screening purposes. *J Mol Neurosci.* Oct;51(2):274-81.
- Broide RS, Leslie FM. (1999) The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol.* Aug;20(1):1-16.
- Bruel-Jungerman E, Lucassen PJ, Francis F. (2011) Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behav Brain Res.* Aug 10;221(2):379-88.
- Cameron HA, Hazel TG, McKay RDG. (1998). Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *Growth Factors and Neurotransmitters*, 36, 287-306.
- Cardeal LB, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, di Loreto C, Longatto Filho A, Villa LL, Maria-Engler SS. (2012) HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS One*;7(3)
- Cheuk DK. (2013) Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant.* Dec 24;3(4):99-112.
- Christie KJ, Emery B, Denham M, Bujalka H, Cate HS, Turnley AM. (2013) Transcriptional regulation and specification of neural stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 786:129-55.
- Chung CS, Fujita N, Kawahara N, Yui S, Nam E, Nishimura R. (2013) A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Med Sci.* Jul 31;75(7):879-86.
- Cirulli F, Alleva E. (2009) The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Front Neuroendocrinol.* Aug;30(3):379-95.
- Cole KS (1949). Some physical aspects of bioelectric phenomena, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 35, 558-566.
- Corty MM, Freeman MR. (2013) Cell biology in neuroscience: Architects in neural circuit design: glia control neuron numbers and connectivity. *J Cell Biol.* Nov 11;203(3):395-405.
- Daniels DA; Chen H; Hicke BJ; Swiderek KM; Gold L. (2003). A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 15416–15421
- Dariolli R, Bassaneze V, Nakamuta JS, Omae SV, Campos LC, Krieger JE. (2013) Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. *PLoS One.* Jul 9;8(7)
- De Bruyn C, Najar M, Raicevic G, Meuleman N, Pieters K, Stamatopoulos B, Delforge A, Bron D, Lagneaux L. (2011) A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. *Stem Cells Dev.* Mar;20(3):547-57.
- Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 282:148–152.
- Ellington AD; Szostak JW. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.
- Ernsberger U. (2009) Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell Tissue Res.* Jun;336(3):349-84.
- Fargali S, Sadahiro M, Jiang C, Frick AL, Indall T, Cogliani V, Welagen J, Lin WJ, Salton SR. (2012) Role of neurotrophins in the development and function of neural circuits that regulate energy homeostasis. *J Mol Neurosci.* Nov;48(3):654-9.

- Fariñas I, Cano-Jaimez M, Bellmunt E, Soriano M. (2002) Regulation of neurogenesis by neurotrophins in developing spinal sensory ganglia. *Brain Res Bull.* Apr;57(6):809-16.
- Ferroni L, Gardin C, Tocco I, Epis R, Casadei A, Vindigni V, Mucci G, Zavan B. (2013) Potential for neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 129:89-115.
- Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, Cantarelli Machado D, Pêgas Henriques JA. (2009) Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation.* Mar;77(3):221-8.
- Fuentes T, Kearns-Jonker M. (2013) Endogenous cardiac stem cells for the treatment of heart failure. *Stem Cells Cloning.* Mar 25;6:1-12.
- Germer K, Leonard M, Zhang X. (2013) RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. *Int J Biochem Mol Biol.* Mar 31;4(1):27-40.
- Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. (2001) Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med.* Nov;7(11):1249-53.
- Glaser T, Resende RR, Ulrich H. (2013) Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation. *Cell Commun Signal.* Feb 17;11(1):12.
- Guo K, Schäfer R, Paul A, Gerber A, Ziemer G, Wendel HP. (2006) A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. *Stem Cells* 24:2220-2231.
- Gupta K, Hardingham GE, Chandran S. (2013) NMDA receptor-dependent glutamate excitotoxicity in human embryonic stem cell-derived neurons. *Neurosci Lett.* May 24;543:95-100.
- Hess GP, Ulrich H, Breiting HG, Niu L, Gameiro AM, Grewer C, Srivastava S, Ippolito JE, Lee SM, Jayaraman V, Coombs SE. (2000) Mechanism-based discovery of ligands that counteract inhibition of the nicotinic acetylcholine receptor by cocaine and MK-801. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 5;97(25):13895-900.
- Ho PL, Raw I. (1992) Cyclic AMP potentiates bFGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Cell Physiol.* Mar;150(3):647-56.
- Hoffmann J, Paul A, Harwardt M, Groll J, Reeswinkel T, Klee D, Moeller M, Fischer H, Walker T, Greiner T, Ziemer G, Wendel HP. (2008) Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Mar 1;84(3):614-21.
- Hoinka J, Zotenko E, Friedman A, Sauna ZE, Przytycka TM. (2012) Identification of sequence-structure RNA binding motifs for SELEX-derived aptamers. *Bioinformatics.* 2012 Jun 15;28(12):i215-23.
- Ishikawa T, Banas A, Teratani T, Iwaguro H, Ochiya T. (2012) Regenerative cells for transplantation in hepatic failure. *Cell Transplant.* 21(2-3):387-99.
- Jansson LC, Louhivuori L, Wigren HK, Nordström T, Louhivuori V, Castrén ML, Åkerman KE. (2012) Brain-derived neurotrophic factor increases the motility of a particular N-methyl-D-aspartate /GABA-responsive subset of neural progenitor cells. *Neuroscience.* Nov 8;224:223-34.
- Kanno H. (2013) Regenerative therapy for neuronal diseases with transplantation of somatic stem cells. *World J Stem Cells.* Oct 26;5(4):163-171.
- Kassem M, Burns JS, Garcia Castro J, Rubio Munoz D. (2005) Adult Stem Cells and Cancer. *Cancer Res.* 65(20):9601.
- Kim CH, Lee LP, Min JR, Lim MW, Jeong SH. (2013) An indirect competitive assay-based aptasensor for detection of oxytetracycline in milk. *Biosens Bioelectron.* 2013 Aug 13.
- Kitada M. (2012) Mesenchymal cell populations: development of the induction systems for Schwann cells and neuronal cells and finding the unique stem cell population. *Anat Sci Int.* Mar;87(1):24-44.
- Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. (2001) Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68:235-244.
- Kong HY, Byun J. (2013) Nucleic Acid Aptamers: New Methods for Selection, Stabilization, and Application in Biomedical Science. *Biomol Ther (Seoul).* 2013 Nov;21(6):423-434.
- König J, Julius C, Baumann S, Homann M, Göringer HU, Feldbrügge M. (2007) Combining SELEX and the yeast three-hybrid system for in vivo selection and classification of RNA aptamers. *RNA.* 2007 Apr;13(4):614-22.
- Krishtal OA, Pidoplichko VI. (1980) A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience,* 5, 2325-2327.
- Lameu C, Trujillo CA, Schwindt TT, Negraes PD, Pillat MM, Morais KL, Lebrun I, Ulrich H. (2012) Interactions between the NO-citrulline cycle and brain-derived neurotrophic factor in differentiation of neural stem cells. *J Biol Chem.* Aug 24;287(35):29690-701.
- Le Blanc K, Pittenger M. (2005) Mesenchymal stem cells: progress promise. *Cytotherapy* 7(1):36-45.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods,* Dec, v.25(4), p.402-8.
- Lo Furno D, Pellitteri R, Graziano AC, Giuffrida R, Vancheri C, Gili E, Cardile V. (2013) Differentiation of human adipose stem cells into neural phenotype by neuroblastoma- or olfactory ensheathing cells-conditioned medium. *J Cell Physiol.* Nov;228(11):2109-18.
- Lollo B, Steele F, Gold L. (2014) Beyond antibodies: new affinity reagents to unlock the proteome. *Proteomics.* Jan 6.
- Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, Südhof TC, Wernig M. (2012) Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 14;109(7):2527-32.
- Lujan E, Wernig M. The many roads to Rome: induction of neural precursor cells from fibroblasts. *Curr Opin Genet Dev.*

(2012) Oct;22(5):517-22.

Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ. (2005) Stem cell biology – a never ending quest for understanding. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 353-358.

Martins AH, Alves JM, Trujillo CA, Schwindt TT, Barnabé GF, Motta FL, Guimaraes AO, Casarini DE, Mello LE, Pesquero JB, Ulrich H. Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres. *Cytometry A*. 2008 Apr;73(4):361-8.

Martins AH, Alves JM, Trujillo CA, Schwindt TT, Barnabé GF, Motta FL, Guimaraes AO, Casarini DE, Mello LE, Pesquero JB, Ulrich H. (2008) Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres. *Cytometry A*. 2008 Apr;73(4):361-8.

Martins AH, Resende RR, Majumder P, Faria M, Casarini DE, Tármok A, Colli W, Pesquero JB, Ulrich H. *J Biol Chem*. (2005) Neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells modulates kinin B2 receptor gene expression and function. May 20;280(20):19576-86.

Montiel-Eulefi E, Nery AA, Rodrigues LC, Sánchez R, Romero F, Ulrich H. (2012). Neural differentiation of rat aorta pericyte cells. *Cytometry A*. Jan;81(1):65-71.

Moroni L, Fornasari PM. (2013) Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. *J Cell Physiol*. Apr;228(4):680-7. doi: 10.1002/jcp.24223.

Muñoz-Eliáz, G., Woodbury, D., Black, I.B., (2001). Marrow Stromal Cells, Mitosis, and Neural Differentiation: Stem Cell and Precursor Function. *Stem Cells* 21, 437-448.

Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. (2013) Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry A*. 2013 Jan;83(1):48-61.

Nery AA, Resende RR, Martins AH, Trujillo CA, Eterovic VA, Ulrich H. (2010) Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor expression and activity during neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *J Mol Neurosci*. Jul;41(3):329-39.

Nery AA, Wrenger C, Ulrich H. (2009) Recognition of biomarkers and cell-specific molecular signatures: aptamers as capture agents. *J Sep Sci*. May;32(10):1523-30.

Nguyen, L., Rigo, J.M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., Moonen, G. (2001). Neurotransmitters as early signals for central nervous system development, *Cell Tissue Research*, 305, 187-202.

O'Connor ML, Xiang D, Shigdar S, Macdonald J, Li Y, Wang T, Pu C, Wang Z, Qiao L, Duan W. (2014) Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Lett*. Mar 28;344(2):180-187.

Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, Citri A, Sebastiano V, Marro S, Südhof TC, Wernig M. (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*. May 26;476(7359):220-3.

Park H, Poo MM. (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. Jan;14(1):7-23.

Pilz GA, Braun J, Ulrich C, Felka T, Warstat K, Ruh M, Schewe B, Abele H, Larbi A, Aicher WK. (2011) Human mesenchymal stromal cells express CD14 cross-reactive epitopes. *Cytometry A*. Aug;79(8):635-45.

Poon VY, Choi S, Park M. (2013) Growth factors in synaptic function. *Front Synaptic Neurosci*. 2013 Sep 18;5:6.

Porcher C, Hatchett C, Longbottom RE, McAinch K, Sihra TS, Moss SJ, Thomson AM, Jovanovic JN. (2011) Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J Biol Chem*. Jun 17;286(24):21667-77.

Resende RR, Adhikari A. (2009) Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Commun Signal*. Aug 27;7:20.

Resende RR, Alves AS, Britto LR, Ulrich H. (2008) Role of acetylcholine receptors in proliferation and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*. Apr 15;314(7):1429-43.

Resende RR, Britto LR, Ulrich H. (2008) Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Neurosci*. Nov;26(7):763-77.

Resende RR, Majumder P, Gomes KN, Britto LR, Ulrich H. (2007) P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience*. 2007 May 25;146(3):1169-81.

Resende RR, Majumder P, Gomes KN, Britto LR, Ulrich H. (2007) P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience*. May 25;146(3):1169-81.

Rockey WM, Hernandez FJ, Huang SY, Cao S, Howell CA, Thomas GS, Liu XY, Lapteva N, Spencer DM, McNamara JO, Zou X, Chen SJ, Giangrande PH. (2011) Rational truncation of an RNA aptamer to prostate-specific membrane antigen using computational structural modeling. *Nucleic Acid Ther*. Oct;21(5):299-314.

Sakagushi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 2521-2529.

Salibian AA, Widgerow AD, Abrouk M, Evans GR. (2013) Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. *Arch Plast Surg*. Nov;40(6):666-75.

Sanchez-Ramos J, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR. (2001) Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 171:109–115.

Sanchez-Ramos JR, Cardozo-Pelaez F, Song S. (1998) Differentiation of neuron-like cells from bone marrow stromal cells. *Mov Disord* 13(Suppl): 122-124

- Sanchez-Ramos JR, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164:247–256.
- Sanchez-Ramos JR. (2002) Neural Cells Derived From Adult Bone Marrow and Umbilical Cord Blood. *Journal of Neuroscience Research* 69:880–893.
- Savory N, Takahashi Y, Tsukakoshi K, Hasegawa H, Takase M, Abe K, Yoshida W, Ferri S, Kumazawa S, Sode K, Ikebukuro K. (2013) Simultaneous improvement of specificity and affinity of aptamers against *Streptococcus mutans* by in silico maturation for biosensor development. *Biotechnol Bioeng*. Sep 10.
- Schäfer R, Wiskirchen J, Guo K, Neumann B, Kehlbach R, Pintaske J, Voth V, Walker T, Scheule AM, Greiner TO, Hermanutz-Klein U, Claussen CD, Northoff H, Ziemer G, Wendel HP. (2007) Aptamer-based isolation and subsequent imaging of mesenchymal stem cells in ischemic myocardium by magnetic resonance imaging. *Rofo*. 2007 Oct;179(10):1009-15.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 3(6):1101-8. 2008.
- Schwindt TT, Trujillo CA, Negraes PD, Lameu C, Ulrich H. (2011) Directed differentiation of neural progenitors into neurons is accompanied by altered expression of P2X purinergic receptors. *J Mol Neurosci*. Jul;44(3):141-6.
- Shangguan D, Li U, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, Sefah K, Yang CJ, Tan W. (2006) Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103, 11838–11843.
- Shen JX, Qin D, Wang H, Wu C, Shi FD, Wu J. (2013) Roles of nicotinic acetylcholine receptors in stem cell survival/apoptosis, proliferation and differentiation. *Curr Mol Med*. Nov;13(9):1455-64.
- Shen JX, Qin D, Wang H, Wu C, Shi FD, Wu J. (2013) Roles of nicotinic acetylcholine receptors in stem cell survival/apoptosis, proliferation and differentiation. *Curr Mol Med*. Nov;13(9):1455-64.
- Sivaprakasam K, Pagán OR, Hess GP. (2010) Minimal RNA aptamer sequences that can inhibit or alleviate noncompetitive inhibition of the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. *J Membr Biol*. Feb;233(1-3):1-12.
- Šmuc T, Ahn IY, Ulrich H. (2013) Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensorics. *J Pharm Biomed Anal*. Jul-Aug;81-82:210-7.
- Spitzer NC, Kingston PA, Manning Jr TJ, Conklin MW. (2002) Outside and in: development of neural excitability, *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 315-323.
- Strehlitz B, Reinemann C, Linkorn S, Stoltenburg R. (2012) Aptamers for pharmaceuticals and their application in environmental analytics. *Bioanal Rev*. Mar;4(1):1-30. Epub 2011 Dec 17.
- Strem BB, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Hedrick MH. (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med*. 54(3):132-41.
- Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. (2012) Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. Sep 20;21(14):2724-52.
- Sun XP, Stanley EF. (1996) An ATP-activated, ligand-gated ion channel on a cholinergic presynaptic nerve terminal. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1859–1863.
- Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. (2010) Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A*. Jan;77(1):6-10.
- Tonchev AB. (2011) Brain ischemia, neurogenesis, and neurotrophic receptor expression in primates. *Arch Ital Biol Jun*;149(2):225-31.
- Trujillo CA, Negraes PD, Schwindt TT, Lameu C, Carromeu C, Muotri AR, Pesquero JB, Cerqueira DM, Pillat MM, de Souza HD, Turaça LT, Abreu JG, Ulrich H. (2012) Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. *J Biol Chem*. Dec 28;287(53):44046-61.
- Trujillo CA, Schwindt TT, Martins AH, Alves JM, Mello LE, Ulrich H. (2009) Novel perspectives of neural stem cell differentiation: from neurotransmitters to therapeutics. *Cytometry A*;75(1):38-53.
- Tuerk C, Gold L. (1990) Systematic evolutions of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 249, 505-510.
- Ulrich H, Gameiro AM. (2001) Aptamers as tools to study dysfunction in the neural system. *Curr Med Chem – Central Nervous System Agents*. 1, 125-132.
- Ulrich H, Ippolito JE, Pagan OR, Eterovic VE, Hann RM, Shi H, Lis JT, Eldefrawi ME, Hess GP. (1998) In vitro selection of RNA molecules that displace cocaine from the membrane-bound nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 14051-14056.
- Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJ, Colli W. (2002) In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Biol Chem*. 277, 20756-20762.
- Ulrich H, Martins AH, Pesquero JB. (2004) RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. *Cytometry A*. 59, 220-231.
- Ulrich H, Trujillo CA, Nery AA, Alves JM, Majumder P, Resende RR, Martins AH. (2006) DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications. *Comb Chem High Throughput Screen*. 9(8),619-32.
- Ulrich H, Wrenger C. (2009) Disease-specific biomarker discovery by aptamers. *Cytometry A*. Sep;75(9):727-33.
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. 2010 Feb 25;463(7284):1035-41. doi: 10.1038/nature08797. Epub 2010 Jan 27.
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. Feb 25;463(7284):1035-41. doi: 10.1038/nature08797. Epub 2010 Jan 27.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364–370.
- Yang N, Ng YH, Pang ZP, Südhof TC, Wernig M. (2011) Induced neuronal cells: how to make and define a neuron. *Cell*

Stem Cell. 2011 Dec 2;9(6):517-25.

Yang N, Ng YH, Pang ZP, Südhof TC, Wernig M. Induced neuronal cells: how to make and define a neuron. *Cell Stem Cell*. 2011 Dec 2;9(6):517-25.

Yoshimura T, Arimura N, Kaibuchi K. (2006) Signaling networks in neural polarization. *J Neurosci* 26(42):10626-30.

Zhang H, Wang J, Sun H, Zhang J, Yang S. (2004) The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitor cells and their differentiation. *Chinese Journal Of Traumatology* 7, 3-6.

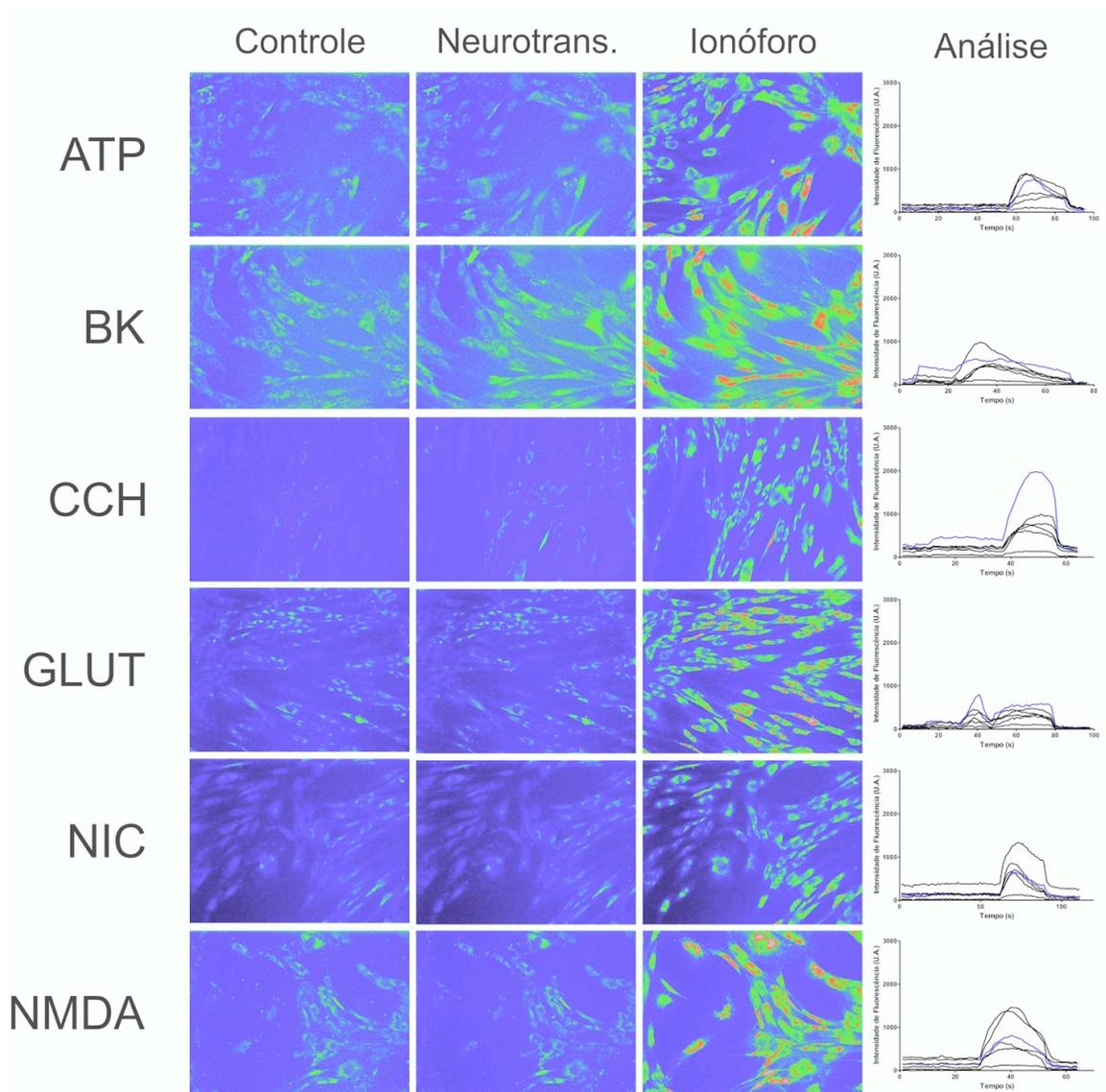
Zhou L, Zhu DY. (2009) Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*. Jun;20(4):223-30.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI, Futrell WJ, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7, 211–226.

Zuk PS, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002) Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 13, 4279–4295.

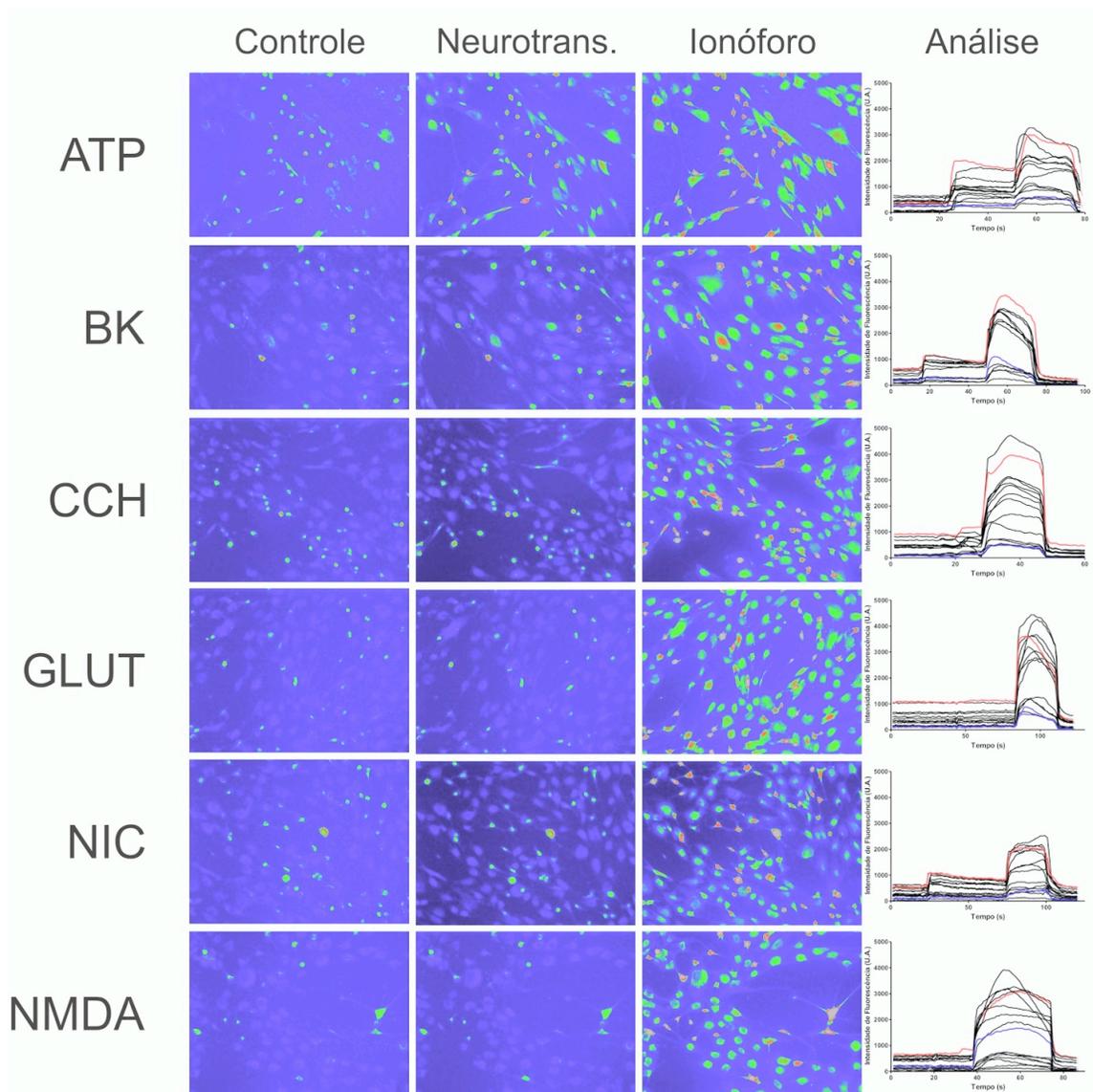
Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 31 (13), 3406-15.

Apêndice I



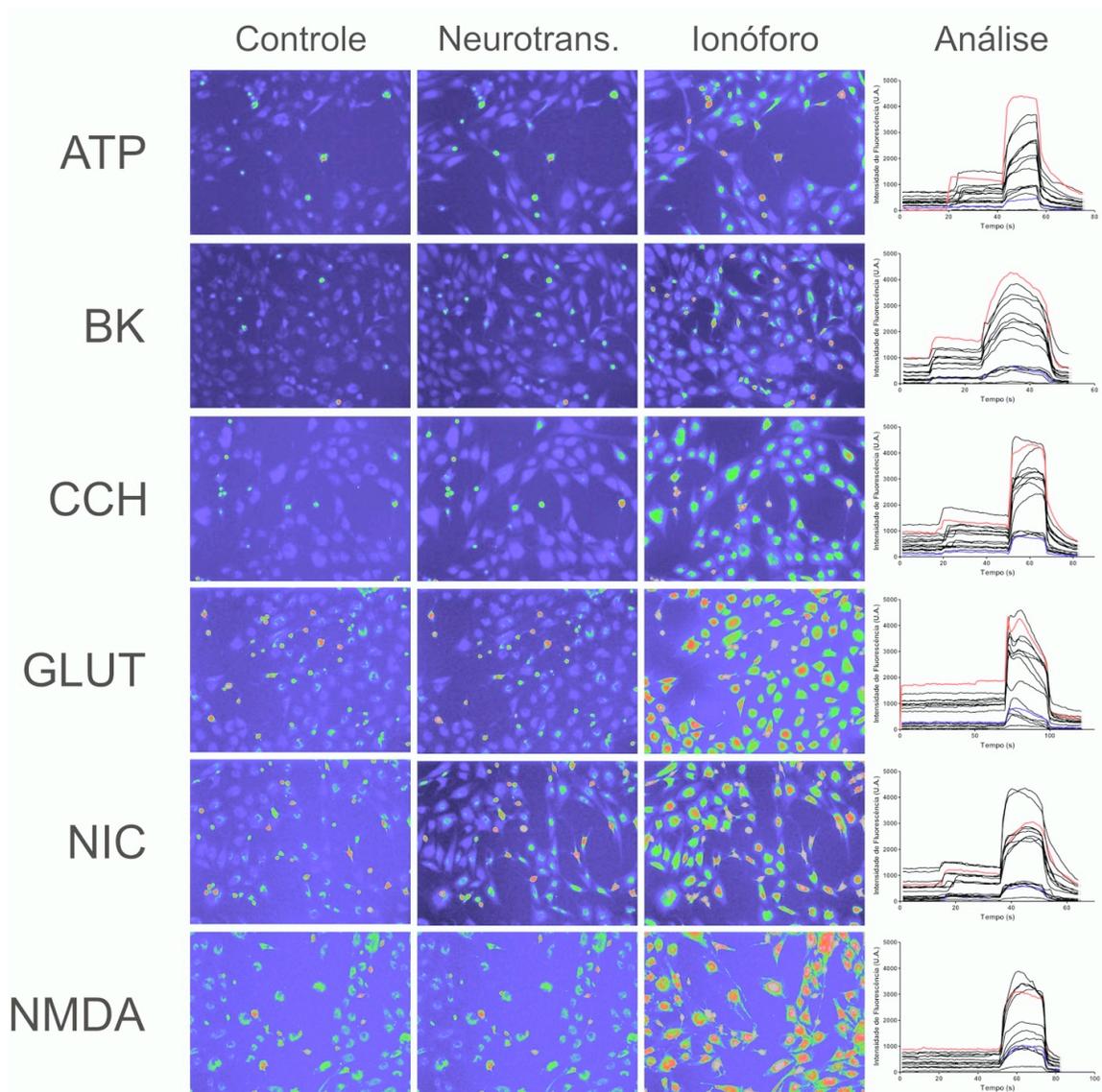
Apêndice 1: Resposta de células PLA humanas não diferenciadas para neurotransmissores. É possível verificar que ocorre resposta de células para BK, e para CCh e ATP poucas células parecem ter resposta respectivamente (embora a quantificação para CCh tenha sido mais efetiva). Nenhuma resposta foi observada para os outros agonistas.

Apêndice II



Apêndice 2: Resposta de células PLA humanas no primeiro dia de diferenciação para neurotransmissores. É possível verificar respostas para ATP, BK e nicotina de maneira homogênea na população, enquanto para CCh a resposta se mostrou pouco reprodutível. Não houve resposta para os outros neurotransmissores.

Apêndice III



Apêndice 3: Resposta de células PLA humanas no segundo dia de diferenciação para neurotransmissores. É possível verificar respostas para ATP, BK e nicotina de maneira homogênea na população, enquanto para CCh a resposta se mostrou maior e mais reprodutível do que no dia 1, porém a resposta para nicotina que ativa os receptores da mesma família se mostrou muito mais efetiva. Não houve resposta para os outros neurotransmissores.

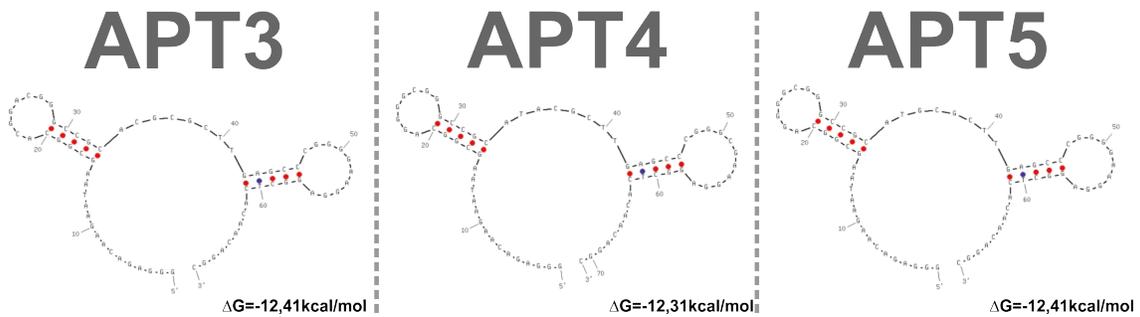
Apêndice IV

P2X1	Foward	TTGTGGAGAACGGGACCAA	BDKRB1	Foward	TCAGCAGGACAAGGTGCGGG
	Reverse	GTCAAAGCGAATCCCAAACAC		Reverse	GGCCACAGCAGACCAGGAAGG
P2RY1	Foward	GGATGCCATGTGTAAACTGC	BDKRB2	Foward	GTGAGGACTCCGTGCCACC
	Reverse	GTACACCACACCGCTGTACC		Reverse	TGCTCTGGGCAAAGGTCCCG
P2RY2	Foward	CACCCGCACCCTCTACTACT			
	Reverse	CCTTGTAGGCCATGTTGATG	CHRM5	Foward	CTGGCCCAGCGGAAAGGAA
P2X3	Foward	GCATCCCCAAATACTCCTTCAC		Reverse	TGGGCCAGTGGCTTGGGATG
	Reverse	GGACACGCTGCTTTTCTCAGA	CHRNA3	Foward	ATCATGGAGACCAACTGTG
P2X5	Foward	CCTTCCTGCCAGCTGTTTG		Reverse	AACTCTGCCCCACCATAGTC
	Reverse	TGCCATCTCCCCACTTTAA	CHRNA6	Foward	TGCTGACCAGCAAGGGGCAG
P2X6	Foward	CCAAACAACACCACCGAGATC		Reverse	AGTTGCACAGCCCCACACAGC
	Reverse	TGGGACCAAGAGGAGAATTCC	CHRNA7	Foward	GGCCTCTCGGTGGTGGTGAC
P2X7	Foward	ACTGCAACCTAGACCGTTGGTT		Reverse	ACCACGCGCACCAGTTCAGA
	Reverse	TCAAGGCGACGGAAACTGTAT	CHRN2	Foward	CTGCTCCTTGGCTTCGGCCT
P2Y4	Foward	CCGTCCCTGTGCCATGACA		Reverse	AGATGCTCCACCAGCCGCTC
	Reverse	GCTGAAGTGACATAGTGGTCAA	CHRN4	Foward	TTCCTGGTCGCCCTTTCGGG
P2Y6	Foward	GCCGGCGACCACATGA		Reverse	GTGGCTGGGCGGATCAGGTT
	Reverse	CCTGCCTCTGCCATTTGG			
P2Y12	Foward	AATGCAAGCCGTCGACAAC	GRIA2	Foward	GCAGCGGGGAGGTGATTCC
	Reverse	CTCTGGTGCACAGACTGGTGTT		Reverse	GCCACCAGCATTGCCAAACCA
P2Y13	Foward	GTGCCACGAGCTCCAACAC	GRIA3	Foward	CAAAGGAGAGTGCGGCAGCG
	Reverse	TGAGGCCATGGAAGAAAACG		Reverse	CCATCATGGCCAGCCCCAGA
P2Y14	Foward	TCTTCATTGCAGGAATCCTACTCA	GRM2	Foward	TGACGCGATGCGGCCAGTTA
	Reverse	AGAGCTGGGCACGTAAAAGAAT		Reverse	TGTCAGCTGGGCGAAAGGGG
M1	Foward	GGCAGCTGGCTTGTGA	GABRB3	Foward	GCAGAACTGCACTCTGGAAA
	Reverse	TTCATGACGGAGGCATTGC		Reverse	ACTCCGGTAACAGCCTTGTC
M2	Foward	TCGAACACACACGCACGAAT			
	Reverse	CCCTGGCGCCTTTAGTACAG	GAPDH	Foward	TTCTTTTGGCTCGCCAGCCG
M3	Foward	CTGTCTATGCCGGGATCAT		Reverse	ACCAGGCGCCCAATACGACC
	Reverse	TGTAACAAGGATGCAAAACAGTGA	TUBB	Foward	TCGTGCACATCCAGGCTGGTC
M4	Foward	GCAGCTCGGGCAATCAGT		Reverse	TAGGTGCCGGTGGGCTCGAT
	Reverse	TCTCATAGCGATTGTGGGATGA			
ASS	Foward	TGGAATGAAGTCCCGAGGTATC			
	Reverse	CTCGATGTCTAAATGAGCATGGTAA			
nNOS	Foward	GCTCCTTAGCCGTCAAAACCT			
	Reverse	GTGTGGAGACGCACGAAGATAG			

Apêndice 4: Tabela de primers utilizados para os experimentos de PCR em tempo real.

Apêndice V

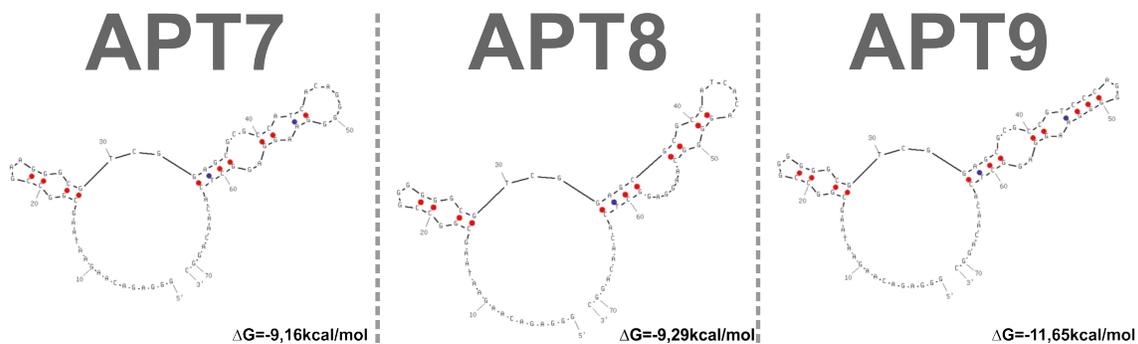
Nome Seq.	Frequência total (BR5/R12)	Índice de Presença	Sequência	Nome Apt.	Classe
Seq 16	57(15BR5/42R12)	0,36	GCACGGACGGGGCCGCACGCGTTGAGCCCGGGGA	APT3	CLASSE I
Seq 20	57(18BR5/39R12)	0,46	GCAGGGGCGGGCCGCATACGCTTGAGCCCGGGGA	APT4	
Seq 19	57(17BR5/40R12)	0,43	GCAGGGGCGGGCCGCATGCGTTGAGCCCGGGGA	APT5	



Apêndice 5: Estruturas e sequências da Classe I de aptâmeros encontrados no sequenciamento das bibliotecas BR5 e R12.

Apêndice VI

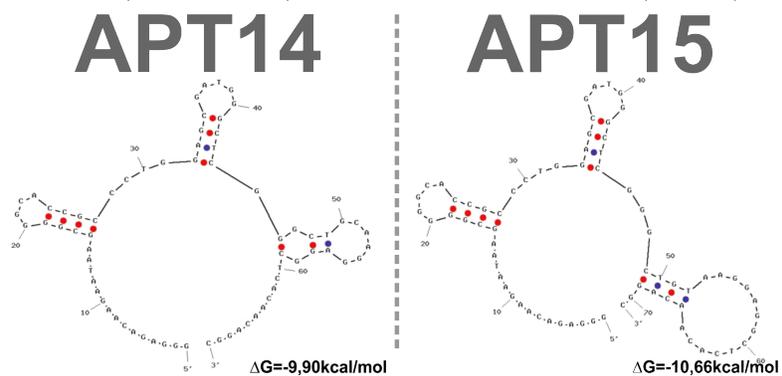
Nome Seq.	Frequência total (BR5/R12)	Índice de Presença	Sequência	Nome Apt.	Classe
Seq 3	43(9BR5/34R12)	0,26	GCCGAAGGGCGTCGGAGCGGCCATCACAGGGGA	APT7	CLASSE II
Seq 1	43(9BR5/34R12)	0,26	GCCGGGGGCGTCGGAGCGGCCATCACAGGGCA	APT8	
Seq 10	43(10BR5/33R12)	0,30	GCCGGGGGCGTCGGAGCGGCCCTCCCAGGGGA	APT9	



Apêndice 6: Estruturas e sequências da Classe II de aptâmeros encontrados no sequenciamento das bibliotecas BR5 e R12.

Apêndice VII

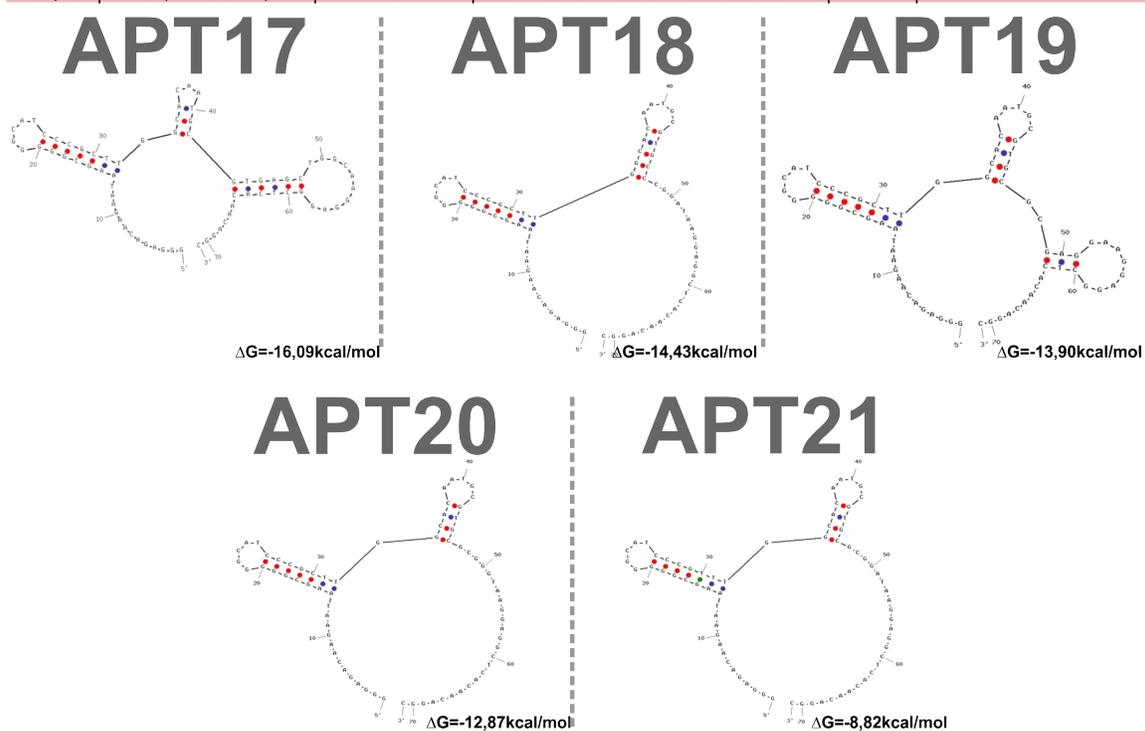
Nome Seq.	Frequência total (BR5/R12)	Índice de Presença	Sequência	Nome Apt.	Classe
Seq 12	118(28BR5/90R12)	0,31	GGGGCACC GCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGTA	APT14	CLASSE III
Seq 13	113(27BR5/86R12)	0,31	GGGCACC GCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGCA	APT15	



Apêndice 7: Estruturas e seqüências da Classe III de aptâmeros encontrados no sequenciamento das bibliotecas BR5 e R12.

Apêndice VIII

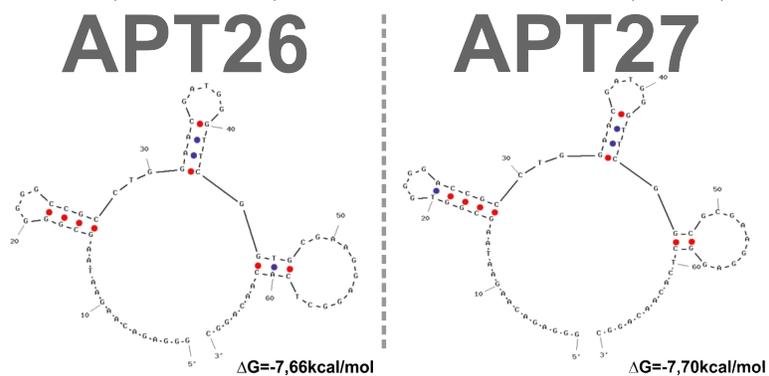
Nome Seq.	Frequência total (BR5/R12)	Índice de Presença	Sequência	Nome Apt.	Classe
Seq 23	65(25BR5/40R12)	0,63	GGGGCATCCCGCTTGGCACAAATGCGTGAGCTGGCA	APT17	CLASSE IV
Seq 26	64(26BR5/38R12)	0,68	GGGGCATCCCGCTTGGCACAAATGCGTGCCCGGATA	APT18	
Seq 21	65(24BR5/41R12)	0,59	GGGGCATCCCGCTTGGCACAAATGCGTGCGCGAGGA	APT19	
Seq 22	65(25BR5/40R12)	0,63	GGGGCATCCCGCTTGGCACAAATGCGTGCGCGGGTA	APT20	
Seq 25	65(26BR5/39R12)	0,67	GGGGCATCCCGTTTGGCACAAATGCGTGCGCGGATA	APT21	



Apêndice 8: Estruturas e sequências da Classe IV de aptâmeros encontrados no sequenciamento das bibliotecas BR5 e R12

Apêndice IX

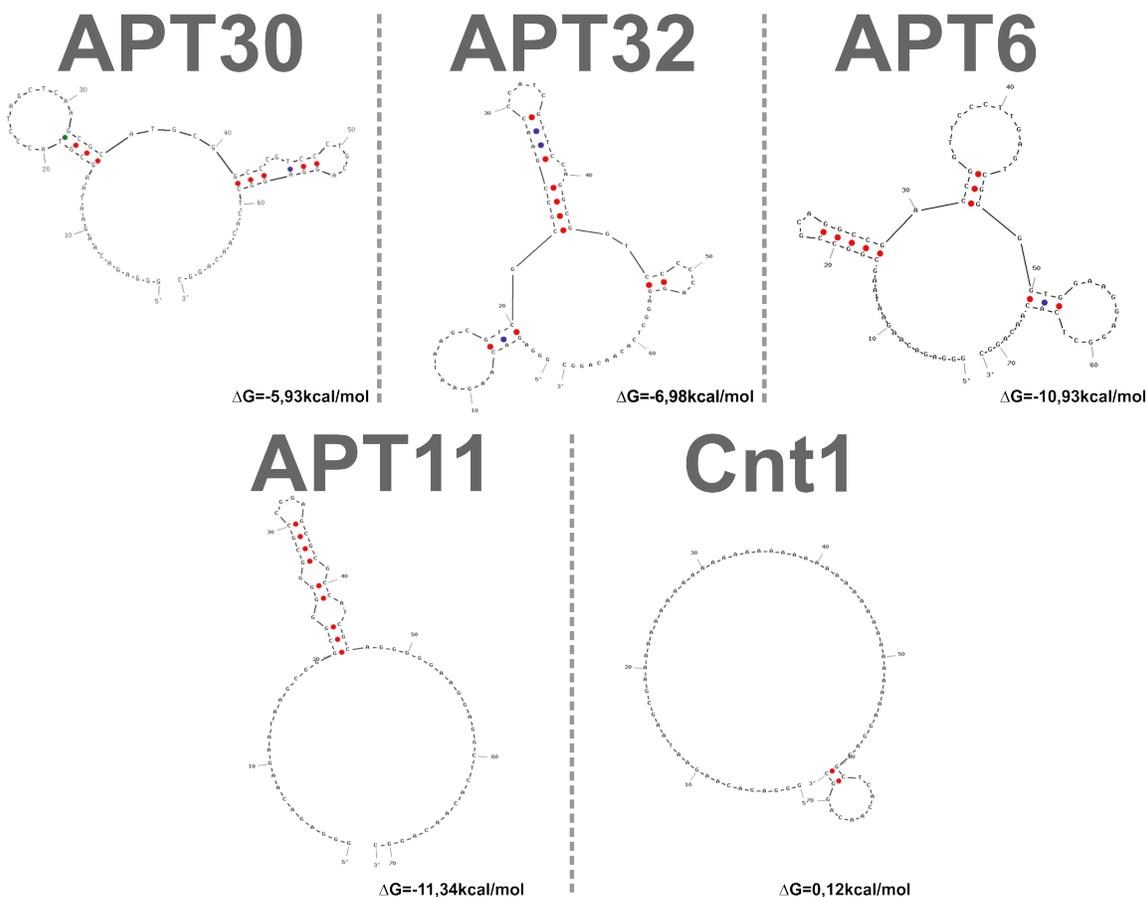
Nome Seq.	Frequência total (BR5/R12)	Índice de Presença	Sequência	Nome Apt.	Classe
Seq 6	117(26BR5/91R12)	0,29	GGGGCCGCCTGGAACGATGGGTCGGTGCGA	APT26	CLASSE V
Seq 8	123(28BR5/95R12)	0,29	GTGGGGACCCCTGGAACGATGGGTCGGGCGCGA	APT27	



Apêndice 9: Estruturas e seqüências da Classe V de aptâmeros encontrados no sequenciamento das bibliotecas BR5 e R12.

Apêndice X

Nome Seq.	Frequência total (BR5/R12)	Índice de Presença	Sequência	Nome Apt.	Classe
Seq 27	15(8BR5/7R12)	1,14	TACCCCTAGCTCAAGCGCATGCGGCCCGTCCCTGC	APT30	ÍNDICE
Seq 28	32(20BR5/12R12)	1,67	TCGCGCCGAACCCATCGTTCCAGGCCGTCCCCC	APT32	ÍNDICE
Seq 32	49(48BR5/1R12)	48,00	GCCGCAGGCCGACCCGGTCCCTTGAGTCGGGGTGA	APT6	BR5
Seq 4	43(9BR5/34R12)	0,26	GGCGGGGGCGCCGGAGCGGCCATCGCAGGGGGA	APT11	R12
Cnt	n/a	n/a	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	Cnt1	Control



Apêndice 10: Estruturas e sequências de aptâmeros encontrados no sequenciamento das bibliotecas BR5 e R12 e que foram considerados para síntese para testes, incluindo uma sequência controle com a região randômica composta por uma sequência Poli-A.

SÚMULA CURRICULAR – ARTHUR ANDRADE NERY

Personal Data

Date of Birth: October/27/1982 – São Paulo-SP

Address: Av. Eng. Heitor Antônio Eiras Garcia 240, apto.: 72B – ZIP: 05588-000 São Paulo – SP – Brazil

Telephone: +55 11 3455-8160 **Mobile:** +55 11 99107-2050 **E-mail:** arthur.nery@gmail.com

Technical Experience

- Leading and developing R&D teams;
- Management of project budgets in scientific and biotech areas;
- Training and support of technical staff teams for laboratory affairs;
- Expertise developed during Ph.D.: SELEX technique, obtainment and *in vitro* culture of stem cells, neuronal differentiation, genomic analysis based on RT-PCR, expression and protein activity analysis by Western blot and immunochemistry, patch-clamp technique, ion-channels and metabotropic functional assays by calcium imaging assays using confocal microscopy, toxicological studies with toxins derived from snakes, marine animals and plants.

Academic Information

- Laboratory of Neuroscience, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Universidade de São Paulo;
- Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo (USP);
- Grad School - Universidade de São Paulo (USP) - Instituto de Biociências Course: Graduate in Biological Science From: Mar/2001 to Dec/2005 Address: Rua do Matão, Travessa 14, 321 - Butantã - São Paulo – SP

Foreign Languages

- **Portuguese** – Native
- **English** – Fluent in listening, speaking, reading and writing.
- **Spanish** – Advanced Skills in listening, speaking, reading and writing.

Professional Data

- **Laboratory of Neurosciences** - Department of Biochemistry –Institute of Chemistry –IQ – USP and **Laboratory of Cardiology and Molecular Genetics**–Hospital das Clínicas–USP. Development of the Ph.D thesis.
- **Laboratory of Neurosciences** - Department of Biochemistry –Institute of Chemistry –IQ – USP. Development of the undergrad project: “Detection and quantification of nicotinic acetylcholine receptor subunits during PC12 neuronal differentiation”. PIBIC fellowship under orientation of Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich – Jan/2003 to Dec/2005.
- **“Joint Venture” with Biotech investors (Tainá Project)** – Development of aptamers to cell surface recognition – Jan/2006 to Dec/2006.
- **Applied Center for Toxicology (CAT)** – Butantan Institute – CEPID/FAPESP. Development of: “A novel physiological property of the snake bradykinin-potentiating peptide 10c on the nicotinic acetylcholine receptors, demonstrating sequence specific protection against MK-801.” – Feb/2004 to Dec/2007.
- **Camelott consultancy and development in biotechnology** – Founder and owner.
- **Interscientific** – Consultancy and development of the R&D department of the company which is one of the
- Luminex Corp. official retailers in Brazil (<http://www.intercientifica.com.br/br/>).
- **Novartis Biociências** – MSL – Medical Science Liaison – Mar2012 - Actual

International Experiences

- **Cornell University** – Department of Molecular Biology and Genetics, at Prof. Dr. George P. Hess (<http://mbg.cornell.edu/faculty-staff/faculty/hess.cfm>) laboratory, having as main goal the characterization of aptamers against the beta-amyloid peptide, the main cause of Alzheimer’s disease, against nicotinic acetylcholine receptors, from June to August, 2008.
- **Seminar at the Natural Museum of Natural History, France** – “Novel roles of highly specific natural

inhibitors of the angiotensin converting enzyme” through 16èmes Rencontre en Toxinologie (RT16) – “Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales” carried on “l’Auditorium de La Grande Galerie de l’Évolution Du Muséum National d’Histoire Naturelle”, Paris, November 20 and 21, 2008.

- **International BioCamp 2011** – Novartis Biotechnology Leadership Camp – held from August 29 to August 31, 2011 in Basel, Switzerland.

Awards

- **International BioCamp 2011** – as being part of the winning team and for outstanding achievement during the Novartis Biotechnology Leadership Camp (BioCamp) – held from August 29 to August 31, 2011 in Basel, Switzerland.
- **International BioCamp 2011** – as a winner of, and for outstanding achievement during, the Novartis Biotechnology Leadership Camp (BioCamp) – held from August 29 to August 31, 2011 in Basel, Switzerland.
- **Finalist for Roberto Alcântara Gomes Award 2009** - (Nunes-Alves, A., Nery, AA, Ulrich, H.), XXIV Annual Meeting of the Experimental Biology Societies Federation (FESBE);
- **XXIV Annual meeting of the Experimental Biology Societies Federeration (FESBE) 2009** – “A Novel Physiological Property of Snake Bradykinin-potentiating peptides-reversion of MK-801 inhibition of Nicotinic acetylcholine receptors” – August 19 to 22, 2009;
- **Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) 2006** – at the XXXV Annual Meeting “Detection of alpha7 receptor expression and activity during differentiation of PC12 cells to neurons” – from July 1st to 4th, 2006;
- **13th International Symposium of Scientific Initiation from São Paulo Univesity (SIICUSP) 2005** - “Detection of alpha7 receptor expression and activity during differentiation of PC12 cells to neurons” – 13o SIICUSP 2005;
- **XX Annual meeting of the Experimental Biology Societies Federeration (FESBE) 2005** – “Detection and functionallity of nicotinic acetylcholine receptors during neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells” – August, 24 to 27, 2005;
- **Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) 2005** – at the XXXV Annual Meeting “Detection and functionallity of nicotinic acetylcholine receptors during neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells” – July, 2 to 5, 2005.

Publications

1. Rescue of amyloid-Beta-induced inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by a peptide homologous to the nicotine binding domain of the alpha 7 subtype. **Nery AA**, Magdesian MH, Trujillo CA, Sathler LB, Juliano MA, Juliano L, Ulrich H, Ferreira ST. **PLoS One**. 2013 Jul 22;8(7):e67194. doi: 10.1371/journal.pone.0067194. Print 2013. PMID: 23894286
2. α -RgIB: A Novel Antagonist Peptide of Neuronal Acetylcholine Receptor Isolated from Conus regius Venom. Braga MC, **Nery AA**, Ulrich H, Konno K, Sciani JM, Pimenta DC. **Int J Pept**. 2013;2013:543028. doi: 10.1155/2013/543028. PMID: 23533449
3. The monoterpene (-)-carvone: a novel agonist of TRPV1 channels. Gonçalves JC, Silveira AL, de Souza HD, **Nery AA**, Prado VF, Prado MA, Ulrich H, Araújo DA. **Cytometry A**. 2013 Feb;83(2):212-9. doi: 10.1002/cyto.a.22236. PMID: 23307583
4. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. **Nery AA**, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. **Cytometry A**. 2013 Jan;83(1):48-61. doi: 10.1002/cyto.a.22205. PMID: 23027703
5. Tobacco nitrosamine N-nitrosornicotine as inhibitor of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Nunes-Alves A, **Nery AA**, Ulrich H. **J Mol Neurosci**. 2013 Jan;49(1):52-61. doi: 10.1007/s12031-012- 9859-5. PMID: 22847530
6. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in Plasmodium falciparum cell cycle following treatment with indol compounds. Schuck DC, Ribeiro RY, **Nery AA**, Ulrich H, Garcia CR. **Cytometry A**. 2011 Nov;79(11):959-64. doi: 10.1002/cyto.a.21136. PMID: 22015733
7. Neural differentiation of rat aorta pericyte cells. Montiel-Eulefi E, **Nery AA**, Rodrigues LC, Sánchez R, Romero F, Ulrich H. **Cytometry A**. 2012 Jan;81(1):65-71. doi: 10.1002/cyto.a.21152. PMID: 21990144
8. Neuronal differentiation involves a shift from glucose oxidation to fermentation. Fornazari M, Nascimento IC, **Nery AA**, da Silva CC, Kowaltowski AJ, Ulrich H. **J Bioenerg Biomembr**. 2011 Oct;43(5):531-9. doi: 10.1007/s10863-011-9374-3.

9. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor expression and activity during neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. **Nery AA**, Resende RR, Martins AH, Trujillo CA, Eterovic VA, Ulrich H. **J Mol Neurosci**. 2010 Jul;41(3):329-39. doi: 10.1007/s12031-010-9369-2. PMID: 20461497
10. Recognition of biomarkers and cell-specific molecular signatures: aptamers as capture agents. **Nery AA**, Wrenger C, Ulrich H. **J Sep Sci**. 2009 May;32(10):1523-30. doi: 10.1002/jssc.200800695. PMID: 19472283
11. A novel physiological property of snake bradykinin-potentiating peptides-reversion of MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. **Nery AA**, Trujillo CA, Lameu C, Konno K, Oliveira V, Camargo AC, Ulrich H, Hayashi MA. **Peptides**. 2008 Oct;29(10):1708-15. doi: 10.1016/j.peptides.2008.06.002. PMID: 18598727
12. Development of the anti-VEGF aptamer to a therapeutic agent for clinical ophthalmology. Trujillo CA, **Nery AA**, Alves JM, Martins AH, Ulrich H. **Clin Ophthalmol**. 2007 Dec;1(4):393-402. PMID: 19668516
13. Mode of cembranoid action on embryonic muscle acetylcholine receptor. Ulrich H, Akk G, **Nery AA**, Trujillo CA, Rodriguez AD, Eterović VA. **J Neurosci Res**. 2008 Jan;86(1):93-107. PMID: 17868151
14. DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications. Ulrich H, Trujillo CA, **Nery AA**, Alves JM, Majumder P, Resende RR, Martins AH. **Comb Chem High Throughput Screen**. 2006 Sep;9(8):619-32. PMID: 17017882
15. Inhibition mechanism of the recombinant rat P2X(2) receptor in glial cells by suramin and TNP-ATP. Trujillo CA, **Nery AA**, Martins AH, Majumder P, Gonzalez FA, Ulrich H. **Biochemistry**. 2006 Jan10;45(1):224-33. PMID: 16388598
16. Peptide blockers of the inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by amyloid beta. Magdesian MH, **Nery AA**, Martins AH, Juliano MA, Juliano L, Ulrich H, Ferreira ST. **J Biol Chem**. 2005 Sep 2;280(35):31085-90. PMID: 15987688

Book Chapters

1. *Novel roles of highly specific natural inhibitors of the angiotensin-converting enzyme*. Mirian A.F. HAYASHI, Arthur Andrade **NERY**, Antonio C.M. CAMARGO, Henning ULRICH. In: **Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales**. Editores: Evelyne BENOIT, Françoise GOUDEY-PERRIERE, Pascale MARCHOT et Denis SERVENT *Société Française pour l'Etude des Toxines (e-book: <http://sfet.asso.fr/e-book-rt-16/e-book-rt16.html>)*;
2. Yuahasi K. K. ; GOMES, K. N. ; Campos M ; **NERY, A. A.** ; Nunes-Alves A ; TRUJILLO, C. A. ; ULRICH, H. . Neurotransmitters as Main Players in the Neural Differentiation and Fate Determination Game. In: Henning Ulrich. (Org.). **Perspectives of Stem Cells - From tools for studying mechanisms of neuronal differentiation towards therapy**. Dordrecht Heidelberg London Ne: Springer Science + Business Media, 2010, v. p. 115-134;
3. **NERY, A. A.** ; Trujillo, Cleber A. ; Lameu C ; KONNO, K. ; CAMARGO, A. C. M. ; ULRICH, H. ; HAYASHI, M. A. F. . Poster abstracts: Nicotinic acetylcholine receptors modulation by a snake venom. In: XIII. **International Symposium on cholinergic mechanisms**, 2010, Foz de Iguaçu. Journal of Molecular Neuroscience. Heidelberg, Amsterdam, New Yor : Springer, 2010. v. 40. p. 252-254.

Intellectual Property

1. National Institute of Intellectual Property, deposit no. BR 10 2013 021701-8 “POLINUCLEOTÍDEOS QUÍMICAMENTE MODIFICADOS E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLINUCLEOTÍDEOS QUÍMICAMENTE MODIFICADOS”

Organized Courses

- **III Summer course in Biochemistry and Molecular Biology** – carried through *Department of Biochemistry – Institute of Chemistry –IQ – USP*, managed by Prof. Dr. Bayardo B. Torres, from January 7 to 18, 2008.
- **1st Winter Course “Advanced topics in Biochemistry and Molecular Biology”** – carried through *Department of Biochemistry –Institute of Chemistry –IQ – USP*, managed by Profª. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros, from July 10 to 21, 2006.

Meetings Participations and Posters

1. **NERY, A.A.**; Ulrich, H. CHARACTERIZATION OF NATURAL ENDOOLIGOPEPTIDASE A COMPLEXES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. In: XXXIII Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Aguas de Lindoia, SP, Brasil. 2003;
2. **NERY, A.A.**; Martins, A.H.B.; Resende, R.R.; Majumder, P.; Trujillo, C.A.; Ulrich, H. Expressão e funcionalidade de receptores nicotínicos neurais de acetilcolina durante o processo de diferenciação de células PC12 In: 12oSIICUSP, Ribeirão Preto, SP, Brasil. 2004;

3. **NERY, A.A.**; Martins, A.H.B.; Resende, R.R.; Ulrich, H. Detecção e funcionalidade dos receptores nicotínicos de acetilcolina durante a diferenciação neuronal de células de feocromocitoma PC12 In: 13o. SIICUSP, Ribeirão Preto, SP, Brasil. 2005;
4. **NERY, A.A.**; Martins, A.H.B.; Resende, R.R.; Trujillo, C.A.; Ulrich, H. Detection and functionality of nicotinic acetylcholine receptor subunits during PC12 neuronal differentiation In: 2nd International Meeting of the Latin American Society of Developmental Biology, Guarujá, SP, Brasil. 2005;
5. **NERY, A.A.**; Martins, A.H.B.; Resende, R.R.; Trujillo, C.A.; Ulrich, H. Detection and functionality of nicotinic acetylcholine receptors during neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells In: XXXIV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Aguas de Lindoia, SP, Brasil. 2005;
6. **NERY, A.A.**; Martins, A.H.B.; Trujillo, C.A.; Ulrich, H. Detection and functionality of nicotinic acetylcholine receptors during neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells In: FESBE, Águas de Lindoia, SP, Brasil. 2005;
7. Resende, R.R.; Martins, A.H.B.; **NERY, A.A.**; Ulrich, H. Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors subunits are expressed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells In: XXXIV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Aguas de Lindoia, SP, Brasil. 2005;
8. Magdesian, M.H.; **NERY, A.A.**; Martins, A.H.B.; Juliano, M.A.; Juliano, L.; Ulrich, H.; Ferreira, S.T. Peptides Blockers of the inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by beta-amyloid peptide In: XXXIV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Aguas de Lindoia, SP, Brasil. 2005;
9. Trujillo, C.A.; Majumder, P.; **NERY, A.A.**; Ulrich, H. Pharmacological properties of suramin in glial cells expressing the recombinant rat P2X2 receptor In: XXXIV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Aguas de Lindoia, SP, Brasil. 2005;
10. **NERY, A.A.**; Trujillo, C.A.; Gomes, C.L.; Martins, A.H.B.; Konno, K.; Camargo, A.C.M.; Ulrich, H.; Hayashi, M.A.F. A Novel Physiological Property of the Snake Bradykinin-Potentiating Peptides as Allosteric Protectors of Nicotinic Acetylcholine Receptor Activity In: XXXV Reuniao Anual da Sociedade de Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindoia, SP, Brasil. 2006;
11. **NERY, A.A.**; Resende, R.R.; Trujillo, C.A.; Martins, A.H.B.; Ulrich, H. Detection of alpha 7 receptor expression and activity during differentiation of PC12 cells to neurons In: XXXV Reuniao Anual da Sociedade de Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindoia, SP, Brasil. 2006;
12. **NERY, A.A.**; Szeto, A.C.; Eterovic, V.A.; Ulrich, H. Effects of Tobacco Cembranoid 4S, 6R-Cembratrienediol on Nicotinic Acetylcholine Receptors in PC12 Cells In: XXXV Reuniao Anual da Sociedade de Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindoia, SP, Brasil. 2006;
13. **NERY, A.A.**; Resende R.R.; Martins, A.H.B.; Trujillo, C.A.; Ulrich, H. Detecção e Funcionalidade dos receptores nicotínicos de acetilcolina durante a difereciação neuronal de células de feocromocitoma. In: 13a Jornada Nacional de Iniciação Científica, 58a Reuniao anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. 2006;
14. **NERY, A.A.**; Resende, R.R.; Martins A.H.B.; Trujillo, C.A.; Ulrich, H. Detection of alpha 7 receptor expression and activity during differentiation of PC12 cells to neurons. In: 16th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Banff, Alberta, Canada. 2006;
15. **NERY, A.A.**; Lameu, C.; Trujillo, C.A.; Konno, K.; Camargo, A.C.M.; Ulrich, H.; Hayashi, M.A. Nicotinic acetylcholine receptor modulation by a snake toxin. In: XIII International Symposium on Cholinergic Mechanisms. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. 2008;
16. **NERY, A.A.**; Trujillo, C.A.; Konno, K.; Camargo, A.C.M.; Ulrich, H.; Hayashi, M.A.F. A novel physiological property of the snake bradykinin- potentiating peptides on nicotinic acetylcholine receptors through binding to the allosteric site. In: IX. São Paulo Research Conference: Drogas: uma abordagem interdisciplinar, 2008, São Paulo. X. São Paulo Research Conference: Drogas: uma abordagem interdisciplinar: Resumos aprovados. São Paulo : Eventus - Planejamento e Organização, 2008. p. 01.004;
17. **NERY, A.A.**, Trujillo C.A., Gomes C.L., Konno K., Camargo A.C.M., Ulrich H., Hayashi M.A.F. A Novel Physiological Property of Snake Bradykinin-potentiating peptides-reversion of MK-801 inhibition of Nicotinic acetylcholine receptors. Águas de Lindoia, São Paulo, São Paulo, Brasil. 2009;
18. Nunes-Alves A; **NERY, A.A.**; Ulrich, H. Tobacco nitrosamine N-nitrosornicotine as inhibitor of nictonic acetylcholine receptors. In: XXIV Reuniao Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindoia. Programa XXIV Reuniao Anual da FESBE. São Paulo : Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009. p. 58-58;
19. Nunes-Alves, A.; **NERY, A.A.**; Ulrich, H. Pharmacological Activity of the Tobacco Nitrosamine N-nitrosornicotine on Nicotinic Acetylcholine Receptors. In: XXXVIII Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2009, Águas de Lindoia. XXXVIII Annual Meeting of SBBq Program. São Paulo : SBBq, 2009. p. 102-102;
20. **NERY, A.A.**; Rodrigues, L.C.; Bassaneze, V.; Krieger, J.E.; Ulrich, H. Differentiation of human adipose mesenchymal stem cells into neuronal phenotypes. In: 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010, San Diego. 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience: Final Program, 2010;
21. Nascimento, I.C.; Fornazari, M.; **NERY, A.A.**; Ulrich, H. Expression of components of the kallikrein-kinin system during neural differentiation of mouse embryonic stem cells. In: 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010, San Diego. 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience: Final Program. v. 131.6;
22. **NERY, A.A.**; Rodrigues, L.C.; Bassaneze, V.; Krieger, J.E.; Ulrich, H. Trans - Differentiation of human adipose stem cells into neuron-like cells expressing functional neurotransmitter receptors. In: V Congresso Brasileiro de Células Troncos e terapia celular, 2010, Gramado - RS. V Congresso Brasileiro de Células Troncos e terapia celular. Gramado - RS : Terapia Celular, 2010;
23. Fornazari, M.; Nascimento, I.C.; **NERY, A.A.**; Caldeira, C.C.; Kowaltowski, A.J.; Ulrich, H. Changes from aerobic to anaerobic glucose metabolism during neuronal differentiation. In: V Congresso Brasileiro de Células Troncos e terapia celular, 2010, Gramado - RS. V Congresso Brasileiro de Células Troncos e terapia celular. Gramado - RS : Terapia Celular, 2010;
24. Ulrich, H.; Nunes-Alves A.; **NERY, A.A.** Tobacco nitrosamine N-nitrosornicotine as inhibitor of rat acetylcholine receptor. In: 12th Annual Meeting of the SRNT Europe: Translational Science to Policy, 2010, Bath (UK). 12th Annual Meeting of the SRNT Europe: Translational Science to Policy: Programme. Bath (UK): Society for Research on Nicotine and Tobacco; UK Centre for Tobacco Control Studies, 2010. p. 95-95;
25. Fornazari, M.; Nascimento, I.C.; **NERY, A.A.**; Kowaltowski, A.J.; Ulrich, H. Changes from aerobic to anaerobic glucose metabolism during differentiation of embryonic cells into neurons. In: XV. Reuniao Sociedade Brasileira de Biologia Celular SBBC, 2010, Sao Paulo. Programs & Abstracts SBBC: Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010;
26. Nunes-Alves A; **NERY, A.A.**; HESS, G.P.; ULRICH, H. Tobacco nitrosamine N-nitrosornicotine as inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor subtype a3,b4. In: XXV Reuniao Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), 2010, Aguas de Lindoia. Livro do Programa: XXV Reuniao Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE). São Paulo : FESBE, 2010;

27. **NERY**, A.A.; Rodrigues, L.C.; Bassaneze V.; Krieger JE ; Ulrich, H. Trans-differentiation of human adipose stem cells into neurons expressing functional neurotransmitter receptors. In: XV. Reunião Sociedade Brasileira de Biologia Celular SBBC, 2010, São Paulo. Livro do Programa, 2010;
28. Schuck, D.C.; **NERY**, A.A.; Ulrich, H.; Garcia CR. Effect of the Indol Compounds N-acetyl Serotonin (NAS) , Tryptamine, Aerotonin and Melatonin in the Human Malaria Parasites *P. falciparum*. In: XL Annual Meeting of SBBQ, 2011, Foz do Iguaçu. XL Annual Meeting of SBBQ. Foz do Iguaçu : SBBq, 2011;
29. de Souza, H.D.N.; Campos, M.; **NERY**, A.A.; Demasi, M.A.A.; Negraes, P.D.; Sogayar, M.C.; Ulrich, H. Characterization of Allosteric Effects in Murine Heteromeric P2X4/6 Receptors and its Splicing Variants. In: XL Annual Meeting of SBBQ, 2011, in Foz do Iguaçu. XL Annual Meeting of SBBQ. Foz do Iguaçu : SBBq, 2011.
30. **A. A. NERY**, V. BASSANEZE, C. LAMEU, L. CHELIZ, J. E. KRIEGER, H. ULRICH. Differentiation into neuronal phenotypes of human adipose mesenchymal stem cells. 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2011, Washington, DC. 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience: Final Program. 228.12/A33.