



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR

JESSICA BATISTA DE JESUS

Ação da Ciclosporina A na via de ativação do Fator de Crescimento de Nervo (NGF) em células neurais do SNP

BELÉM
2016

JESSICA BATISTA DE JESUS

Ação da Ciclosporina A na via de ativação do Fator de Crescimento de Nervo (NGF) em células neurais do SNP

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará (UFPA)
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Neurociências
e Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Co-Orientador: Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena

BELÉM

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Jesus, Jessica Batista de, 1989.

Ação da ciclosporina A na via de ativação do Fator de Crescimento de Nervo (NGF) em células neurais do SNP / Jessica Batista de Jesus. - 2016.

Orientador: José Luiz Martins do Nascimento;

Coorientador: Chubert Bernardo Castro de Sena.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Nervos periféricos. 2. Ciclosporina A. 3. Fatores de crescimento de nervos. I. Título.

CDD 22. ed. 573.85

JESSICA BATISTA DE JESUS

Ação da Ciclosporina A na via de ativação do Fator de Crescimento de Nervo (NGF) em células neurais do SNP

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Belém (PA), 29 de Agosto de 2016.

Presidente:

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento ICB – UFPA.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Elena Crespo López - ICB – UFPA.

Prof^a. Dr^a. Barbarella de Matos Macchi - ICB – UFPA.

Suplente:

Prof^a. Dr^a. Edilene Oliveira da Silva - ICB – UFPA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me guiado até aqui.

Aos familiares por todo apoio, principalmente minha mãe, que sempre foi meu esteio. Nos momentos difíceis agradeço por ter segurado minha mão e ter enxugado minhas lágrimas. Mereces, certamente, um lugar no céu.

Aos meus orientadores por terem me ensinado não apenas como fazer ciência, mas também me trouxeram aprendizado de vida, para a vida toda. Agradeço imensamente ao professor José Luiz Martins e ao professor Chubert Sena pela oportunidade, paciência, dedicação e sobretudo, pela confiança.

À professora e amiga Barbarella Macchi, por desde que entrei no laboratório, ter me auxiliado em tudo. Desde como embalar material para autoclave até em discussões científicas. Sou muito grata por todo o apoio, brincadeiras, conversas, cafés e tudo mais que fizemos juntas. Até por todos os puxões de orelha (risos).

Ao professor Dr. Ricardo de Melo Reis, por ter aberto as portas do seu laboratório e ter me ajudado sem hesitar. À ele e aos colegas do laboratório de Neuroquímica (Biofísica - UFRJ) meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do laboratório de Neuroquímica Celular e Molecular, Laboratório de Biologia estrutural e Laboratório de Protozoologia, que sempre me ajudaram, e aos que eu tive oportunidade de ajudar também, me atribuindo, portanto, constante aprendizado. Sinto-me parte de uma enorme família, que sempre se ajuda e torce pelo outro. Impossível seria citar todos os nomes aqui, pois necessitaria mais que uma página, no entanto expresso minha eterna e sincera gratidão.

Ao meu parceiro e super herói de qualquer hora, Iago Ramos eu não tenho como agradecer do jeito que ele merece. Sempre pronto a ajudar, fazendo parte da minha vida e presenciando meus “chororôs” quando os experimentos não davam certo, sempre com uma palavra de conforto pronta a

ser dita. Por todo apoio, confiança, parceria, carinho. Agradeço de coração. Meu amor por ti é imensurável.

Aos meus amigos de faculdade Amanda Mota, Angélica Menezes e Rafael Blois pela amizade sincera e apoio. Aos amigos Fábio Oliveira, Jade Rodrigues, Suzane Fonseca, Gabriela Arrifano, Ricardo Paraense, Bruno Martins, Heleniana Miranda, Ailin Castelo Branco e Daniele Santos por terem colaborado com a elaboração deste trabalho com dicas, conversas científicas ou mesmo pela torcida. Eu agradeço meus amigos.

Agradeço à tudo e todos que fizeram parte da construção do meu caráter e formação. Reconheço a importância e a necessidade de todas as dificuldades, pois sem elas eu não chegaria até aqui do jeito que cheguei.

“Tenha paciência. Tudo aquilo que você deseja, se for verdadeiro, e o mais importante: se for para ser seu, acontecerá.”

William Shakespeare

Sumário

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. NGF E OUTRAS NEUROTROFINAS	4
1.2. CICLOSPORINA A (CsA).....	6
1.3. CALCINEURINA (CaN) E FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS (NFATc)	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. OBJETIVO GERAL	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. ANIMAIS	11
3.2. PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE CULTURA.....	11
3.3. PREPARAÇÃO DA CICLOSPORINA A.....	12
3.4. MEIO CONDICIONADO OBTIDO POR CULTURA DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA.....	12
3.5. CULTURA E OBTENÇÃO DE NEURÔNIOS PERIFÉRICOS	14
3.6. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT	17
3.7. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA NGF E TrkA EM CÉLULAS NEURAIS.....	17
3.8. EXTRAÇÃO DE mRNA E TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR).....	19
3.9. IMAGEAMENTO DE CÁLCIO EM CÉLULAS DO SNP.....	20
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
4. RESULTADOS	23

4.1. AÇÃO DA CICLOSPORINA A NA NEURITOGÊNESE DE GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL.....	23
4.2. ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR POR COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DETERMINADO POR IMAGEAMENTO DE CÁLCIO	25
4.3. VIABILIDADE DE CÉLULAS NEURAIS E DA GLIA DE SCHWANN APÓS TRATAMENTO COM A CICLOSPORINA A	33
4.4. AÇÃO DA CICLOSPORINA A NA FORMAÇÃO DA CIRCUITARIA NEURAL EM CULTURAS ENRIQUECIDAS DE NEURÔNIOS.....	35
4.5. EXPRESSÃO DE NGF, TrkA e NFAT5 INDUZIDO POR CICLOSPORINA A	38
4.6. AVALIAÇÃO DE TrkA EM NEURÔNIOS	41
4.7. CICLOSPORINA A MODULA A EXPRESSÃO DE NGF EM CULTURAS MISTAS	43
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

A Ciclosporina A é um imunossupressor químico com ação conhecida sobre células T do sistema imune. No sistema nervoso, a Ciclosporina A age inibindo a ação da Calcineurina, um importante segundo mensageiro da via de transdução de sinal do Fator de Crescimento de Nervo (NGF) resultando na hiperfosforilação do Fator Nuclear de Células T Ativadas (NFAT) e regulação negativa de NGF, TrkA e outros fatores que participam da via. As isoformas da família de NFAT1-4 são dependentes de calcineurina, enquanto a isoforma NFAT5 é independente. Já foi demonstrado o papel neuroprotetor da Ciclosporina A por via dependente ou independente de calcineurina. No presente trabalho, procuramos avaliar a ação da Ciclosporina A no sistema nervoso periférico, associando níveis de NGF, TrkA e o fator de transcrição independente de calcineurina, NFAT5 com a plasticidade de células neuronais oriundas de Gânglios da Raiz Dorsal (GRD) mantidas em culturas. Usamos culturas de GRD E10, suplementado com Meio Condicionado de Retina de E9, tratados com Ciclosporina A por 48 e 72 horas. Culturas enriquecidas de Neurônios foram confirmadas pelo método de imageamento de cálcio. A ação da Ciclosporina A sob a neuritogênese foi avaliada por microscopia de campo claro, a expressão de NGF, TrkA e NFAT5 foi realizada por RT-PCR e o acúmulo de NGF intracelular foi avaliado por Imunofluorescência, assim como a presença de TrkA em neurônios. O teste de viabilidade das culturas tratadas ou não com as concentrações de 1-40 μ M de Ciclosporina A foi realizado pelo método de MTT. Os resultados mostram aumento dos níveis de NGF em culturas mistas, e de receptor TrkA e NFAT5 em culturas enriquecidas em neurônios após o tratamento com a Ciclosporina A. Dada a importância da via de NGF no desenvolvimento e manutenção do SNP, o uso da Ciclosporina A, pode vir a ser usado na clínica como novo alvo para novas terapias.

Palavras Chaves: Ciclosporina A, NGF, TRKA, NFAT5, Gânglio da raiz dorsal.

ABSTRACT

Cyclosporine A is an **immunosuppressive** drug with known action on T cells of the immune system used in organ transplantation and autoimmune diseases. In the nervous system, cyclosporin A acts by inhibiting the action of Calcineurin, an important second messenger from pathway of signal transduction Nerve Growth Factor (NGF), resulting in hyperphosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT), and downregulation of NGF, TrkA and other factors that participating in this pathway. The NFAT1-4 family are dependent isoforms of calcineurin, while NFAT5 isoform is independent. It has been demonstrated the neuroprotective role of Cyclosporin A via calcineurin dependent or independent. In this study, we evaluate the action of Cyclosporine A in the PNS system, that could be associated with levels of NGF, TrkA and an independent of calcineurin transcription factor (NFAT5) that interplay the plasticity of neuronal cells derived from Dorsal root ganglia (DRG) maintained in cultures. We use E10 DRG cultures supplemented with medium conditioned E9 Retinal treated with Cyclosporin A for 48 and 72 hours. Cultures enriched neurons were confirmed by calcium imaging method. The action of Cyclosporine A in the neuritogenesis was assessed by bright field microscopy, expression of NGF, TrkA and NFAT5 was performed by RT-PCR, intracellular accumulation of NGF was evaluated by immunofluorescence and the presence of TrkA in neurons. The viability test of the cultures treated or not with the concentrations of 1-40 μ M Cyclosporine A was performed by MTT method. The results show an increase of NGF levels in mixed cultures, and TrkA receptor and NFAT5 in cultures enriched in neurons following treatment with cyclosporine A. Given the importance of NGF pathway in the development and maintenance of the SNP, the use of Cyclosporin A have activity in the peripheral nervous system cells, which might be used in the clinic with new target for new therapies.

Keywords: Cyclosporin A, NGF, TrkA, NFAT5, Dorsal root ganglia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE LIGAÇÃO ENTRE NGF E SEUS RECEPTORES;

Figura 02: VIA DE SINALIZAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO (NFAT) NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA MEDIADA POR Ciclosporina A;

Figura 03: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE NFATC MEDIADA POR GSK3 β ;

Figura 04: PROCEDIMENTO DA CULTURA DE GLIA DE MÜLLER PARA OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA;

Figura 05: ILUSTRAÇÃO ANATÔMICA DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL EM EMBRIÕES E10 DURANTE DISSECAÇÃO;

Figura 06: PERCURSO DE TEMPO MÉDIO DE CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR $[Ca^{2+}]_i$ EM PERÍODO BASAL E PÓS-ESTÍMULO COM KCl E ATP.

FIGURA 07: CULTURA DE GÂNGLIOS ÍNTEGROS NA PRESENÇA DE MEIO CONDICIONADO E CICLOSPORINA;

FIGURA 08: ANÁLISE DE $[Ca^{2+}]_i$ EM CULTURAS ENRIQUECIDAS EM NEURÔNIOS APÓS 48H DE TRATAMENTO COM FATORES DE CRESCIMENTO E CsA;

FIGURA 09: ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE MTT DE CULTURAS ENRIQUECIDAS EM NEURÔNIOS OU GLIAS, APÓS 48H DE TRATAMENTO COM FATORES DE CRESCIMENTO E CsA;

FIGURA 10: CULTURAS ENRIQUECIDAS EM NEURÔNIOS, EM MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO APÓS 48H DE TRATAMENTO COM FATORES DE CRESCIMENTO E CsA;

FIGURA 11: CULTURA DE GÂNGLIO ENRIQUECIDA EM NEURÔNIOS, MOSTRANDO A AÇÃO DA CICLOSPORINA A SOBRE A NEURITOGÊNESE;

FIGURA 12: RT-PCR E EXPRESSÃO DE NGF, TRKA E GAPDH EM CULTURAS MISTAS COM OU SEM TRATAMENTO COM A CICLOSPORINA A;

FIGURA 13: QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE NGF E SEU RECEPTOR ESPECÍFICO TRKA. USO DE GAPDH COMO CONTROLE POSITIVO DA TÉCNICA;

FIGURA 14: QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NFAT5 EM CULTURAS.

FIGURA 15: IMUNOFLUORESCÊNCIA COM CO - MARCAÇÃO PARA NEUROFILAMENTO NEURAL E TrkA.

FIGURA 16: IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CULTURAS MISTAS, MOSTRANDO MARCAÇÃO PARA NGF E DAPI;

TABELA 1: ANTICORPOS UTILIZADOS PARA MARCAÇÕES SIMPLES E CO-MARCAÇÃO NA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT: PROTEÍNA CINASE B.

BDNF: FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO.

BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO.

CaN: CALCINEURINA.

[Ca²⁺]_i: CÁLCIO INTRACELULAR

cDNA: ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO COMPLEMENTAR.

CMF: SOLUÇÃO DE HANKS SEM CÁLCIO E SEM MAGNÉSIO.

CsA: CICLOSPORINA A.

DAPI: 4',6-DIAMIDINO-2-FENILINDOL – MARCADOR NUCLEAR.

DMEM: MEIO DE EAGLE MODIFICADO POR DULBECCO.

DMSO: DIMETILSULFÓXIDO – SOLVENTE POLAR.

DNAse1: DESOXIRRIBONUCLEASE 1.

FBS: SORO FETAL BOVINO.

GAPDH: GLICERALDEIDO 3-FOSFATO DESIDROGENASE.

GRD: GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL.

GSK3 β : GLICOGÊNIO SINTASE CINASE 3 BETA.

IL-2: INTERLEUCINA 2.

IP3K: FOSFATIDILINOSITOL -3- CINASE.

MCR: MEIO CONDICIONADO OBTIDO DA RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA.

mRNA: ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO.

NFATC: FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADO. TIPOS NFAT1-NFA4, NFAT5 (INDEPENDENTE DE CALCINEURINA).

NGF: FATOR DE CRESCIMENTO DE NERVO.

P75: SUBUNIDADE DE BAIXA AFINIDADE PARA NEUROTROFINAS.

RNA: ÁCIDO RIBONUCLEICO.

RT-PCR: REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA, SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

TRKA: RECEPTOR TIROSINO CINASE DE ALTA AFINIDADE PARA NEUROTROFINAS ATIVADO POR NGF.

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso periférico é essencialmente responsável pelas funções do corpo humano, como a sensibilidade a dor, calor, e responde a qualquer estímulo diferente ao corpo, juntamente ao sistema nervoso central. Sua fisiologia é extensivamente estudada e sua capacidade regenerativa está fortemente associada à secreção de fatores tróficos (TERENGHI, 1999).

Após lesão, o sistema nervoso periférico apresenta perda da inervação de órgãos, e raramente apresenta recuperação sem intervenção cirúrgica. A terapia celular e o uso de fatores tróficos são estratégias amplamente utilizadas para recuperação após lesão (SEBBEN; LICHTENFELS, 2011).

Fatores tróficos, também chamados de neurotrofinas, são proteínas que desempenham importante papel na padronização do desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso de mamíferos. São geralmente classificados em grandes famílias, e alguns fatores estão intimamente mais ligados ao sistema nervoso central, outros, são caracteristicamente associados ao sistema nervoso periférico (BARBACID, 1995).

O primeiro fator trófico descoberto, foi classificado como Fator de Crescimento de Nervo (NGF), associado ao sistema nervoso periférico. Descoberto na década de 50, revolucionou a neurobiologia, atribuindo a ele funções como desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso periférico (ALOE, 2004; COHEN; GREENBERG, 2009; COHEN; LEVI-MONTALCINI, 1956; VENOM; COHEN; LEVI-MONTALCINI, 1996).

O NGF pode ser encontrado no sistema nervoso central, mas foi caracterizado inicialmente como fator trófico do sistema nervoso periférico. Há outros fatores tróficos, como o BDNF, que é amplamente encontrado no sistema nervoso central, o EGF, fator de crescimento epidermal, relacionado ao crescimento, proliferação e diferenciação das células através da sua ligação ao seu receptor (WIEDUWILT; MOASSER, 2011).

Receptores enzimáticos de superfície celular são amplamente associados aos fatores de crescimento, NGF se liga a receptores que transmitem a sinalização ao interior da célula. Este é chamado TrkA (COHEN; GREENBERG, 2009).

O TrkA, Receptor tirosino cinase A, é um receptor associado à membrana plasmática, formado por proteínas cinases, que são capazes de transmitir sinais ao interior celular através da mudança conformacional de suas proteínas ligadas à membrana, intermediando o processo de sinalização celular pela transdução de sinal (MANTYH et al., 2011).

O NGF se liga ao receptor TrkA, ativando a fosforilação de vários sítios, como o sítio de tirosina 490, que ativa vias de sinalização como a dependente de MAPK, via de sinalização ativada por mitógeno, amplamente conhecida na via de transdução de sinal, que no sistema nervoso resulta em diferenciação e sobrevivência de células neurais (DAVIDSON et al., 2004).

TrkA ativado por NGF é capaz de estimular diversas vias de sinalização celular. Entre elas, a via dependente de Calcineurina. A via dependente de calcineurina é dependente do aumento dos níveis de cálcio no interior da célula, que resulta na formação de um complexo associando cálcio e calmodulina, ativando a calcineurina. (VIOLA et al., 2005).

Calcineurina (CaN) é uma fosfatase, que ativada tem a função desfosforilativa. Após ativada pelo complexo Cálcio/Calmodulina, a calcineurina desfosforila fatores de transcrição como o NFAT, que são mediadores da comunicação celular mais próximos ao núcleo. Quando desfosforilado, o NFAT consegue atravessar a membrana nuclear e ativar a expressão de genes em resposta ao estímulo de membrana (VIOLA; RAO, 1997).

Algumas substâncias são capazes de inibir este processo de transdução de sinal, como o imunossupressor Ciclosporina A (CsA), que tem ação conhecida no sistema imune, pelo bloqueio da calcineurina, impedindo ativação de NFAT e inibindo o processo de ativação de linfócitos T na resposta imune. A Ciclosporina A é amplamente utilizada no processo de recuperação de

pacientes transplantados, diminuindo a probabilidade de rejeição a inxertos (THOMSON; WEBSTER, 1988).

O papel da Ciclosporina A não se limita ao sistema imune. Sena e colaboradores em 2006 utilizaram a Ciclosporina A no tratamento de pacientes com hanseníase, em todas as formas clínicas da doença (multibacilares e paucibacilares) que apresentavam secreção de níveis elevados de autoanticorpos contra o NGF (anti-NGF), correlacionando esses autoanticorpos com a diminuição dos níveis de NGF, favorecendo um quadro de neuropatia nesses pacientes.

Após o tratamento com 5mg/kg/dia, pacientes reacionais crônicos acometidos com inflamação dos nervos e consequente dor neural, apresentaram supressão da produção de anti-NGF após um mês de tratamento, com consecutiva melhora motora e sensorial. Estes surpreendentes efeitos da CsA na neuropatia da hanseníase sugere um papel neuroprotetor que pode estar além da supressão da produção de autoanticorpos anti-NGF, controlando hiperalgesia e possivelmente promovendo plasticidade neural em decorrência da melhora no sistema motor.

Estando a manutenção de neurônios periféricos diretamente relacionado aos níveis de NGF e consequentemente ao seu receptor específico TrkA, o trabalho propõe estudo em células do sistema nervoso periférico associando níveis de NGF e TrkA na formação de neurites e desenvolvimento das células neurais, após tratamento com diferentes concentrações de Ciclosporina A.

Foi também avaliada a participação da calcineurina na via de transdução de sinal do NGF em neurônios, tendo em vista o papel inibidor da Ciclosporina A sobre esta fosfatase e consequente bloqueio da via de transdução de sinal em células do SNP.

1.1. NGF E OUTRAS NEUROTROFINAS

O NGF foi a primeira neurotrofina a ser descrita, na década de 1950 por Rita Levi Montalcini (COHEN; LEVI-MONTALCINI, 1956; VENOM; COHEN; LEVI-MONTALCINI, 1996), e é uma proteína que pertence à família de neurotrofinas que inclui o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e outras neurotrofinas, incluindo a neurotrofina 3, 4 e 6 (NT3, NT4 e NT6), que se ligam aos receptores TrkA, TrkB e TrkC (DAVIDSON et al., 2004). Essas neurotrofinas são importantes moduladores do desenvolvimento e da plasticidade do sistema nervoso em mamíferos (THOENEN, 1994).

As neurotrofinas possuem o papel regulador da expressão de genes que favoreçam a sobrevivência celular. Elas são estimuladoras da expressão gênica de novas neurotrofinas, e tem sua ação mediada pelos seus respectivos receptores (CHEN et al., 2014), favorecendo uma autorregulação em neurônios sensoriais e simpáticos no SNP (KIM et al., 2014).

Uma das principais funções do NGF no sistema nervoso é mediar a seletiva sobrevivência de neurônios simpáticos e sensoriais em desenvolvimento, que inervam tecidos alvos. Sua ação é constantemente regulada, através da captação no meio extracelular, do transporte através do axônio e das vias de sinalização responsável pela sua transdução de sinal (MISKO; RADEKE; SHOOTER, 1987).

O NGF liga-se com alta afinidade ao seu receptor de membrana específico (TrkA) e com baixa afinidade ao receptor inespecífico (p75) (Figura 1), envolvendo diferentes vias de sinalização bioquímicas intracelulares (TONI; DUA; VAN DER GRAAF, 2014). A ligação do NGF ao TrkA induz fosforilação de resíduos de tirosina do receptor, ativando proteínas cinases (ex: IP3K, MAPK e JNK) e consequentemente fatores de transcrição (ex: Fos e Jun) (NICHOLS; SUPLICK; BROWN, 1994).

A partir da ligação do NGF ao seu receptor de membrana, muitos processos intracelulares podem ser regulados. O NGF está intimamente associado à morte celular, principalmente por apoptose, decorrente de sua

privação de alguma forma, onde esta geralmente está associada ou é diretamente dependente de caspase (CHANG; JOHNSON, 2002).

Além de estar diretamente relacionado ao desenvolvimento de células do sistema nervoso periférico, o NGF também age na recuperação de células comprometidas no processo de apoptose, podendo desenvolver um papel de neuroplasticidade tempo-dependente. Consequentemente, o NGF é responsável pela sua auto-regulação, através da transdução de sinal e produção de novos receptores e fatores de transcrição envolvidos nesta via de transdução de sinal (HU et al., 2011).

Dessa forma, na ausência de NGF e de outras neurotrofinas, células do sistema nervoso periférico tendem a entrar precocemente em processo de apoptose, levando à morte da célula e, frequentemente, ocasionando lesões em tecidos privados de fator de crescimento (TANIUCHI et al., 1988).

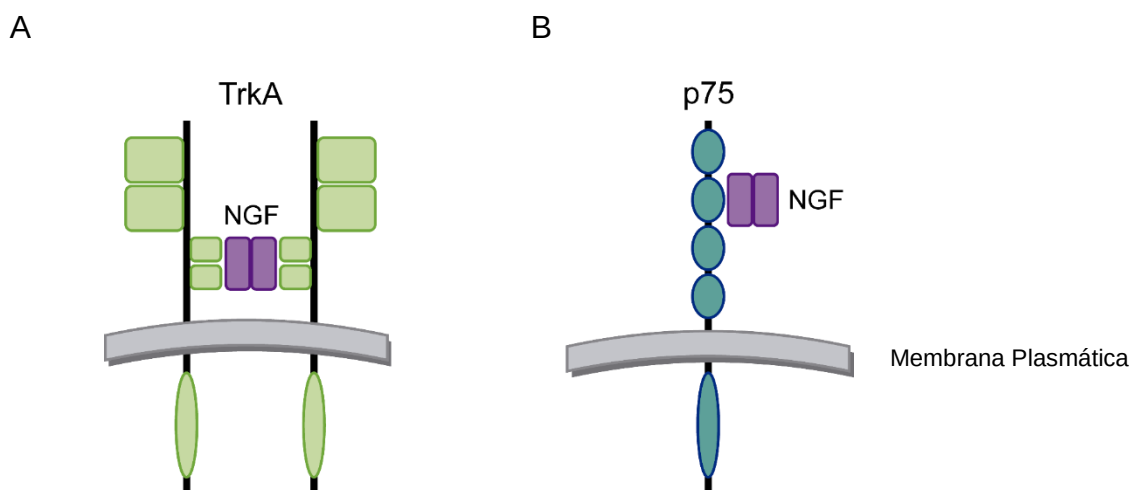


Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de ligação entre NGF e seus receptores A. Receptor Tirosina cinase A (TrkA), específico para NGF e B. Receptor de neurotrofinas p75. Adaptado de (TONI; DUA; VAN DER GRAAF, 2014)

1.2. CICLOSPORINA A (CsA)

Sendo um bioproduto lipofílico cíclico, normalmente utilizado em tratamento de desordens autoimunes e processo de recuperação de pacientes transplantados, frequentemente para tratamentos pós-transplantes cardíacos, a Ciclosporina A é um imunossupressor que foi introduzido no uso clínico ao início de 1980 (MCMILLAN, 1989), porém na época ainda com muitos efeitos colaterais, necessitando de ajuste de dosagem, que exige bastante precisão neste tipo de tratamento, onde a dose terapêutica e a tóxica tem uma relação muito estreita, causando alto risco de nefrotoxicidade (GARCIA et al., 2004).

Dada a sua notável melhora no quadro dos pacientes, as pesquisas com o uso da Ciclosporina A se estenderam, sendo hoje mostrada sua similaridade com outros compostos, como o macrolídeo derivado do *Streptomyces tsukubaensis* (FK506), demonstrado em 1987, que tem ação imunossupressora mais potente comparado à Ciclosporina A, sendo a base do tratamento em 80% de transplantes hepáticos e 30% em renais (GARCIA et al., 2004).

Tendo, portanto, um papel predominantemente imunossupressor, a Ciclosporina A age no sistema imune através da inibição de Calcineurina (fostatase 3B), que age como um segundo mensageiro (PAPERS; CRABTREE, 2000). Durante a atividade de linfócitos, os níveis de cálcio citoplasmático aumentam, formando complexo com calmodulina. O complexo calcio-calmodulina favorece a ativação de calcineurina com consecutiva defosforilação de NFATc (Fator Nuclear de Células T Ativadas), que uma vez defosforilado, migra para núcleo para promover a expressão de genes que participam da atividade de linfócitos (Figura 2), incluindo genes de citocinas como a interleucina 2 (IL-2) (THOMSON & WEBSTER, 1988).

Devido seus efeitos imunossupressores, a Ciclosporina A é utilizada em pacientes transplantados, que através de sua comumente ação inibitória de NFATc, bloqueia a atividade de linfócitos, diminuindo as chances de ocorrer rejeição de tecidos transplantados (THOMSON & WEBSTER, 1988). No entanto desde sua implantação, a Ciclosporina A vem sendo alvo de diversos estudos, tendo como um dos principais alvos, a sua ação no sistema nervoso,

com efeito direto no desenvolvimento e reparo de tecidos neurais, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* de células adultas e em desenvolvimento (HUNT et al., 2010; SACHEWSKY et al., 2014).

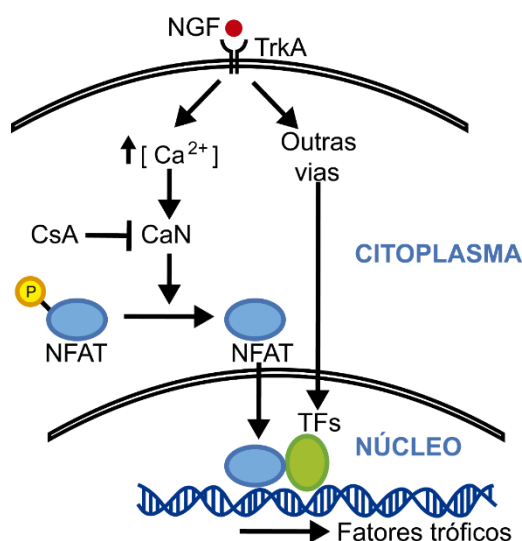


Figura 2: Figura esquemática da via de sinalização de fatores de transcrição (NFAT) na regulação da expressão gênica, mostrando o NGF estimulando o receptor de membrana e o comportamento celular. Adaptado de (VIOLA et al., 2005).

No sistema nervoso, a ação neuroprotetora da Ciclosporina A está associada ao bloqueio da Calcineurina, como no sistema imune, porém vários outros fatores estão sendo investigados, como a sobrevivência celular através da inibição da abertura do poro de transição de permeabilidade no processo de apoptose na presença de inibidor de caspase (CHANG; JOHNSON, 2002; MNICH et al., 2014).

A Ciclosporina A possui um mecanismo de ação bem caracterizado no sistema imune, porém efeitos paralelos à sua administração tem levantado hipóteses de mecanismos alternativos, tornando-se um medicamento promissor para pesquisas em novos sistemas correlacionados (JI & RUPP, 1997; NICHOLS et al., 1994).

1.3. CALCINEURINA (CaN) E FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS (NFATc)

A Calcineurina é uma proteína fosfatase Serina e Treonina - específica, amplamente conservada em eucariotos, que tem sua função ativada pelo aumento do influxo de cálcio citoplasmático que ocorre em resposta à estímulos na membrana. A Calcineurina é única entre as fosfatases pela sua capacidade de responder ao aumento de cálcio através da sua ativação por calmodulina (ARAMBURU; HEITMAN; CRABTREE, 2004).

Após um estímulo, que pode ser químico ou elétrico, ocorre a formação do complexo Cálcio-Calmodulina, ativando a Calcineurina para seu papel de desfosforilar o fator de transcrição NFATc, localizado em uma região próxima ao núcleo, que livre da fosforilação, consegue atravessar a membrana nuclear e após sua translocação, ativar respostas finais esperadas por esta via de transdução de sinal, como a síntese de novas neurotrofinas, interleucinas, autorregulação de diversas proteínas envolvidas, assim como proteínas do citoesqueleto (RICCIO et al., 1997).

O papel da CaN é amplamente conhecida no sistema imune, associada em processos de perdas e disfunções sinápticas e vulnerabilidade em células neurais, e na década de 90, estudos mostraram também a CaN presente em células gliais do tecido cerebral intacto, porém mais notadamente após danos inflamatórios (FURMAN; NORRIS, 2014).

São conhecidos 5 membros da família dos fatores de transcrição NFATc, sendo nomeadas NFAT1-NFAT5, que estão intimamente envolvidos no processo de resposta imune, mas também no desenvolvimento do sistema cardíaco, musculo esquelético e sistema nervoso. NFAT1-NFAT4 tem ação regulada por Calcineurina, consequentemente regulados por interferência de Ciclosporina A, todavia não há relatos sobre ação de Ciclosporina A no fator de transcrição NFAT5, que é classificado independente de CaN (LUO et al., 1996).

Alguns dados sugerem que as funções NFAT-dependentes em neurônios podem ser potentemente regulada por NGF e outras neurotrofinas. No entanto,

o efeito facilitador de NGF depende da ativação da via PI3K/Akt após ativação do receptor TrkA, e a posterior inibição de glicogênio sintase cinase (GSK β), uma cinase para fosforilar NFAT e promover a sua exportação nuclear (Figura 3), regulando o processo e evitando superexpressão de proteínas (KIM et al., 2014).

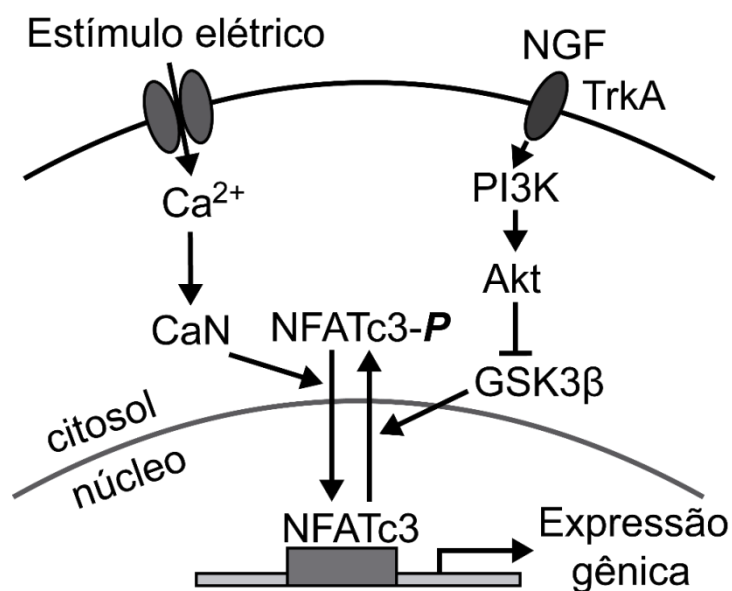


Figura 3: Regulação da expressão gênica através da fosforilação de NFAT (isoforma 3) por Gsk3B, por diferentes vias de ativação do fator de transcrição. Adaptada de (KIM et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho é avaliar a influência do tratamento com o imunossupressor Ciclosporina A na via de transdução de sinal de NGF em modelo *In vitro* de células de gânglio da raiz dorsal (SNP) de embriões de galinha.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação da Ciclosporina A na neuritogênese de células neurais do gânglio da raiz dorsal e na plasticidade neural em células tratadas por Ciclosporina A;
- Verificar a expressão de Fator de Crescimento de Nervo (NGF) e de seu receptor de alta afinidade (TrkA) induzido por Ciclosporina A em culturas enriquecidas de neurônio e células da glia de Schwann, assim como em culturas mistas contendo neurônios e glias;
- Mensurar a expressão do fator de transcrição NFAT5 sob tratamento da Ciclosporina A em culturas enriquecidas de neurônio e células da glia de Schwann, assim como em culturas mistas contendo neurônios e glias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ovos embrionados de galinha *White Leghorn* classificados segundo estagiamento (HAMBURGER; HAMILTON, 1951), provenientes da Granja Makaru - Ananindeua-Pará, que chegam ao laboratório no estágio de E7 e são mantidos em chocadeira digital, com controle de temperatura e umidade até o dia do experimento (E10). Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da UFPA (CEPAE -UFPA) sob o parecer 85/15.

3.2. PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE CULTURA

Objetivando melhor adesão das células neurais ao plástico das placas de cultura, as superfícies das placas foram incubadas com solução de poli-L-lisina (10µg/ml) causando a modificação eletrostática da placa, por aproximadamente 12 horas (overnight). Após o período de incubação, os poços das placas foram lavados três vezes com PBS estéril (pH 7.2-7.4) e secas dentro da capela de fluxo laminar por 30 minutos.

Posteriormente as placas foram tratadas com solução de Laminina (20 µg/ml – Sigma Aldrich. Cód L2020), que proporciona a adesão das células neurais, em um volume suficiente para cobrir a superfície de contato com as células, por pelo menos 2 horas em estufa úmida com 5% CO₂.

As lamínulas usadas para avaliação das células por imunofluorescência sofreram o mesmo tratamento. A partir deste ponto pôde-se fazer o plaqueamento das células. O excesso de solução de laminina foi aspirado pouco antes do plaqueamento.

3.3. PREPARAÇÃO DA CICLOSPORINA A

O composto utilizado foi adquirido através da Sigma Aldrich (Código 80688), e se trata de um metabólito Decapeptídio com estrutura química definida, extraído do fungo *Tolypocladium inflatum gams* (TRIBE, 1998), inserido na clínica com finalidade imunossupressora, agindo diretamente em linfócitos T.

Para o presente trabalho, a substância altamente lipofílica foi diluída inicialmente em solvente DMSO (concentração final de DMSO $\leq 0,003\%$). Em seguida diluído em DMEM, que foi mantido em solução estoque e solução de uso em freezer -20 para uso posterior.

A substância foi usada para tratamento das culturas tanto dos gânglios íntegros, como das células dissociadas. Foram usadas diferentes concentrações que abrangem de 1 - 40 μ M (LEE et al., 2011), onde 40 μ M é a concentração máxima atingida no cérebro, levando em consideração um tratamento de 5mg/kg do paciente (BROPHY et al., 2013). O cálculo foi feito para que a droga atingisse a concentração final na presença das células e do MCR.

3.4. MEIO CONDICIONADO OBTIDO POR CULTURA DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA

O preparo do meio condicionado, rico em fatores de crescimento como o NGF e outras neurotrofinas foi executada de acordo com o protocolo de cultura de células retinianas de embrião de galinha (REIS et al., 2001). Por ser rico em NGF e outras neurotrofinas, utilizamos o meio condicionado como alternativa de substituição do NGF comercial nos tratamentos, tornando os experimentos mais viáveis e baratos.

Para tal, utilizou-se ovos embrionados com os embriões na fase de desenvolvimento de 9 dias (E9). Após enucleação do globo ocular dos embriões em meio livre de cálcio (CMF), e microdissecação, a retina foi dissociada com solução de Tripsina concentrada a 0,05% por 10 minutos a 37°C, a fim de romper proteínas da matriz extracelular do tecido através de sua propriedade proteolítica, facilitando a dissociação tecidual (figura 4).

Obtivemos as células após centrifugação (1000 rpm por 30 segundos), que foram resuspensas em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), e então distribuídas em placas de cultura com poços de 33,7 mm de diâmetro (5ml/poço).

Mantivemos as células em estufa com temperatura de 37°C e atmosfera de 5% CO₂ durante aproximadamente sete dias, a fim de promover o esgotamento dos nutrientes e posterior acidificação, provocando a morte dos neurônios, restando predominantemente a população de células gliais de Muller, que aparentam maior resistência ao estresse induzido.

Após este período de exclusão de neurônios, as células gliais, produtoras de fatores neurotróficos, foram mantidas em meio DMEM acrescido de 1% de FBS, que é repostado em intervalos de três dias, coletando-se esses meios de cultura da placa enriquecidos com fatores de crescimento produzidos durante esse período. Após três dias de condicionamento o meio foi coletado, filtrado em filtro estéril de 0,22µm e armazenado em freezer à -20°C para posterior utilização.

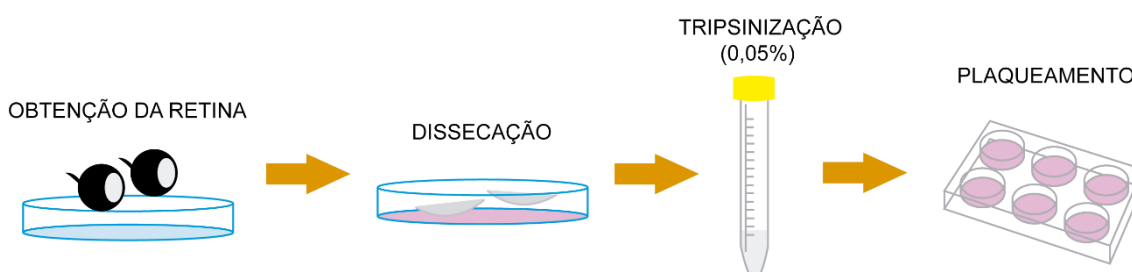


Figura 4: Procedimento da cultura de Glia de Müller para obtenção do Meio Condicionado de retina de embrião de galinha.

3.5. CULTURA E OBTENÇÃO DE NEURÔNIOS PERIFÉRICOS

Neurônios foram obtidos através de cultura de células do Gânglio da Raiz Dorsal (GRD) de embriões de galinha. Foram utilizados 5 ovos embrionados de galinha *White Leghorn* por experimento, classificados segundo estagiamento (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) obtidos de uma granja local já citada e mantidos em estufa à 38°C em atmosfera úmida até o estágio de desenvolvimento adequado (E10), ocasião em que os embriões foram sacrificados por decapitação para dissecação do GRD.

Para evidenciar a cadeia ganglionar, o embrião foi aberto ventralmente e eviscerado. Todo o processo de dissecação foi feito sob apoio de lupa em placa de petri, com o embrião submerso em meio DMEM (Figura 5 A, B e C). De 6 a 8 gânglios foram retirados de cada embrião a partir da idade prevista (REIS et al., 2008).

Três metodologias foram adotadas para a análise da ação da CsA na formação de neuritos: A utilização do Gânglio inteiro (complexo do gânglio composto por neurônios, glias de schwann e fibroblastos), com interferência de toda e qualquer população celular presente na região ganglionar, culturas mistas preparadas a partir de gânglios dissociados, mas com populações equilibradas entre glias e neurônios e finalmente células enriquecidas em populações Neurais ou Gliais, avaliando o efeito do fármaco em cada população celular. Os gânglios integros foram cultivados em meio de cultura DMEM suplementado com meio condicionado de retina (1:2) rico em fatores de crescimento para indução da diferenciação neural.

O estudo da ação da CsA em células isoladas foi feito após os gânglios dissecados imersos em meio DMEM serem incubados em Tripsina (Concentração final para 0,05%) por 12 minutos a 37°C, facilitando a dissociação das células neuroblásticas que compõem o gânglio. Após a dissociação por tripsina, os gânglios foram lavados através de quatro centrifugações (1000 rpm por 30 segundos), duas vezes com DMEM e duas

vezes com DMEM + 10% FBS, foram centrifugados e dissociados mecanicamente em aproximadamente 1,5mL de meio com pipeta Pasteur de vidro e ponta fina.

Após este processo, fibroblastos, neurônios e glia de schwann foram separadas usando um processo de decantação, por deposição cuidadosa do material celular em uma bureta de 60ml (Figura 5 D) preenchida com meio DMEM pré-resfriado a 4°C (Overnight ou no mínimo 12 horas), suplementado com 10% FBS.

O uso da Bureta tem por objetivo separar por sedimentação diferencial, com base na gravidade e na complexidade dos corpos celulares, que diferem, por exemplo, de debris criados durante dissociação mecânica, além de grumos formados por células mal dissociadas e restos teciduais, que se mantem em uma região diferente das células dissociadas e viáveis.

As proteínas presentes no soro fetal bovino agregam viscosidade ao meio resfriado, permitindo que os neurônios, que são naturalmente mais pesados com relação às células gliais e restos celulares, atravessem maior percurso na bureta e sejam coletados em uma região mais medial ou inferior.

Após 40 minutos de decantação, frações de 5 ml com as respectivas células separadas foram coletadas, centrifugadas e resuspensas em meio DMEM para posterior plaqueamento em placas de cultura estéril e pré-tratadas, facilitando a adesão celular por 10 minutos de incubação por 10-20 minutos em estufa com 5% CO₂ a 37°C.

Após adesão celular, suplementa-se o meio DMEM + 10% de FBS com meio condicionado de retina na proporção de 1:1 (DMEM: Meio Condicionado de Retina) nos poços que serão tratados com a CsA. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ por 48 ou 72 horas. A diferenciação celular foi confirmada através do Imageamento de Cálcio e por microscopia óptica, pelo comportamento fisiológico e morfologia característica de cada tipo celular (corpo celular bem definido em neurônios, com presença de dendritos e axônios, e células espalhadas, características de células gliais).

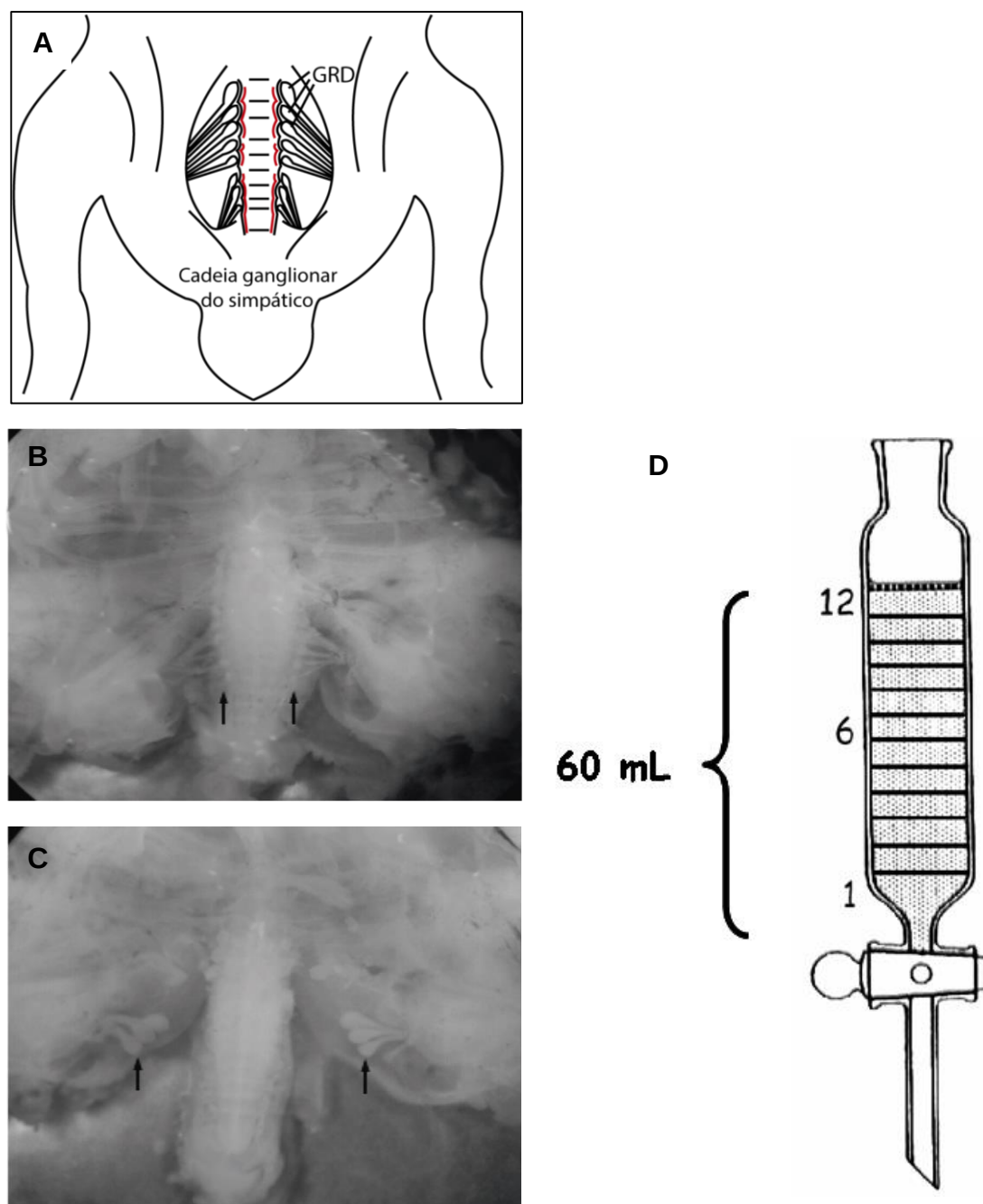


Figura 5: A. Ilustração anatômica da localização dos gânglios da Raiz Dorsal. Imagem adaptada de (CABRAL DA SILVA, 2007). **B.** Fotografia da região ventral do embrião durante a dissecação, demonstrando os gânglios presos na espinha dorsal. **C.** Fotografia demonstrando os gânglios extraídos da espinha dorsal. **D.** Representação esquemática da bureta durante o processo de decantação e separação das células.

3.6. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Para verificar a viabilidade das células expostas à Ciclosporina em diversas concentrações, foi utilizado o método fotolorimétrico do MTT (3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2-5-difenil-2H-tetrazólium bromídico), onde células viáveis reduzem o composto MTT de coloração amarela, em Formazam, de cor Azul, podendo este último ser quantificado por espectrofotometria em leitor de microplaca, em comprimento de onda de 570 nm.

Após 48h de tratamento com a Ciclosporina A, o meio de cultura foi retirado e substituído pela solução de MTT diluída em meio DMEM (0,5mg/ml). Após o período de reação de 2h, a solução de MTT foi retirada e foi adicionado DMSO, homogeneizando a solução em contato com as células para que houvesse a completa dissolução dos cristais de formazam. A leitura foi feita em leitor de microplacas Biotek, modelo ELx800.

3.7. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA NGF E TrkA EM CÉLULAS NEURAIS

Fizemos análise da proporção diferencial de tipos celulares, usando a marcação com anticorpos fluorescentes específicos para células neuronais, além da marcação de NGF e TrkA em culturas de neurônio do GRD de embrião de galinha (E10) que foram microcultivadas utilizando lâminulas circulares (15mm) em placas de culturas de 22,1mm.

Após o tratamento com a ciclosporina, as células foram fixadas usando solução a 4% de paraformaldeído por 30 minutos. Posteriormente as células fixadas foram lavadas com solução tampão fosfato (pH 8.0), seguido de permeabilização da membrana celular com Triton-X100 (0,3%), detergente surfactante que age na membrana celular e é responsável pela facilitação da marcação de proteínas intracelulares.

O bloqueio dos sítios inespecíficos dos grupos aldeído do fixador paraformaldeído foi realizado com Cloreto de Amônio (NH_4Cl) por 1 hora. A lavagem com solução de albumina de soro bovino (BSA, 3%) foi efetuada com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas. Os anticorpos primários e secundários fluorescentes foram listados na tabela 01 abaixo.

Anticorpo	Diluição	Imunogenicidade	Fabricante
Anti-NGF	1:100	Anti-Mouse	Sigma N-3908
Anti-NGF	1:100	Anti-Rabbit	ABCAM, AB6199
Anti-3A10	1:20	Anti-Mouse	DSHB, Iowa
Anti-TrKA	1:100	Anti-Rabbit	Cell Signaling, 14G6
Alexa-Fluor 488	1:100	Anti-Mouse	Invitrogen
Alexa-Fluor 594	1:100	Anti-Rabbit	Invitrogen

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários fluorescentes utilizados para marcação em células do Gânglio do SNP.

Foi mantida uma amostra privada de anticorpo primário, usada como controle negativo, prevenindo alguma marcação inespecífica pelo anticorpo secundário. Os anticorpos primários foram incubados *overnight* a 4°C, enquanto os anticorpos secundários foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente.

Por ultimo fez-se a marcação complementar com corante fluorescente que se liga fortemente às regiões ricas em DNA (DAPI, 10%), atravessando a membrana celular por sua característica lipofílica, durante 40 minutos, visando a marcação individual do núcleo celular.

As lâminas foram montadas usando *ProLong® Gold antifade* (P-36934-Invitrogen), evitando fotodegradação e prolongando a fluorescência na molécula alvo. As mesmas foram armazenadas em freezer devidamente protegidas da luz, para posterior análise por microscópio de fluorescência e confocal (LSM 5 Pascal, Zeiss).

3.8. EXTRAÇÃO DE mRNA E TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

Amostras de RNAm foram obtidas do cultivo de células parcialmente dissociadas (enriquecidas em neurônios ou glia) mistas (neurônio e glia) com e sem o tratamento com 40 μ M de Ciclosporina A, nas condições anteriormente citadas, utilizando o kit PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen), seguido de tratamento com DNase I (Sigma Aldrich), para eliminação de contaminantes de DNA genômico.

Após quantificação das concentrações de RNAm utilizando PicoDrop-100 (Laboratório Multiusuário do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA), 20 ng de cada amostra foi utilizada para avaliar o padrão de expressão de NFAT5, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), TrkA e NGF pela técnica de Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR).

Os inicializadores (*primer*) utilizados foram desenhados com auxílio do programa SnapGene (versão 3.0.3) e obtidos pela DNA Express Biotecnologia: 5'- AGCGTCGGAGAGCCAGAAAG -3' e 5'-TCGCAGCCTCTCGGTCTTTC-3' para NFAT5, 5'-ATGATTCTACACACGGACA-3' e 5'-ATCTGCCCATTGTGATGTTGCT-3' para GAPDH; 5'-TTCTGCAACGCCTGTGTG -3'; e 5'-CGCCGTAGAACTTGACGA-3' para TrkA; 5'-TGGGTCGGGGACAAAACC-3' e 5'CAGGCTGTGTCGATCCGG-3' para NGF.

A técnica de RT-PCR foi realizada segundo kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), onde, em um único momento, a enzima Transcriptase Reversa desempenha a função de converter RNAm em cDNA, possibilitando a amplificação consecutiva da região de interesse pela enzima JumpStart™ Taq DNA Polimerase. Para verificar possível contaminação por DNA genômico nas amostras, um controle foi feito para cada amostra omitindo a enzima Transcriptase Reversa.

A amplificação por PCR foi efetuada no total de 40 ciclos com desnaturação (94°C, 15 segundos), anelamento (60.6°C para NFAT5; 52°C para GAPDH; 53°C para TrkA; e 55°C para NGF, 30 segundos) e extensão (72°C, 1 minuto/Kb da região de interesse).

As amostras amplificadas por PCR foram validadas através da migração em eletroforese em gel de 1% Agarose, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio), utilizando padrão de peso molecular (*PCR Marker Solution*, Sigma Aldrich, 50-2.000pb). As imagens foram analisadas através de Transiluminador, captadas por câmera digital e quantificadas usando software ImageJ.

3.9. IMAGEAMENTO DE CÁLCIO EM CÉLULAS DO SNP

A quantificação da diferenciação celular foi feita através do método de imageamento de cálcio, diferenciando células neurais e gliais de schwann através da variação nos níveis de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ em resposta ao estímulo com Cloreto de Potássio (KCl) e ATP, identificadas paralelamente por morfologia em campo claro e imunofluorescência. A técnica foi executada a partir de protocolo já estabelecido (Agasse et al, 2008) salvo algumas adaptações.

As células provenientes do gânglio da raiz dorsal de embriões de galinha (E9) foram cultivadas em lamínulas circulares (15mm) de maneira já descrita. Após 48h de tratamento com a Ciclosporina A, as células foram incubadas durante 40 minutos com 5µM de Fura-2/AM (Molecular Probes), 0,1% de soro de albumina bovina e 0,02% de ácido plurônico F-127 (Molecular Probes), em solução de Krebs (132 mM de NaCl, 4 mM KCl, 1.24 mM de $MgCl_2$, 2.5 mM de $CaCl_2$, 6 mM de Glicose, 10 mM de HEPES, em pH ajustado para 7.4) em estufa com 5% de CO_2 a 37°C. As células permaneceram por 10 minutos em tampão Krebs na temperatura ambiente após o tempo de incubação no FURA-2 para obter a hidrólise completa da sonda.

As lamínulas com as células foram montadas sobre uma plataforma PH3 (Warner Instruments, Hamden, CT) acoplada à placa de um microscópio de fluorescência invertido (Axiovert 200; Carl Zeiss). As células foram continuamente perfundidas com tampão Krebs e estimuladas com KCl e ATP, seguindo o protocolo mostrado na figura 6 abaixo.

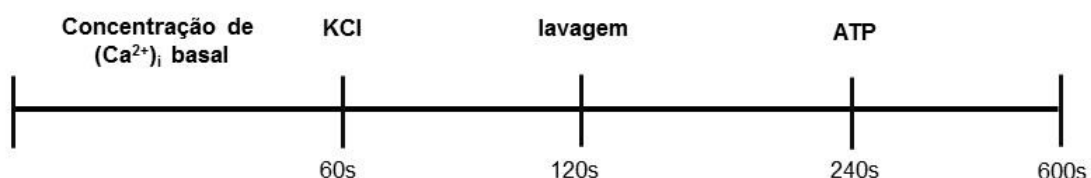


Figura 6: Percurso de tempo base demonstrando o estímulo das células do gânglio da raiz dorsal através do sistema de perfusão. Foi utilizado tempo padrão de 600 segundos, onde a concentração de Cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ basal foi captada nos primeiros 60 segundos aproximadamente, seguida dos estímulos com KCl e ATP.

As soluções foram adicionadas às células por um sistema rápido de transição (4 seg). As variações de $[Ca^{2+}]_i$ foram avaliadas por quantificação da razão entre a fluorescência emitida a 510 nm na sequência da excitação alternada (750 ms) a 340 e 380 nm, usando um aparelho Lambda DG4 (Sutter Instrument, Novato, CA) e um filtro de 510 nm de comprimento (Carl Zeiss) antes da aquisição de fluorescência com uma objectiva de 40x e uma câmera digital SNAP Cool (Roper Scientific, Trenton, NJ).

Os Valores adquiridos foram processados utilizando o software Microsoft Office, versão 2016. Os valores para razão de fluorescência de Fura-2 foram calculados com base em um ponto de corte de 10% de aumento no nível de $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo estímulo. As culturas de células depois do imageamento foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) e processadas para imunofluorescência.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism versão 7.01, usando o Teste T de Student para mesma amostra ou Análise de variância (Anova) para comparação entre os grupos, seguidos de um pós teste (Tukey) . A significância estatística foi dada quando $p \leq 0.05$ e foi determinado para o estudo dados amostrais com $n=3$.

4. RESULTADOS

4.1. AÇÃO DA CICLOSPORINA A NA NEURITOGÊNESE DE GÂGLIO DA RAIZ DORSAL

Após o tratamento com 10, 20, e 40 μ M de Ciclosporina A, não conseguimos notar diferença nos padrões de formação de neuritos nos gânglios, quando comparados com as culturas sem tratamento com Ciclosporina A, como observado nas fotomicrografias (figura 7).

Este resultado sofreu interferências, pelo gânglio da raiz dorsal se tratar de um complexo de células, que tem respostas diferentes à droga e possivelmente à suas concentrações, com difícil visualização e identificação de alterações celulares. Mediante esse resultado, passou-se a estudar o efeito da Ciclosporina A em cultura de neurônios simpáticos isoladas do Gânglio da Raiz Dorsal.

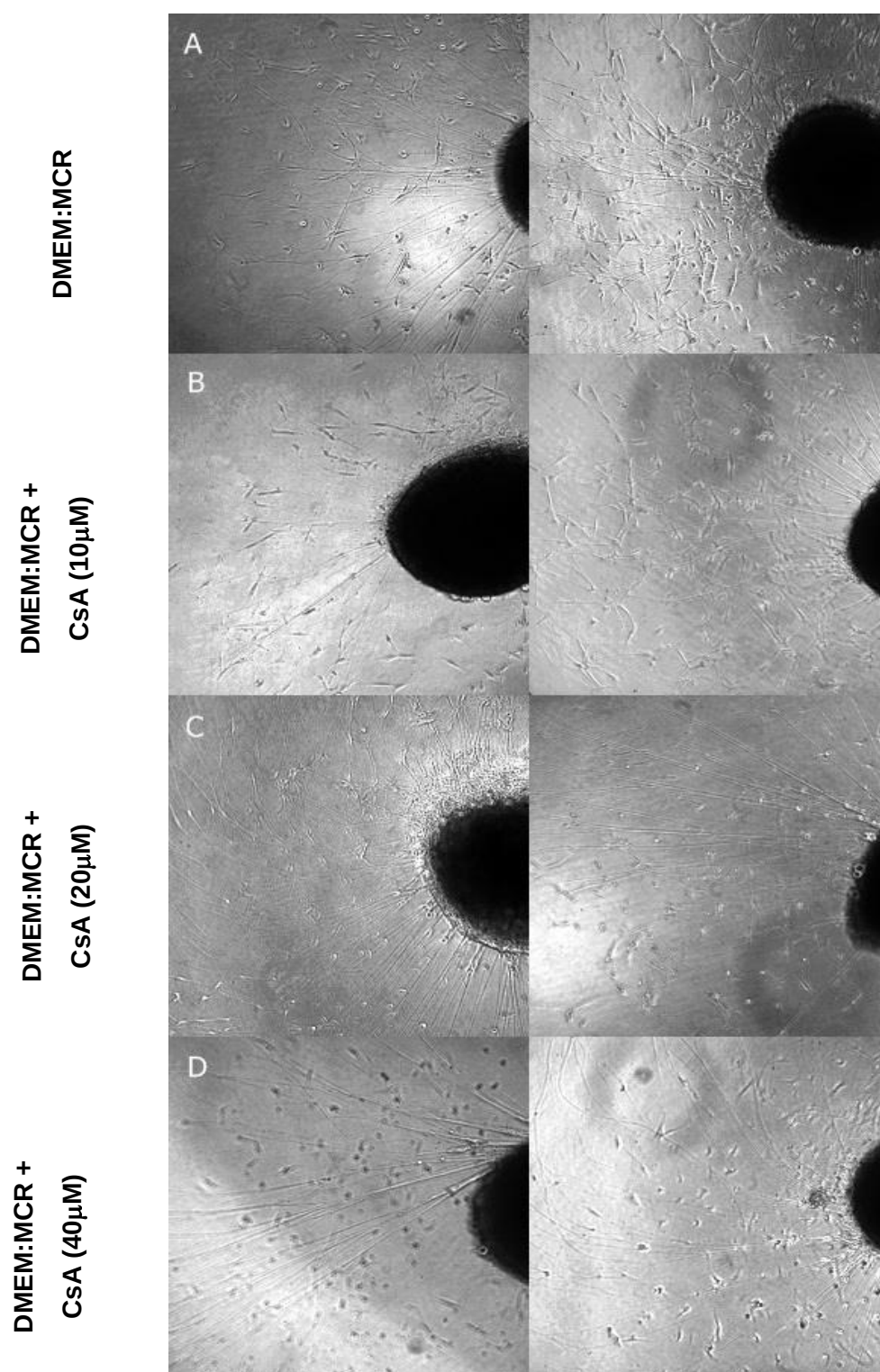


Figura 7: Efeito da Ciclosporina A na formação de dendritos dos neurônios do GRD: A. Gânglios controles tratados com Meio DMEM com soro fetal bovino (10%) e sem ciclosporina. Meio condicionado de retina. **B, C e D.** Gânglios nas mesmas condições tratados com 10, 20 e 40µM de CsA, respectivamente. Aumento de 10X.

4.2. ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR POR COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DETERMINADO POR IMAGEAMENTO DE CÁLCIO

Após o teste da Ciclosporina A em gânglios ex vivo, não foi observada qualquer diferença no comportamento da formação de neuritos, portanto, houve a necessidade de se fazer a dissociação das células do gânglio da raiz dorsal dos embriões para avaliar se nessas condições a Ciclosporina A teria algum efeito no processo de diferenciação celular, assim como na formação dos neuritos.

Para isso, optamos em verificar os efeitos da ciclosporina em modelo de cultura de células do gânglio da raiz dorsal. Inicialmente fizemos a caracterização das condições de cultivo das células do gânglio e verificamos o grau de enriquecimento das culturas neuronais através da técnica de imageamento de cálcio. Essas culturas foram mantidas apenas com DMEM + 10% FBS, meio condicionado de retina, NGF 50ng/ml e tratadas com concentrações de 1, 10 e 40 μ M de Ciclosporina A. O tempo de tratamento de todos os grupos foi de 48 horas.

Em trabalhos prévios (AGASSE et al., 2008; DE MELO REIS et al., 2011; FREITAS et al., 2016), o KCl foi usado para estimular a concentração de Cálcio Intracelular $[Ca^{2+}]_i$ em células neurais, enquanto que ATP foi usado para estimular $[Ca^{2+}]_i$ em células gliais. Na figura 8 (1-7; A-F) pode-se notar o cultivo enriquecidos em neurônios, através do alto número de células que respondem ao estímulo com KCl 50mM, em detrimento às células que respondem ao ATP 1mM.

Foi feita a análise estatística para comparar os níveis de $[Ca^{2+}]_i$ entre neurônio e Glia de Schwann por laminula, através do teste T de student (Figura 8.7) constatando diferença significativa nas análises de culturas tratadas com 100% de meio condicionado de retina ($p=0.0023$), NGF 50ng/ml ($p=0.0018$) e Ciclosporina A nas concentrações de 1 e 10 μ M ($p=0.024$ e 0.0015 respectivamente). Não foi obtida diferença nos grupos controle FBS ($p=0.145$)

e no tratado com Ciclosporina A na concentração de $40\mu\text{M}$ ($p=0.0624$), mostrando porém uma tendência à diferença, vista no gráfico.

Ao final, fizemos comparação entre os grupos através do teste de Anova (Figura 8.8). Notou-se que em todos os grupos havia maior concentração de cálcio em neurônios. Este aumento não se dá ao uso da Ciclosporina A, ao qualquer outro fator que não seja por maior quantidade de células com comportamento neuronal, já que a participação do Cálcio é “*Upstream*” à ação da Ciclosporina, que age na calcineurina.

No entanto, com o aumento da concentração de uso da Ciclosporina A, há uma perda na resposta glial, o que se vê na figura 8F, após o uso da Ciclosporina A na maior concentração usada no estudo, que foi de $40\mu\text{M}$. A possibilidade de morte celular foi descartada pelo método de MTT (Figura 11).

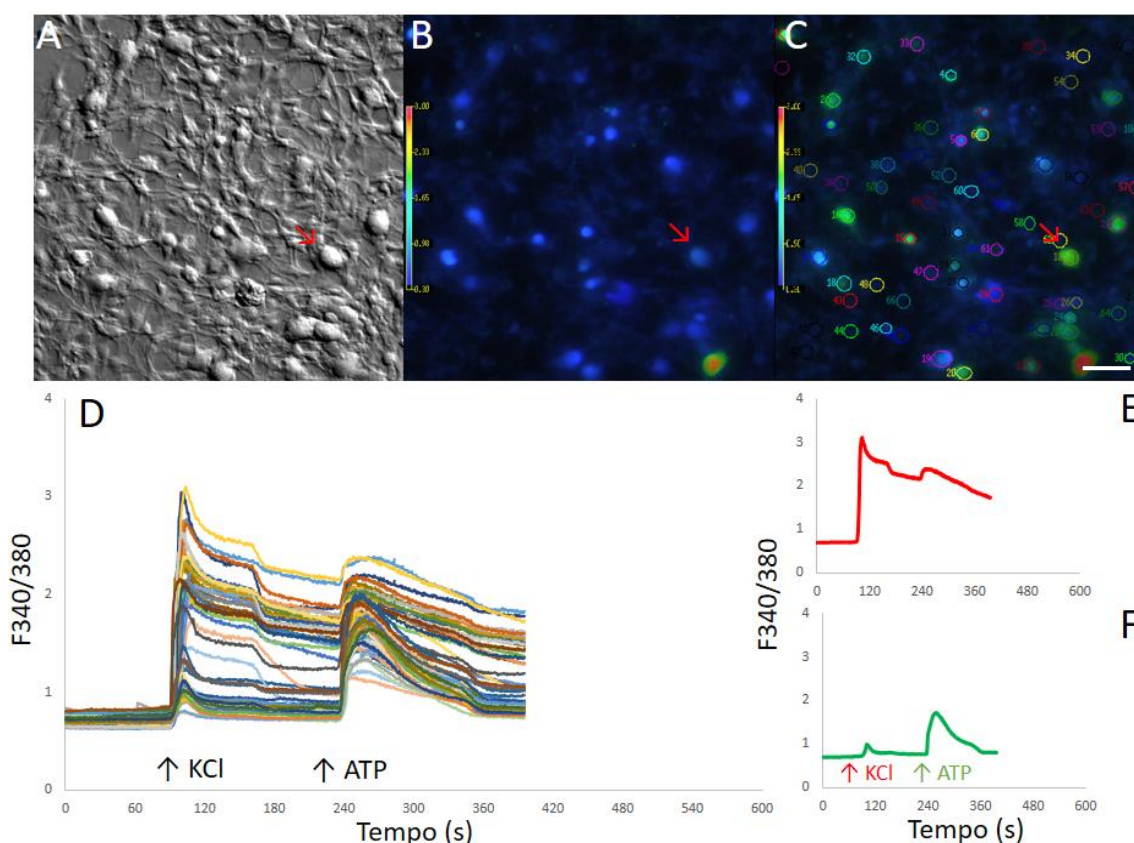


Figura 8.1. Análise de Cálcio intracelular através de FURA-2 em cultura enriquecida em neurônios, mantidas por 48h apenas em **meio DMEM + 10% de FBS**. **A.** Neurônios mostrados em campo claro. **B.** Níveis basais de cálcio intracelular das culturas enriquecidas em neurônios incubados com FURA-2 visualizados por microscopia de Fluorescência. **C e D.** Células isoladas e selecionadas para análise de cálcio durante o estímulo com KCl 50mM e ATP 1mM. **E.** Célula representante do grupo neural, mostrando comportamento pós estímulo com KCl. **F.** Célula isolada e selecionada com característica de célula da glia de schwann após estímulo com ATP. Nota-se semelhança nos níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entre as populações de células. ($p=0.145$) Escala $50\mu\text{M}$. $n=3$.

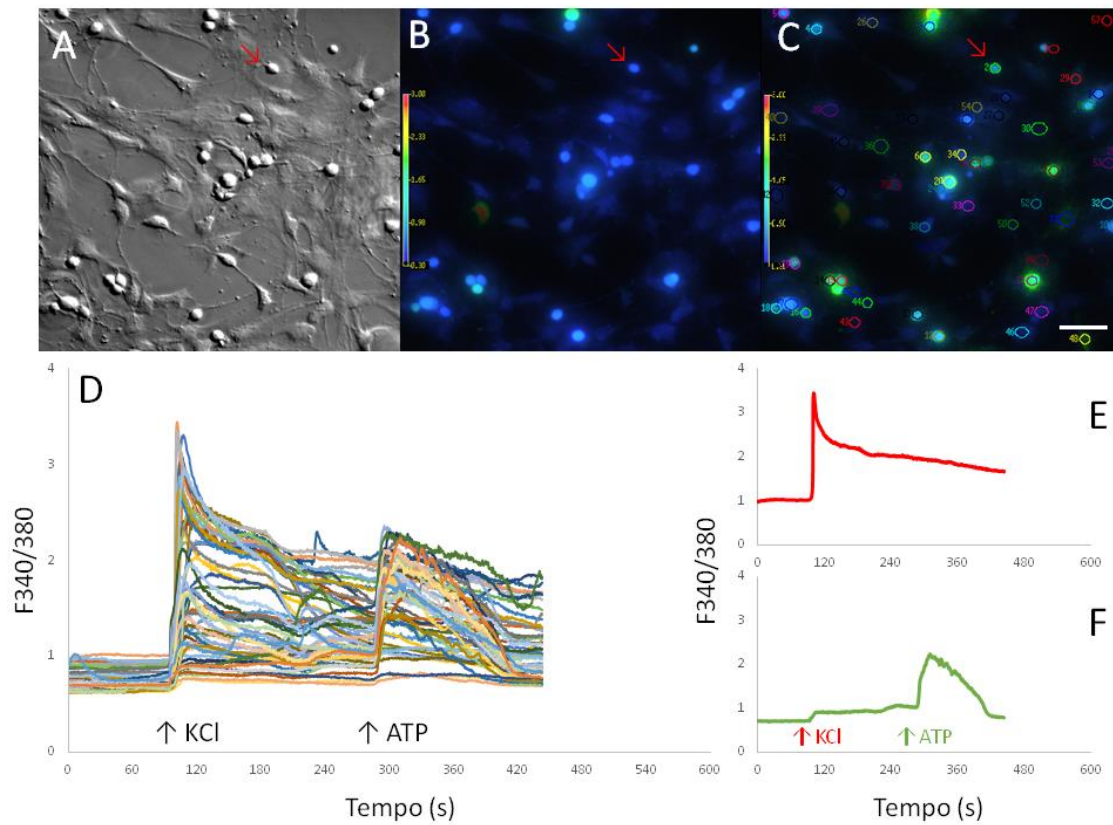


Figura 8.2. Análise de Cálcio intracelular através de FURA-2 em cultura enriquecida em neurônios, mantidas por 48h em **100% de meio condicionado de retina**. **A.** Neurônios mostrados em campo claro. **B.** Níveis basais de cálcio intracelular das culturas enriquecidas em neurônios incubados com FURA-2 visualizados por microscopia de Fluorescência. **C e D.** Células isoladas e selecionadas para análise de cálcio durante o estímulo com KCl 50mM e ATP 1mM. **E.** Célula representante do grupo neural, mostrando comportamento pós estímulo com KCl. **F.** Célula isolada e selecionada com característica de célula da glia de schwann após estímulo com ATP. (p=0.0023) Escala 50 μ M. n=3.

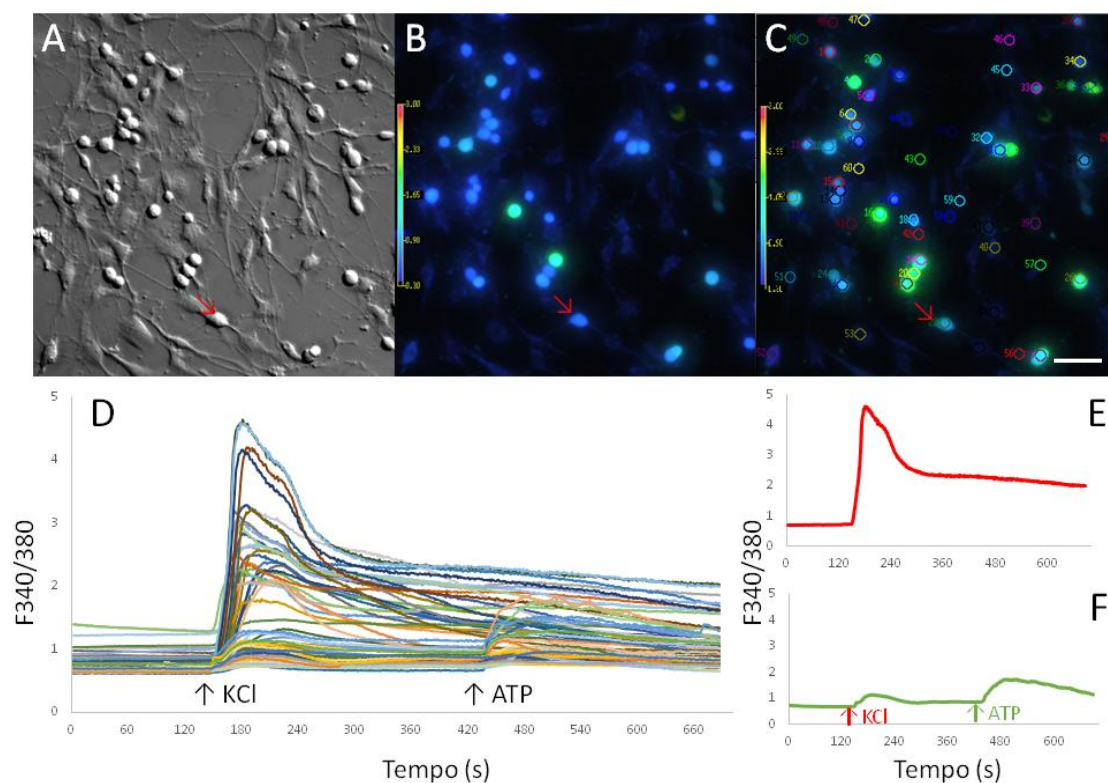


Figura 8.3. Análise de Cálcio intracelular através de FURA-2 em cultura enriquecida em neurônios, mantidas por 48h em **DMEM + 10% de FBS e 50ng de NGF**. **A.** Neurônios mostrados em campo claro. **B.** Níveis basais de cálcio intracelular das culturas enriquecidas em neurônios incubados com FURA-2 visualizados por microscopia de Fluorescência. **C e D.** Células isoladas e selecionadas para análise de cálcio durante o estímulo com KCl 50mM e ATP 1mM. **E.** Célula representante do grupo neural, mostrando comportamento pós estímulo com KCl. **F.** Célula isolada e selecionada com característica de célula da glia de schwann após estímulo com ATP. ($p=0.0018$) Escala 50 μ M. $n=3$.

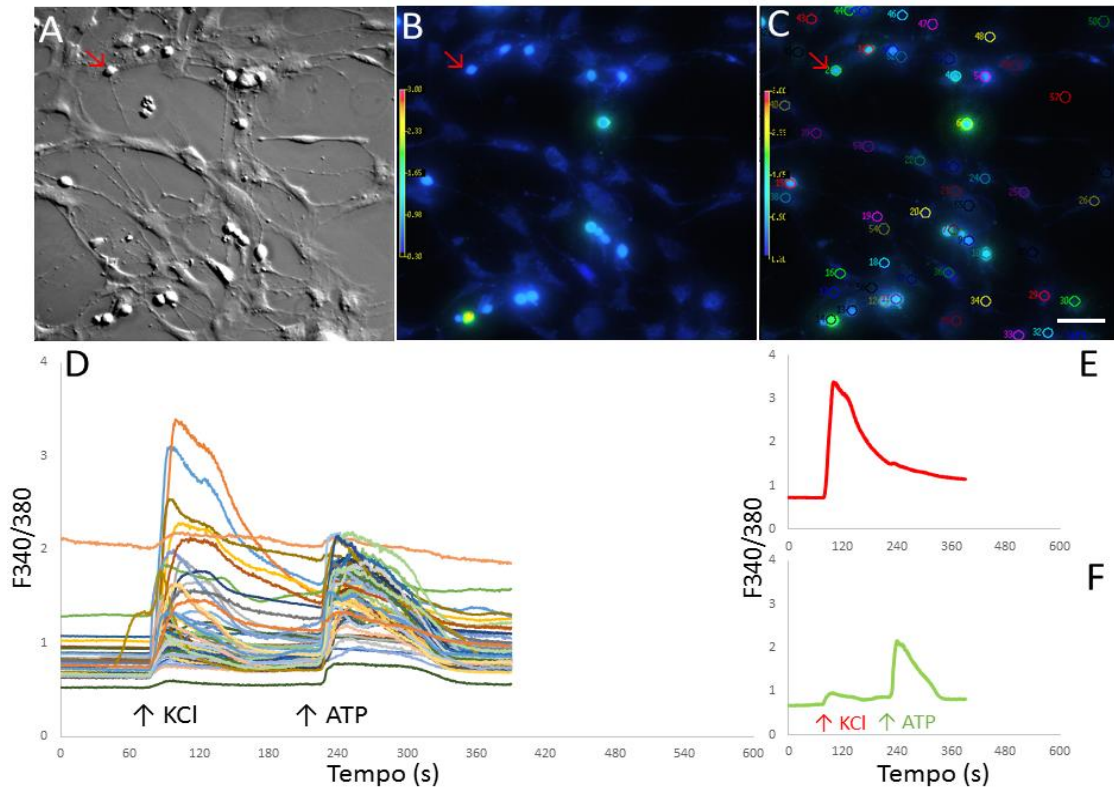


Figura 8.4. Análise de Cálcio intracelular através de FURA-2 em cultura enriquecida em neurônios, mantidas por 48h em 50 % de meio DMEM + 10% de FBS e 50% de meio condicionado de retina, tratadas com Ciclosporina A 1 μ M. **A.** Neurônios mostrados em campo claro. **B.** Níveis basais de cálcio intracelular das culturas enriquecidas em neurônios incubados com FURA-2 visualizados por microscopia de Fluorescência. **C e D.** Células isoladas e selecionadas para análise de cálcio durante o estímulo com KCl 50mM e ATP 1mM. **E.** Célula representante do grupo neural, mostrando comportamento pós estímulo com KCl. **F.** Célula isolada e selecionada com característica de célula da glia de schwann após estímulo com ATP. ($p=0.024$) Escala 50 μ M. $n=3$.

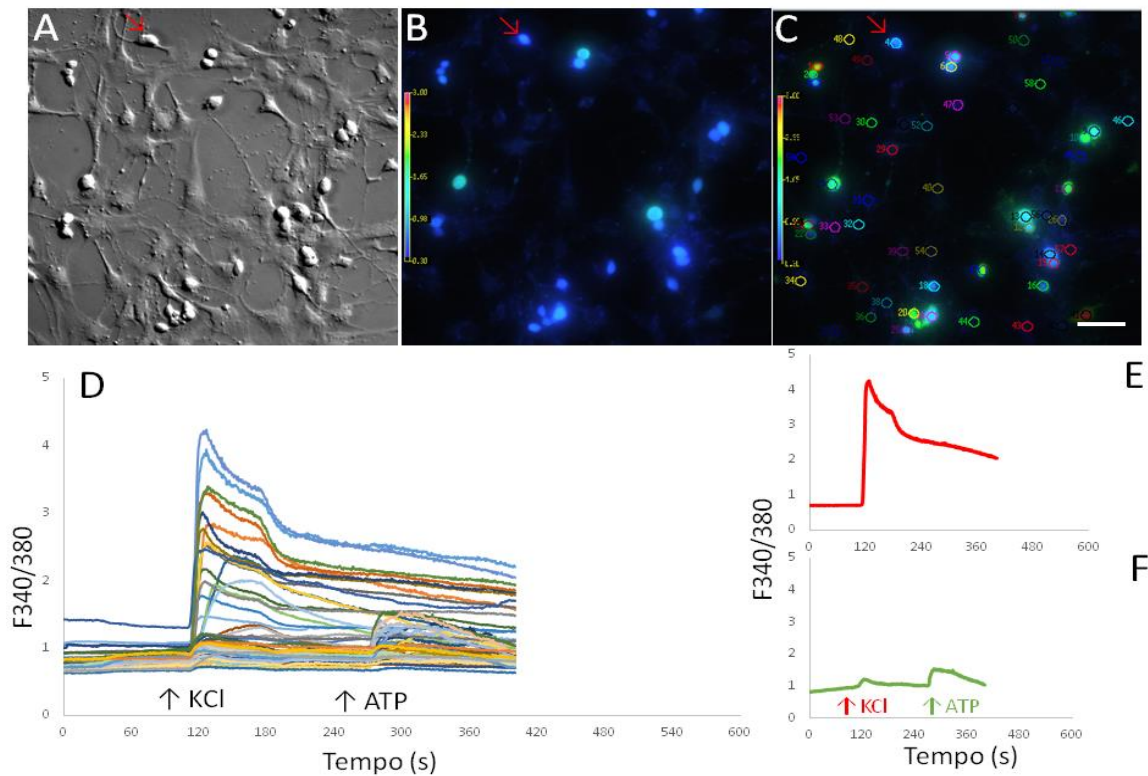


Figura 8.5. Análise de Cálcio intracelular através de FURA-2 em cultura enriquecida em neurônios, mantidas por 48h em **50 % de meio DMEM + 10% de FBS e 50% de meio condicionado de retina, tratadas com Ciclosporina A 10 μ M**. **A.** Neurônios mostrados em campo claro. **B.** Níveis basais de cálcio intracelular das culturas enriquecidas em neurônios incubados com FURA-2 visualizados por microscopia de Fluorescência. **C e D.** Células isoladas e selecionadas para análise de cálcio durante o estímulo com KCl 50mM e ATP 1mM. **E.** Célula representante do grupo neural, mostrando comportamento pós estímulo com KCl. **F.** Célula isolada e selecionada com característica de célula da glia de schwann após estímulo com ATP. ($p=0.0015$) Escala 50 μ M. $n=3$.

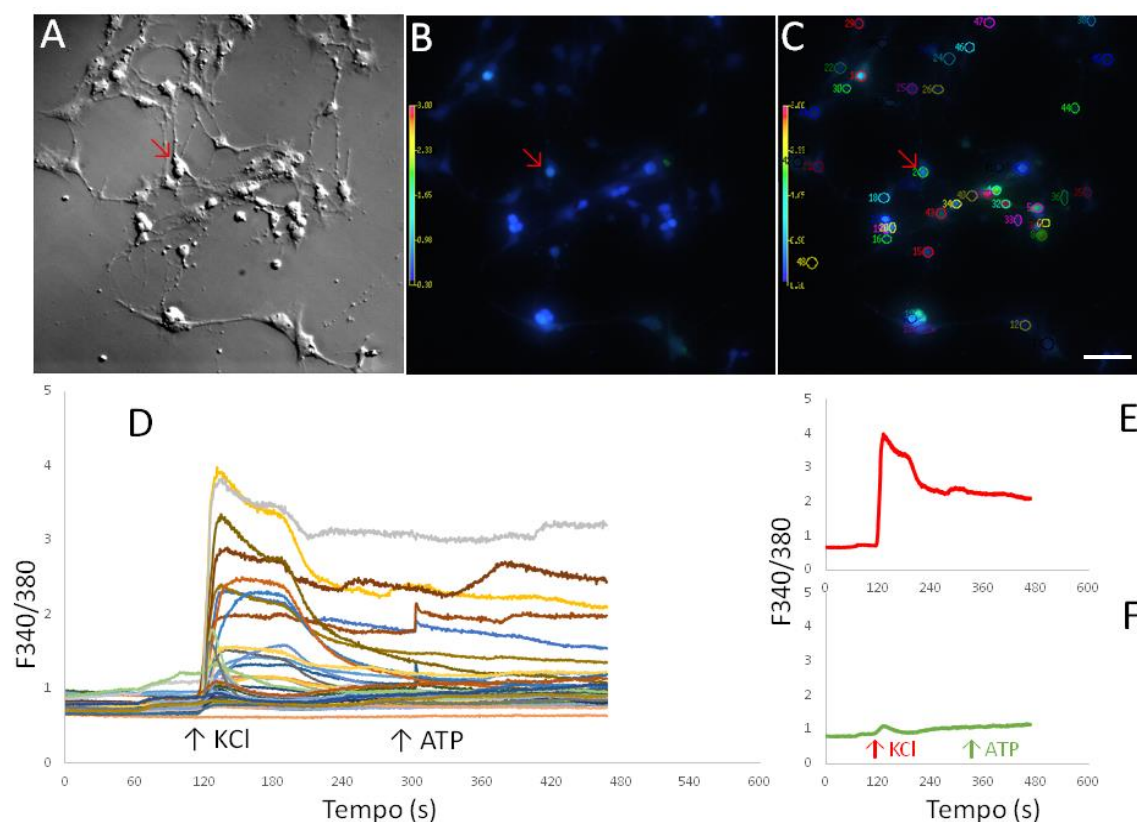


Figura 8.6. Análise de Cálcio intracelular através de FURA-2 em cultura enriquecida em neurônios, mantidas por 48h em **50 % de meio DMEM + 10% de FBS e 50% de meio condicionado de retina, tratadas com Ciclosporina A 40 μ M**. **A.** Neurônios mostrados em campo claro. **B.** Níveis basais de cálcio intracelular das culturas enriquecidas em neurônios incubados com FURA-2 visualizados por microscopia de Fluorescência. **C e D.** Células isoladas e selecionadas para análise de cálcio durante o estímulo com KCl 50mM e ATP 1mM. **E.** Célula representante do grupo neural, mostrando comportamento pós estímulo com KCl. **F.** Célula isolada e selecionada com característica de célula da glia de schwann após estímulo com ATP. Nota-se a perda do sinal intracelular de cálcio nesta célula, o que não significa que todas as células sofreram a mesma perda. ($p=0.0624$) Escala 50 μ M. $n=3$.

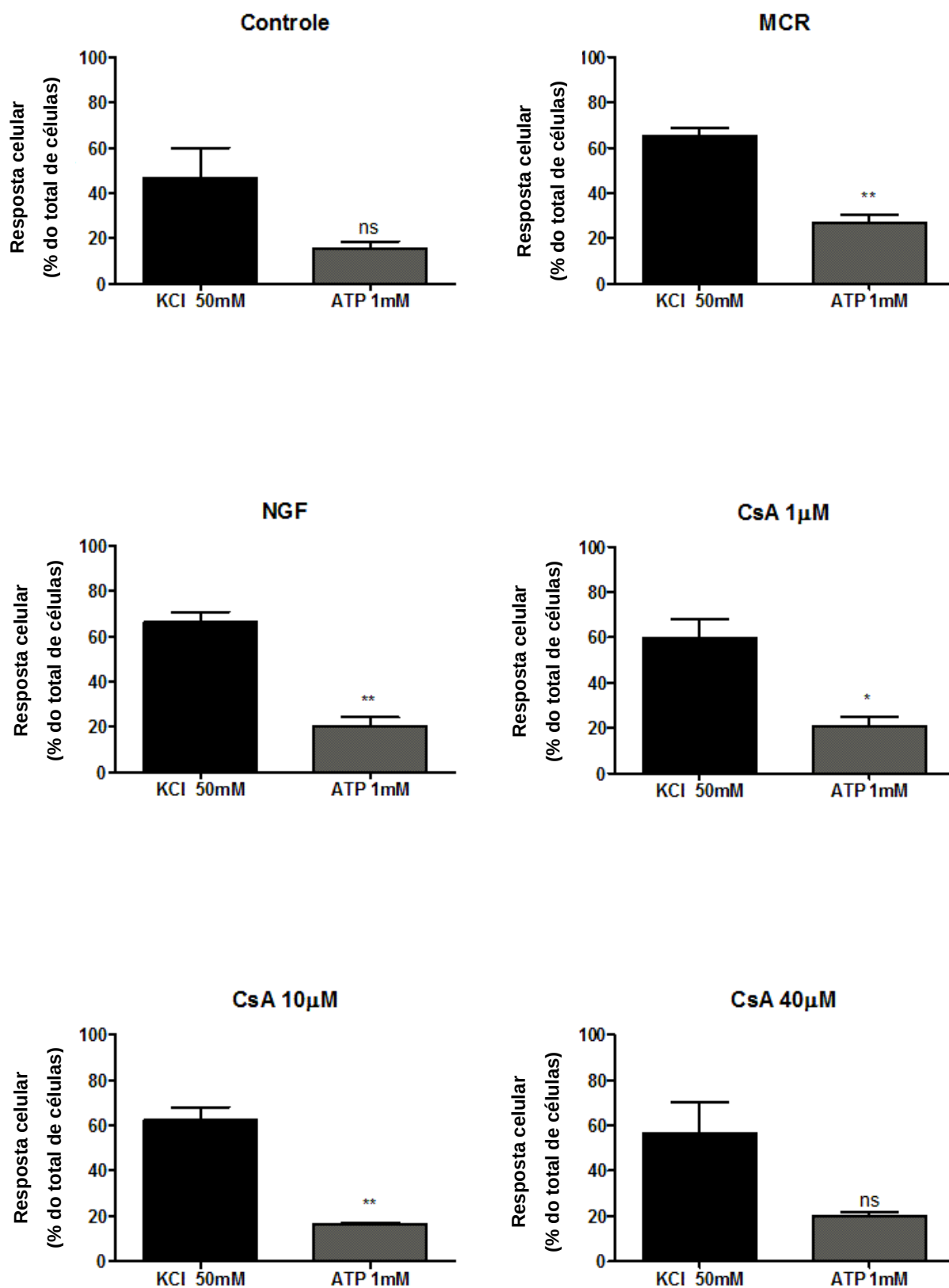


Figura 8.7. Maior concentração de Cálcio em células estimuladas com KCl. Análise estatística a partir da proporção do estímulo de aumento de cálcio intracelular em culturas enriquecidas de neurônios. Nota-se que há grande número de células com resposta ao estímulo de KCl, que caracteriza as células como neurônios. Análise feita através do teste T de student, valor significativo de $p \leq 0.05$.

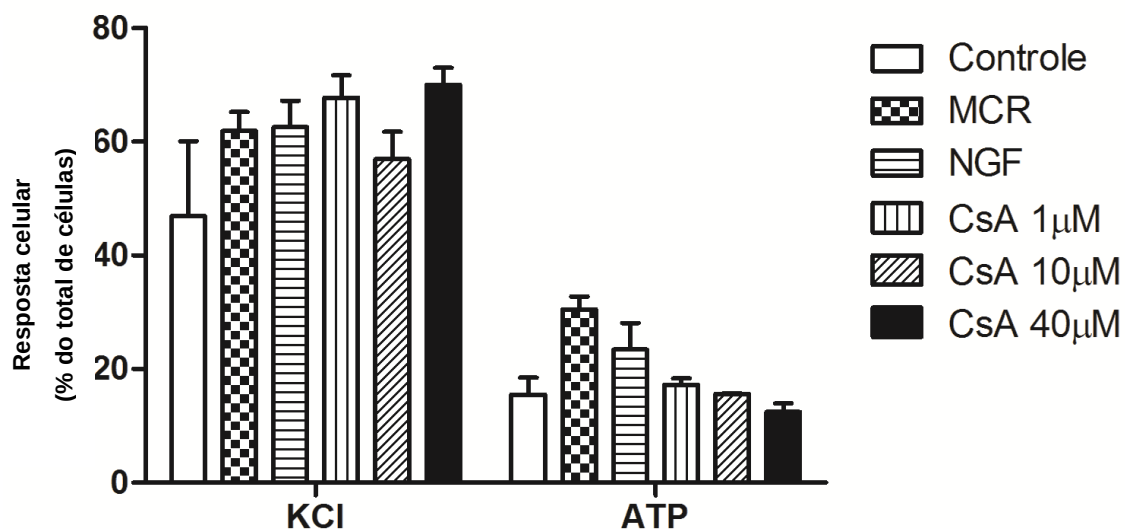


Figura 8.8. Concentração de Cálcio intracelular. Comparação entre os grupos, mostrando maior acúmulo de $[Ca^{2+}]_i$ em células estimuladas por KCl, características de células neurais. Análise feita através do teste ANOVA dois critérios.

4.3. VIABILIDADE DE CÉLULAS NEURAIS E DA GLIA DE SCHWANN APÓS TRATAMENTO COM A CICLOSPORINA A

A viabilidade celular foi testada em culturas de células enriquecidas com neurônios ou glia de schwann mantidas nas condições já citadas (Item 3.6. Página 24).

O uso da Ciclosporina A nas diferentes concentrações demonstrou diferença significativa na viabilidade dos grupos Controle FBS e os grupos tratados (Figura 9). Muito pelo contrario, o uso da ciclosporina parece aumentar a viabilidade das células, tanto em células gliais como em neurônios. Chama atenção a diferença entre o grupo MCR e tratados, em ambas as populações, já que recebem o mesmo meio de enriquecimento, mudando apenas o tratamento com a droga.

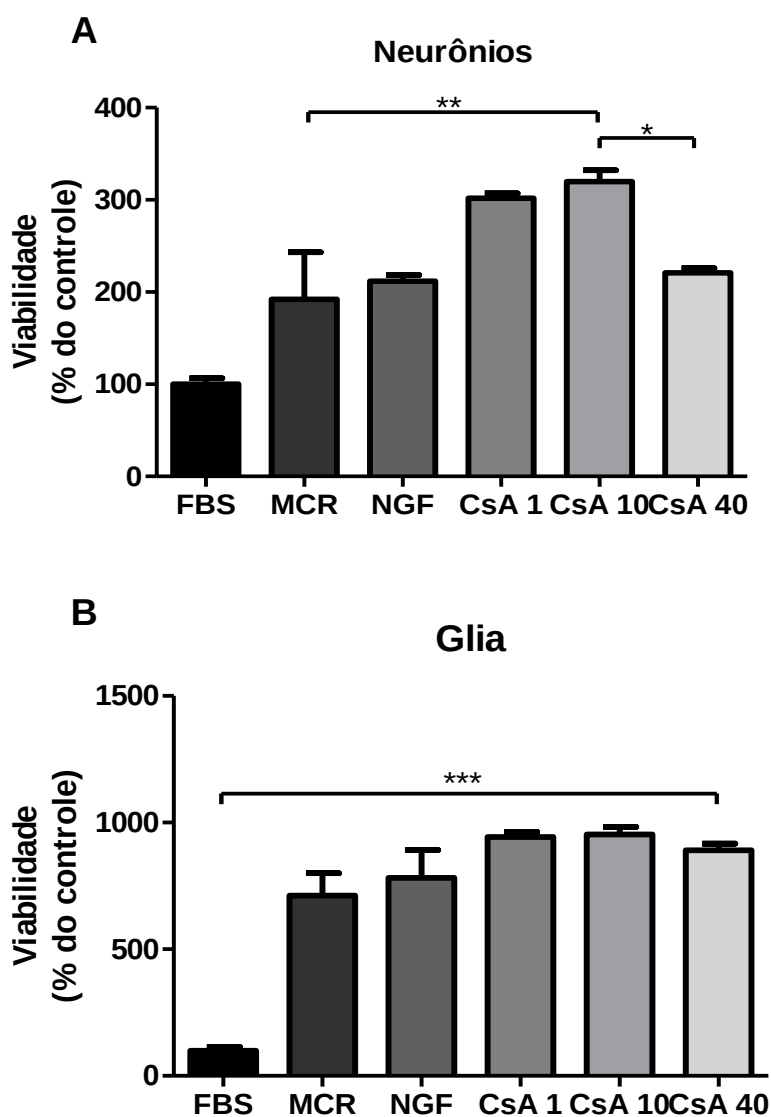


Figura 9: Viabilidade celular após tratamento com CsA. Culturas enriquecidas de Neurônios periféricos (A) ou Glia de Schwann (B) após 48h de tratamento com a CsA. Análise da viabilidade executada pelo teste ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey. Estatisticamente houve diferença entre o CTL FBS e todos os outros grupos em cultura enriquecida em neurônios. Em cultura enriquecida em células da glia, houve diferença entre o grupo FBS e os grupos tratados (valor de $p < 0.05$)** e entre o grupo FBS e MCR e o grupo tratado com a CsA em todas as concentrações. (n=3).

4.4. AÇÃO DA CICLOSPORINA A NA FORMAÇÃO DA CIRCUITARIA NEURAL EM CULTURAS ENRIQUECIDAS DE NEURÔNIOS.

Para verificar a ação da Ciclosporina A na formação da circuitaria de neurônios, os gânglios da raiz dorsal de embriões de galinha foram dissociados e as culturas enriquecidas em neurônios foram isolados e cultivados por 48hrs, utilizando grupos controle 100% DMEM + 10% FBS, 100% meio condicionado de retina, NGF 50ng/ml, e na presença de de Ciclosporina A nas concentrações de 1, 10 e 40 μ M (Figura 10).

Como esperado, nota-se grande quantidade de células mortas e grande diminuição de neuritos na cultura quando as células foram mantidas somente em condições controles com 100% DMEM + 10% FBS (Figura 10A). Em neurônios mantidos em fatores tróficos, nota-se desenvolvimento de neuritos e grande quantidade de células neurais (Figura 10B e C). Nas culturas tratadas com a concentração de 1 μ M de Ciclosporina, notamos aumento do número de células e ligações axonais (Figura 10D). O aumento da concentração, quando usado 10 μ M, já há diminuição da quantidade de células e de neuritos, comparado à menor concentração da droga (Figura 10E). Finalmente, quando tratados com a concentração de 40 μ M de Ciclosporina A, há notável redução do numero de neuritos e conexão entre os axônios (Figura 10F).

A figura 11A mostra o grupo 50% DMEM+10% FBS + 50% Meio condicionado (condição alternativo de crescimento dos neurônios, comparado ao NGF) em comparação ao grupo tratado com 40 μ M de Ciclosporina A. Nota-se repetida diminuição do padrão de crescimento dos neuritos (11B), causada pelo uso da droga.

Através do padrão de desenvolvimento e sobrevivência do grupo mantido apenas com DMEM + 10% FBS, comprovou-se a necessidade do uso de fatores de enriquecimento do meio de manutenção das células neurais, tendo em vista a fragilidade do citado tipo celular.

Utilizamos o Meio condicionado de Retina como estratégia alternativa para o uso do NGF, já que o meio condicionado de retina é rico em fatores tróficos como o NGF e outras neurotrofinas. Os resultados indicaram crescimento similar, assim como a manutenção do desenvolvimento e o consequente efeito positivo do uso do meio condicionado, que foi mantido na substituição do NGF comercial nas culturas tratadas com a Ciclosporina A (Figuras 10B,D,E e F e 11B).

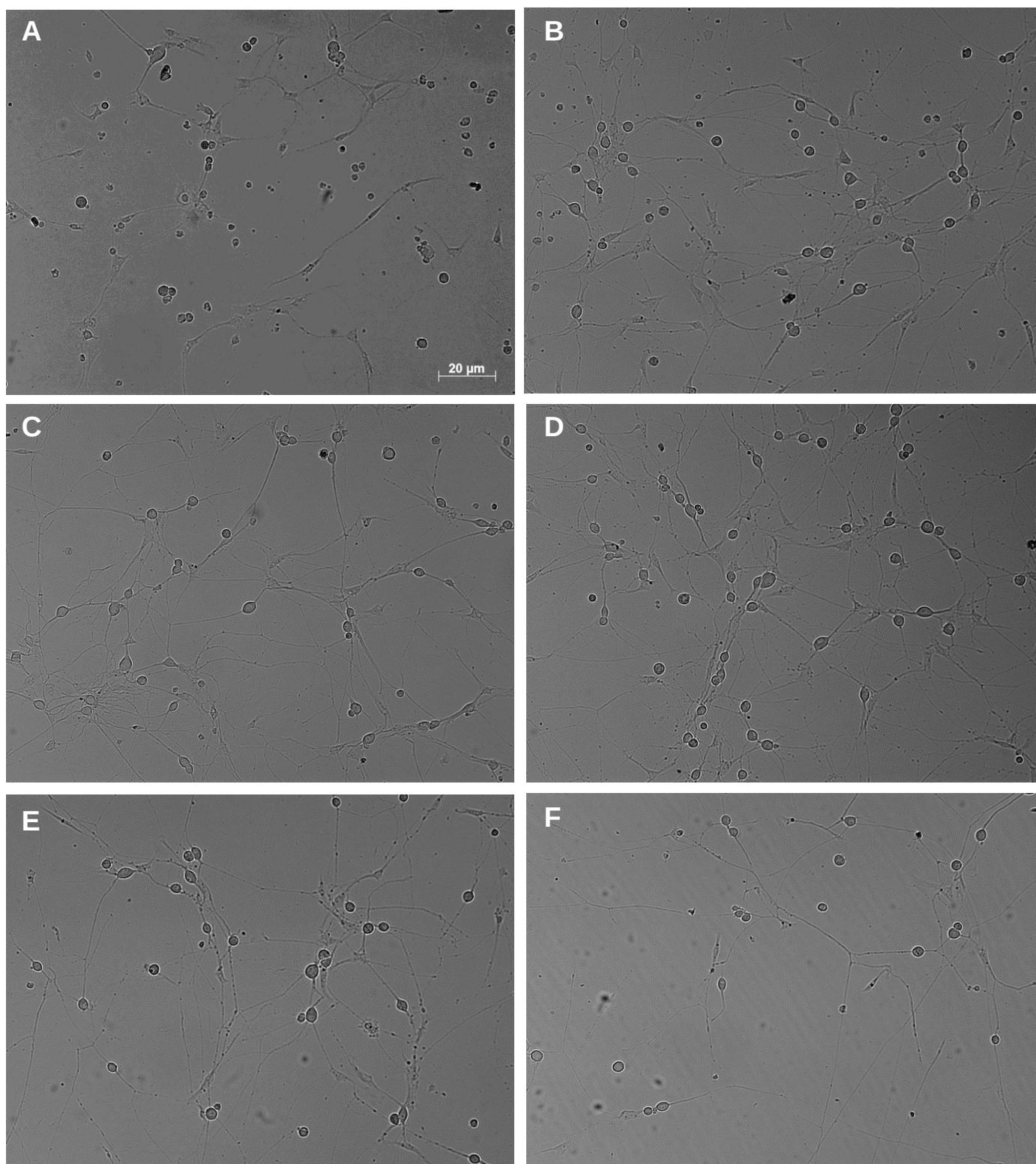


Figura 10: Culturas enriquecidas em neurônios do gânglio da raiz dorsal de embrião de galinha. A: Cultura mantida apenas em meio DMEM + 10%FBS. **B:** Células mantidas em 100% de meio condicionado de Retina (MCR). **C.** Células mantidas em DMEM + 10%FBS suplementadas com 50ng/ml de NGF. **D,E e F:** Culturas mantidas com 50% MCR e tratadas com Ciclosporina A nas concentrações de 1, 10 e 40µM respectivamente. Microscópio óptico. Aumento 20x.

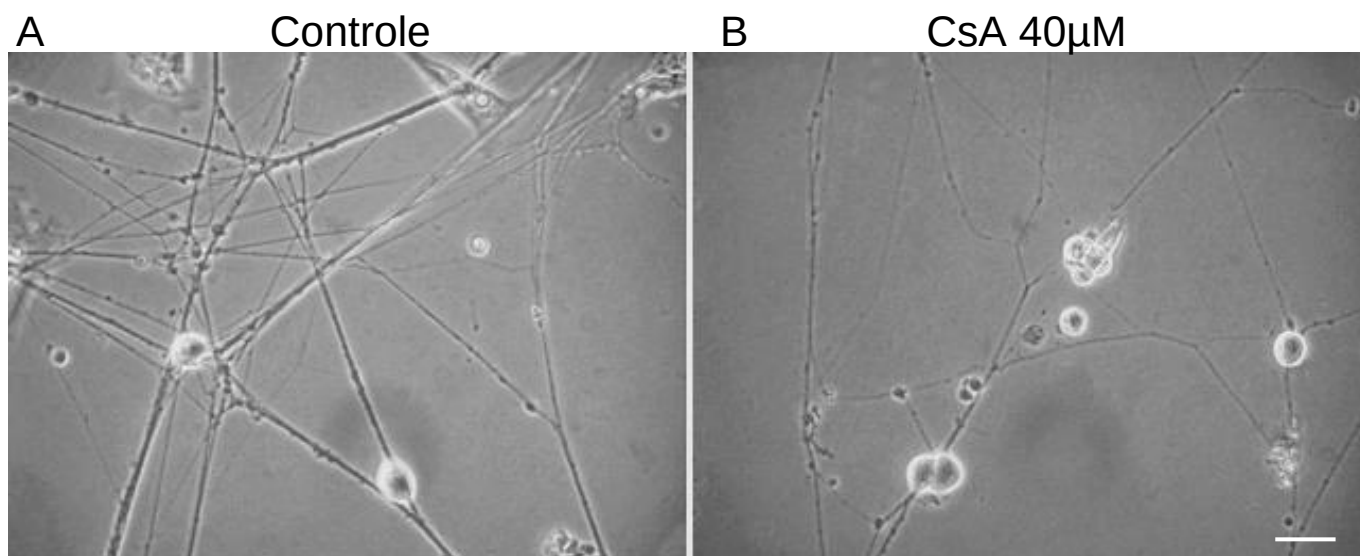


Figura 11: Ciclosporina A interferindo na circuitaria de neurônios. **A.** Células mantidas em DMEM com 10% SFB e Meio Condicionado de retina (1:1) na ausência (Controle) ou **B.** presença de Ciclosporina A 40µM. Aumento 40X.

4.5. EXPRESSÃO DE NGF, TrkA e NFAT5 INDUZIDO POR CICLOSPORINA A

Buscou-se avaliar alterações no padrão de expressão da neurotrofina (NGF) e de seu receptor de alta afinidade (TrkA) por técnica de RT-PCR, estando o NGF e consequentemente seu receptor diretamente relacionado com a sobrevivência neuronal. Após tratamento com 40µM de Ciclosporina A, culturas mistas provenientes de GRD mostraram um aumento na expressão de NGF (263 pb) e TrkA (244 pb) (figura 12).

No entanto, a expressão de NGF apresentou amplificação inesperada na ausência de transcriptase reversa-RT, sugerindo possível contaminação por DNA genômico. Devido a amplificação não esperada de NGF que dificulta a análise visual do aumento da expressão, utilizamos o programa ImageJ 1.6.0 para quantificar o padrão de expressão de NGF, TrkA e GAPDH, subtraindo a área equivalente às amplificações específicas (RT+) das inespecíficas (RT-).

Os resultados expressos na figura 13 confirmam que 40 µM de Ciclosporina A induziu aumento da expressão de NGF e TrkA, de 2 e 5 vezes

respectivamente, quando comparados com os valores sem tratamento com Ciclosporina A.

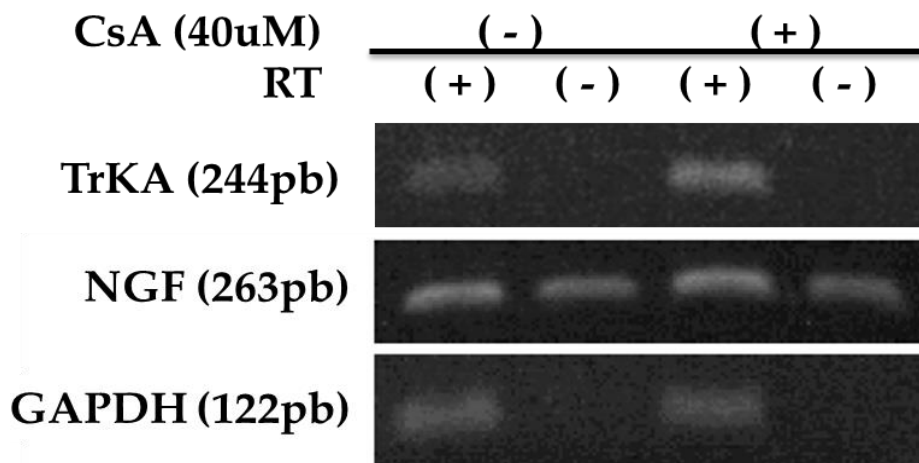


Figura 12: Ciclosporina A induz expressão de NGF. Expressão de TrkA (244 pb), NGF (263 pb) e GAPDH (122 pb, controle interno) por RT-PCR, com e sem Transcriptase Reversa (RT (+); RT (-)) em amostras de mRNA oriundas de cultura mista (neurônios e células da glia) na ausência ou presença de Ciclosporina A (40μM).

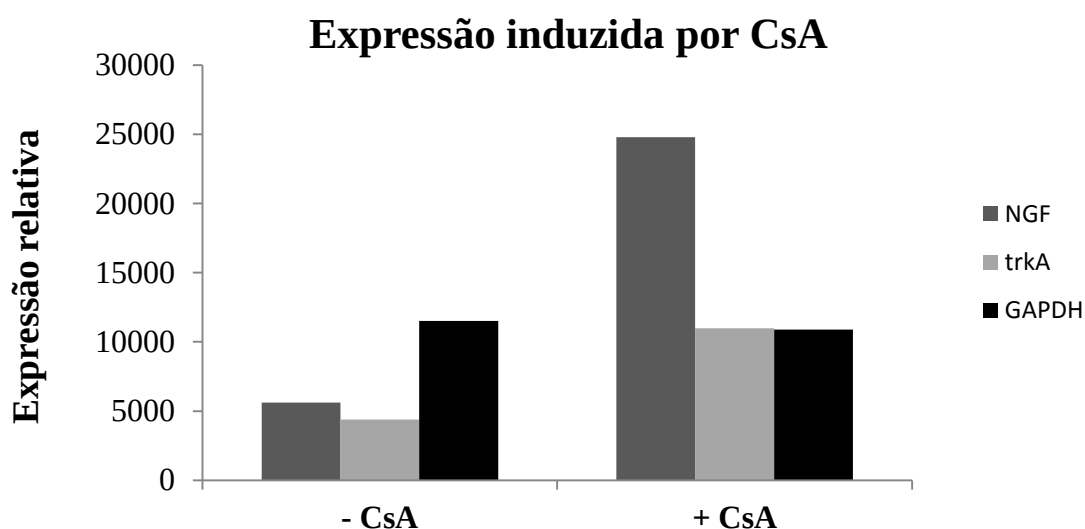


Figura 13: Quantificação da expressão de TrkA, NGF e GAPDH: A quantificação em unidades arbitrárias do padrão de bandas demonstradas na figura 10 foi obtida com a utilização do programa ImageJ 1.6.0. A quantificação da intensidade das bandas com Transcriptase Reversa (RT) foi subtraída da amplificação inespecífica (sem RT) para melhor avaliação da real expressão de NGF e GAPDH após tratamento com 40μM de Ciclosporina A.

Na expressão de mRNA de NFAT5 (270 pb), os resultados demonstram uma diminuição da expressão em culturas em que predominam células gliais tratadas com a droga na concentração de 40 μ M de Ciclosporina A, quando compara ao controle. Dessa forma, podemos dizer que Ciclosporina A regula a expressão de NFAT5 nessa população de células (Figura 14).

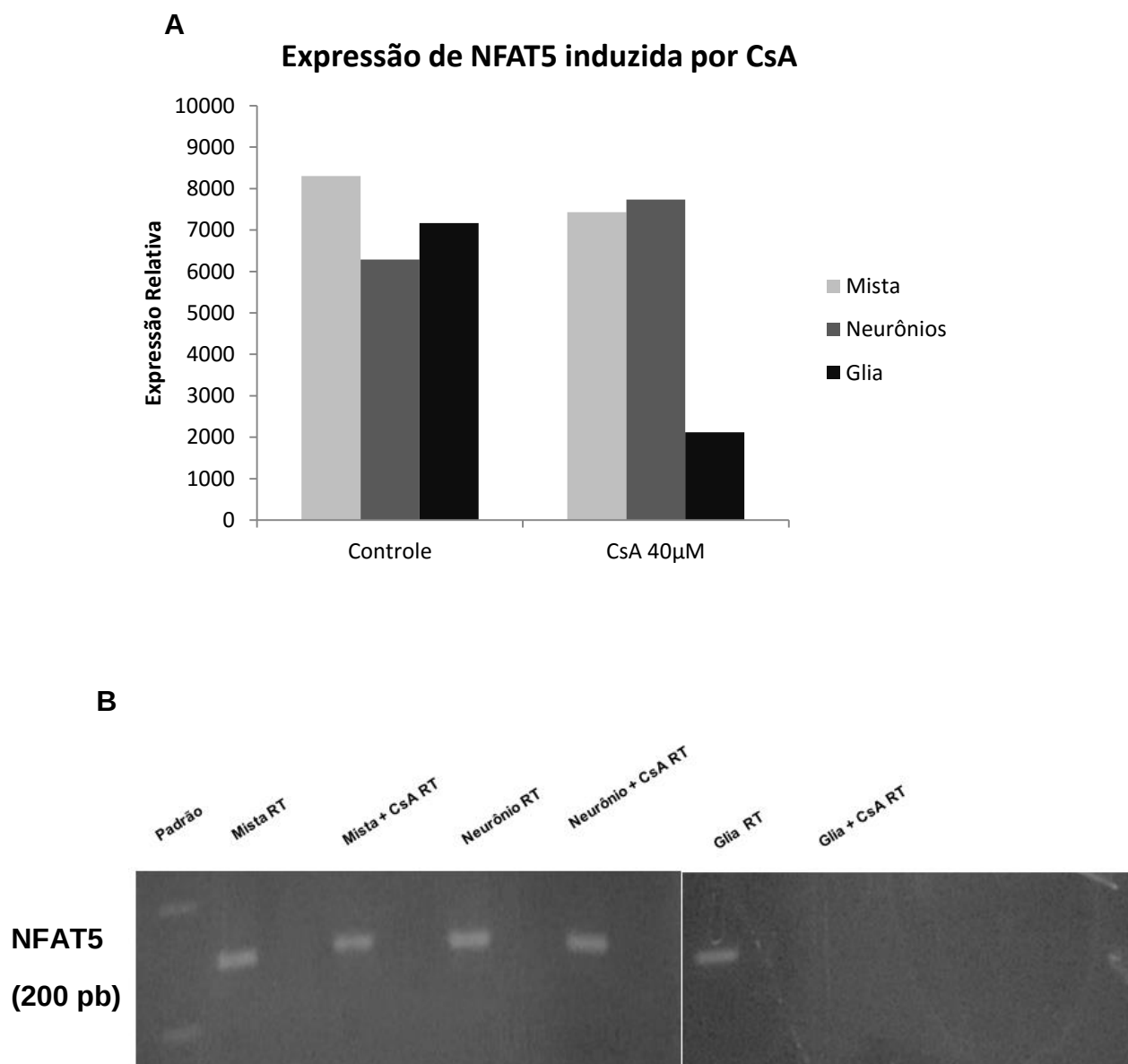


Figura 14: Expressão de NFAT5 em células do SNP. **A.**Quantificação da expressão de NFAT5 em culturas mistas, predominantemente células neurais ou gliais, tratadas ou não com a Ciclosporina A 40 μ M.**B.** Gel mostrando as bandas a partir do RT-PCR. Obtida através do programa ImageJ 1.6.0.

4.6. AVALIAÇÃO DE TrkA EM NEURÔNIOS

Fizemos, através da Imunofluorescência, marcação para receptores Tirosino Cinase A (TrkA), receptor específico para NGF, afim de determinar se há, juntamente com o aumento do NGF, aumento também do seu receptor, nas concentrações de 1 e 10 μ M de Ciclosporina A, além da concentração de 40 μ M, cujo aumento já foi mostrado na figura 13 através da técnica de RT-PCR.

Após 48h de tratamento com a Ciclosporina A e os fatores neurotróficos, fizemos a co-marcação através da técnica de imunofluorescencia, onde foi utilizado anticorpo anti-neurofilamento (exclusivo para neurônios) e anticorpos anti-TrkA, podemos notar que há concentração do receptor apenas em células neurais (neurônios representado pelas setas), e que há notória quantidade de receptor em células tratadas com 100% de meio condicionado de retina, em relação aos outros tratamentos, inclusive comparada às células tratadas com NGF, considerado padrão para desenvolvimento do sistema nervoso periférico.

Mostramos que a cultura mantida em 100% de DMEM + 10% FBS não demonstrou receptores em sua superfície, corroborando a debilidade da cultura, já que na ausência do NGF, há uma regulação negativa de seu receptor.

Nas culturas tratadas com a Ciclosporina em todas as concentrações, houve uma constante presença do receptor, onde os níveis se mantiveram aparentemente estáveis, comparando às células mantidas com fatores de crescimento.

Esses dados corroboram resultados anteriores, onde há grande quantidade de receptor TrkA em células tratadas com a Ciclosporina A (inclusive na concetração de 40 μ M).

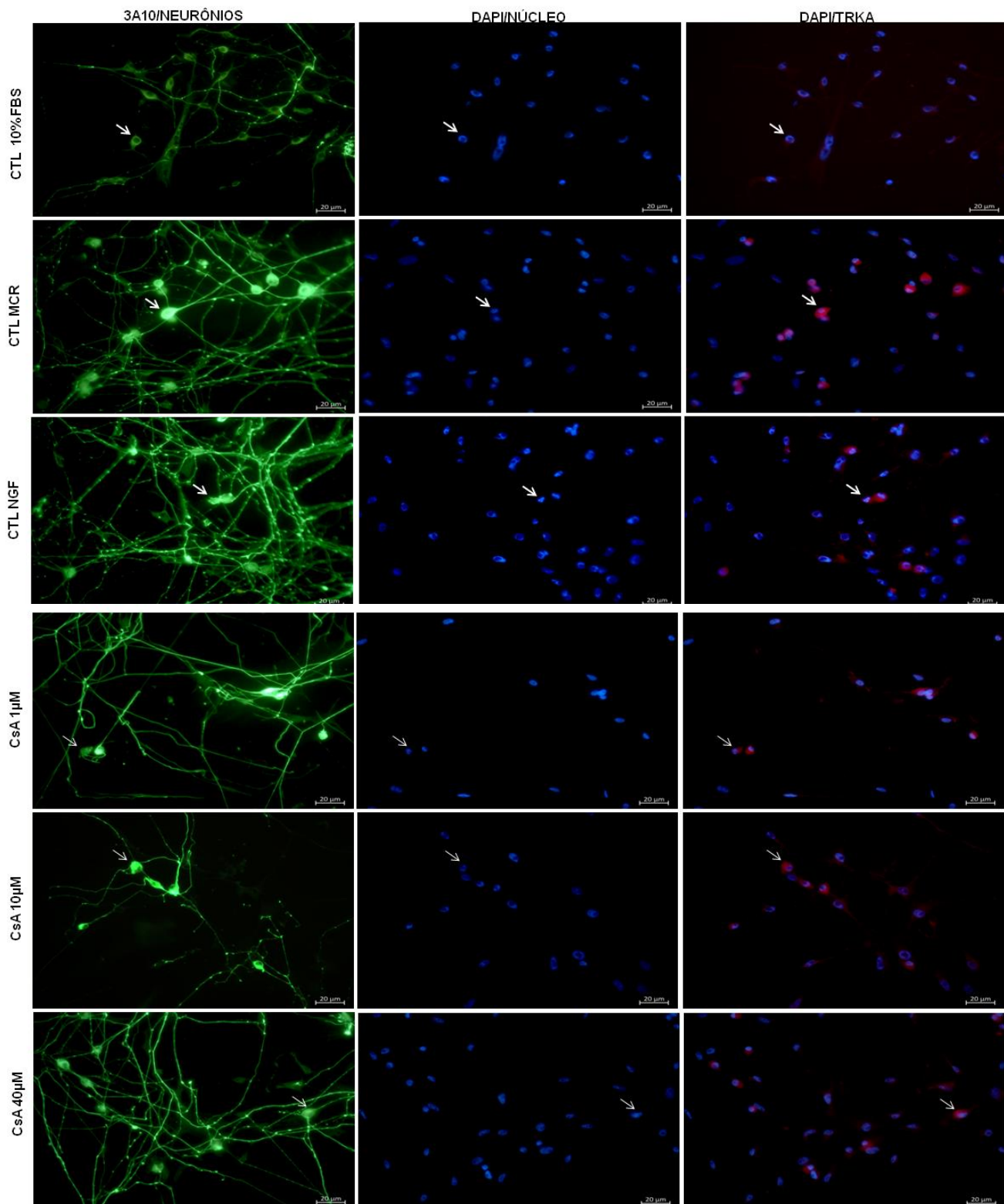


Figura 15: Imunofluorescência para TrkA: Co-marcação para neurofilamento encontrado caracteristicamente em neurônios (em verde) e receptores tirosino-cinase A (TrkA em vermelho). O núcleo celular foi marcado com DAPI (azul). As setas evidenciam células neurais. Microscópio de Fluorescência – Zeiss/Zen Blue. Aumento 40X.

4.7. CICLOSPORINA A MODULA A EXPRESSÃO DE NGF EM CULTURAS MISTAS

O tratamento com 40 μ M de Ciclosporina A induz inibição da formação de neuritos em neurônios isolados (figura 11), dessa forma, sugere-se que células da Glia possam apresentar efeito protetor ao neurônio durante o tratamento com a droga. Um dos mecanismos de proteção glial pode ser dependente da secreção de neurotrofinas. Para testar esta hipótese, culturas mistas de neurônios e células gliais foram tratadas com 40 μ M de Ciclosporina A e o NGF intracelular foi analisado por imunofluorescência.

Nota-se na figura 16, que as culturas mistas sem tratamento com Ciclosporina A (controle) apresentam células neuronais com reduzida projeção dendrítica e pouco ou nenhum acúmulo de NGF vesicular. Por outro lado, o tratamento com 40 μ M de Ciclosporina A promoveu significativa formação dendrítica e acúmulo vacuolar de NGF na região perinuclear. Estes resultados corroboram com nossa hipótese, indicando ação protetora oriunda da célula da glia durante o tratamento com Ciclosporina A, estimulando a secreção de neurotrofinas e presença de receptores, como o NGF e o TrkA, que podem promover a diferenciação neural.

De acordo com resultados anteriores obtidos, as células neurais do gânglio da raiz dorsal sofrem influência quando expostas ao tratamento com a Ciclosporina A, tendo os neurônios um visível decaimento das suas projeções axonais, assim como uma retração aparente do corpo celular.

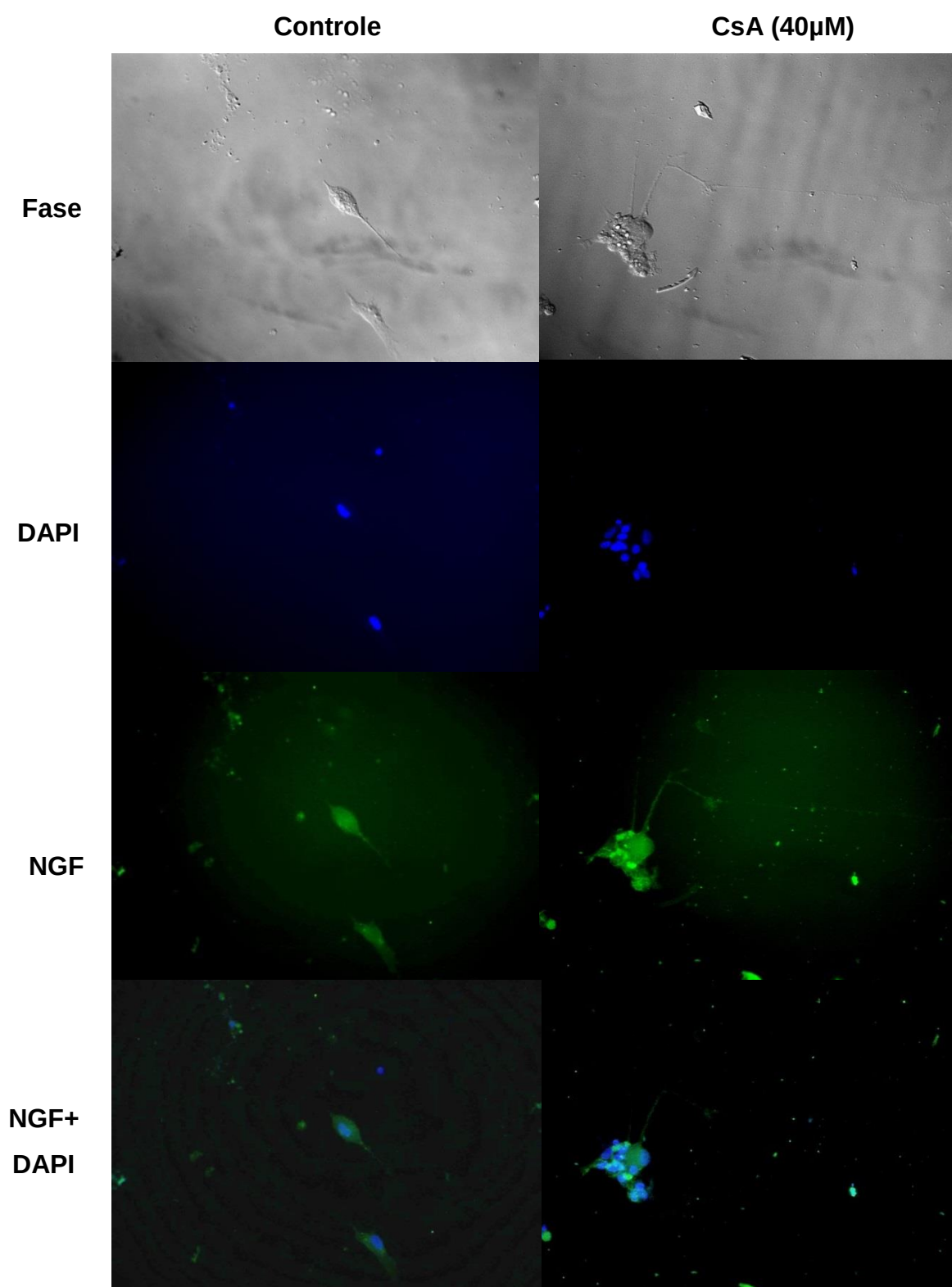


Figura 16: CsA induzindo acúmulo de NGF em culturas mistas: As células foram mantidas em DMEM com 10% SFB e Meio Condicionado de Retina (2:1) na ausência ou presença de 40µM de CsA. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul) e o NGF com anticorpos anti-NGF, seguido da marcação com o anticorpo secundário anti-igG de camundongo conjugado com Alexa-Fluor (verde). Nota-se a concentração de NGF próximo dos núcleos das células tratadas com CsA. Microscópio confocal (LSM 5 Pascal, Zeiss). Aumento 40X.

5. DISCUSSÃO

A Ciclosporina A é um imunossupressor com mecanismo de ação bem conhecido em células do sistema imune, mais precisamente em linfócitos T, promovendo inibição de NFATc, importante fator de transcrição que sofre desfosforilação induzida pela formação do complexo Cálcio - Calmodulina-Calcineurina. O imunossupressor inibe a formação do complexo, impossibilitando a ativação de NFAT.

A ação da Ciclosporina A ocorre a partir da formação de um complexo na região interna da membrana plasmática, logo após a ligação do NGF ao seu receptor citoplasmático. A Ciclosporina bloqueia a formação do complexo cálcio/calcineurina e impede a produção de neurotrofinas como NFAT, regulando negativamente a secreção de NGF(DAVIDSON et al., 2004; HUNT et al., 2010; LEE et al., 2011; PAPERS; CRABTREE, 2000; WERNECK et al., 2012). Assim, as imagens mostram a ação da Ciclosporina A sob a formação da circuitaria de neurônios nociceptivos, que são dependentes de NGF.

Recentes estudos tem demonstrado o papel da Ciclosporina A em órgãos e tecidos que não participam diretamente no mecanismo de proteção imune (CHANG; JOHNSON, 2002; HERNÁNDEZ et al., 2001; THOMSON; WEBSTER, 1988; VIZZA et al., 2013; WERNECK et al., 2012), sugerindo mecanismos alternativos pelos quais esse medicamento pode favorecer efeitos diversos dos popularmente conhecidos. Dentre esses efeitos, está a ação da Ciclosporina A em células do Sistema Nervoso Periférico (SNP). Células neurais também expressam NFAT, e participam dos processos fisiológicos da regulação neural.

Em trabalho anterior publicado pelo grupo, o uso da Ciclosporina A em pacientes com hanseníase, em estágios reacionais crônicos da doença em decorrência da resistência aos corticóides padrões, apresentou inibição da secreção de auto-anticorpos contra o NGF, que contribui para a neuropatia periférica da doença. A redução da secreção desses autoanticorpos (anti-NGF) foi acompanhada pelo término dos estágios reacionais da doença, com controle

das neurites e das dores neurais, responsáveis pelas sequelas neuropáticas, promoveram melhora sensorial e motora nesses pacientes (SENA et al., 2006). Estes efeitos sugerem papel importante da Ciclosporina A na plasticidade e no controle da dor neural periférica.

A partir da dose usada na clínica de 5mg/Kg, foi feito o cálculo que resultou em uma concentração final de 81 μ M de Ciclosporina A no líquido cérebro-espinhal de pacientes tratados com a dose citada (BROPHY et al., 2013). Em nosso trabalho avaliamos a ação da Ciclosporina A na concentração mínima de 1 μ M e na máxima, metade da dose clínica utilizada, 40 μ M.

Nossos resultados mostraram que concentrações de 10 – 40 μ M não interferem diretamente na neuritogênese das células dos Gânglios da Raiz Dorsal (GRD) de embriões de galinha (Figura 5). Através da dissociação celular, obtivemos culturas enriquecidas em neurônios periféricos ou em glias de schwann, onde foi feita a análise fisiológica através do imageamento de cálcio, onde as células são estimuladas com KCl ou ATP.

As células estimuladas com KCl são indicativas de células neurais, já o ATP estimula células gliais, através de receptores P2Y, encontrados nessa população celular (COTRINA et al., 2000; JAMES; BUTT, 2001). Constatamos através da estatística e dos gráficos de comportamento fisiológico das células (Figura 8), que houve êxito no processo de enriquecimento com neurônios da cultura, tendo assim culturas mais homogêneas e com respostas mais precisas, imprescindível para a pergunta experimental do trabalho.

Além da dissociação celular, notamos a progressiva perda da atividade fisiológica representada pelo cálcio conforme o aumento da concentração de tratamento com a Ciclosporina A, de forma que no tratamento com 40 μ M não houve resposta ao estímulo com ATP.

Diante da dúvida se haveria morte celular tanto em neurônio e mais acentuadamente em células de schwann, realizamos o teste de viabilidade celular, onde não houve diferença significativa entre os grupos tratados, contrariamente, havendo aumento da viabilidade de células tratadas com a

Ciclosporina A em células da glia, assim como um aumento da viabilidade em células neurais e gliais (Figura 9).

Fizemos tratamento com as concentrações de 1, 10 e 40 μ M em culturas enriquecidas em neurônios (Figura 10). Foi feito também um controle negativo, apenas com DMEM +10% FBS. Sabe-se que os neurônios periféricos necessitam de fatores neurotróficos para completo desenvolvimento e manutenção da sobrevivência. O controle com fatores neurotróficos foi testado também através do uso de 100% de meio condicionado de retina, que é rico em NGF e outras neurotrofinas, e o próprio NGF, na concentração padrão utilizada de 50ng/ml.

Observamos que não há diferença na sobrevivência entre os tratamentos com meio condicionado ou NGF. Em posse desse dado, optamos por fazer a suplementação das culturas tratadas com Ciclosporina A com o meio condicionado de retina, barateando o processo, no entanto garantindo o mesmo padrão de desenvolvimento das células neurais.

Nas culturas tratadas analisadas em microscópio de campo claro, notou-se pouco desenvolvimento no controle FBS, devido à falta de fatores tróficos. MCR e NGF mostraram padrão similar de desenvolvimento. Já nas culturas tratadas com a Ciclosporina A verificamos bom padrão de desenvolvimento e de formação de neurites nas concentrações de 1 e 10 μ M.

Já na concentração de 40 μ M, esse padrão foi diminuído. Este dado sugere mecanismos dependentes da ativação de NFAT durante o processo de maturação e diferenciação de neurônios, uma vez que este fator de transcrição é dependente de Calcineurina, afetada pela ciclosporina neste processo.

É conhecido que a estimulação promovida por neurotrofinas, como o NGF, em tecidos do SNP apresenta mecanismos que dependem de NFAT, contribuindo para a regulação da expressão de receptores nociceptivos na superfície celular (GROTH et al., 2007). Dessa forma, o crescimento e a manutenção de neurônios pode ser regulada com a utilização de inibidores de NFAT, como a Ciclosporina A.

Através do método de RT-PCR, culturas mistas tiveram seu mRNA amplificado para os primers de GAPDH, NGF e TrkA. Confirmamos que 40 μ M de Ciclosporina A induz aumento da expressão de NGF com relação ao controle, e que este efeito é acompanhado pelo aumento da expressão de seu receptor de alta afinidade (TrkA), que foi mantido após o tratamento nas concentrações de 1 e 10 μ M de Ciclosporina A, visualizado na imagem de imunofluorescência usando anticorpos anti-TrkA (Figura 15).

Já foi descrita a participação de NFAT5 em células da córnea promovendo a secreção de NGF (LEE et al., 2011). NFAT5 é uma fosfatase-3B que independe de calcineurina. NFAT5 mostrou estar ativa em cultura de células da córnea na presença de 5 μ M de Ciclosporina A, promovendo a migração do fator de transcrição para o núcleo e favorecendo a secreção de NGF por mecanismos ainda não esclarecidos. Este efeito foi relacionado com o sucesso do imunossupressor em pós-transplantados de córnea.

Foi feita a análise da expressão de NFAT5 em células enriquecidas em neurônios periféricos, glia de schwann e mistas, quando temos ambas as populações celulares na mesma cultura. A figura 14 mostra que há aumento da expressão de NFAT5 em culturas enriquecidas com neurônios quando tratadas com 40 μ M de Ciclosporina A, e inversamente, diminuição da expressão em células da glia de schwann.

O tratamento com 40 μ M de Ciclosporina A durante a diferenciação *in vitro* de células mistas (neurônios e glia) provenientes do gânglio da raiz dorsal, mostrou acúmulo de NGF vesicular com consequente diferenciação neural (figura 16). Este acúmulo de NGF promovendo diferenciação neural, sugere mecanismo de ação alternativo para a Ciclosporina A que possa não depender da inibição da calcineurina. Podemos inferir que há aumento da atividade da via independente de Calcineurina (NFAT5) em neurônios após o estímulo com 40 μ M de Ciclosporina A.

Estes dados favorecem a hipótese para mecanismos de ação alternativos que a Ciclosporina A pode apresentar no interior de células distintas. A ativação de diferentes NFATs, dependentes ou não de calcineurina, tem demonstrado participação ativa na fisiologia do SNP e o uso de drogas que

favoreçam o controle desse fator de transcrição viabiliza o emprego de fármacos como a Ciclosporina A, que parecem regular a secreção de NGF TrkA.

Dessa forma, os resultados do trabalho reforçam a hipótese de mecanismos de ação distintos para a Ciclosporina A. O mecanismo neuroprotetor e possível indutor de plasticidade neural demonstrou estar associado à um mecanismo independente de Calcineurina em neurônios, podendo ser dependente de NFAT5 em neurônios, assim como em células da córnea em humanos. No entanto, a sobrevivência do neurônio, assim como a formação de neuritos são dependentes da atividade da célula glial, favorecendo a secreção de NGF por mecanismos dependentes de calcineurina.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, inferimos a influência positiva da Ciclosporina A na expressão de NGF e seu receptor específico TrkA. Observamos também acúmulo de NGF em culturas mistas e também de seu receptor em culturas enriquecidas com neuronios.

Os níveis de expressão do fator de transcrição (NFAT5) parecem diminuir após tratamento com Ciclosporina A em células da glia de Schwann. Esse dado é interessante, pois não foi demonstrado ainda a expressão desse fator em células gliais sendo, portanto, este processo dependente de calcineurina.

Esse dados favorecem a hipótese de que Ciclosporina A também pode ser neuromodulador, contribuindo para a plasticidade de neurônios periféricos, com aumento da expressão de NGF e TrkA que são essenciais para a fisiologia neural.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGASSE, F. et al. Neuropeptide Y Promotes Neurogenesis in Murine Subventricular Zone. **Stem Cells**, v. 26, p. 1636–1645, 2008.
- ALOE, L. Rita Levi-Montalcini : the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology q. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 7, p. 395–399, 2004.
- ARAMBURU, J.; HEITMAN, J.; CRABTREE, G. R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. **EMBO reports**, v. 5, n. 4, p. 343–348, 2004.
- BARBACID, M. Neurotrophic factors and their receptors. **Current Cell biology**, v. 7, p. 148–155, 1995.
- BROPHY, G. M. et al. Exposure of Cyclosporin A in Whole Blood , Cerebral Spinal Fluid , and Brain Extracellular Fluid Dialysate in Adults with Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 1489, p. 1484–1489, 2013.
- CABRAL DA SILVA, M. E C. **A Glia de Müller como fonte de Fatores Tróficos para Neurônios**Rio de Janeiro, 2007.
- CHANG, L. K.; JOHNSON, E. M. Cyclosporin A inhibits caspase-independent death of NGF-deprived sympathetic neurons: A potential role for mitochondrial permeability transition. **Journal of Cell Biology**, v. 157, n. 5, p. 771–781, 2002.
- CHEN, B. et al. Syntaxin 8 modulates the post-synthetic trafficking of the TrkA receptor and inflammatory pain transmission. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 28, p. 19556–19569, 2014.
- COHEN, S.; GREENBERG, M. E. Communication Between the Synapse and the Nucleus in Neuronal Development, Plasticity, and Disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 24, p. 183–209, 2009.
- COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R. a Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated From Snake Venom*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 42, n. 9, p. 571–574, 1956.
- COTRINA, M. L. et al. ATP-Mediated Glia Signaling. v. 20, n. 8, p. 2835–2844, 2000.
- DAVIDSON, B. et al. Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 83, n. 2, p. 119–128, 2004.
- DE MELO REIS, R. A. et al. Functional Identification of Cell Phenotypes Differentiating from Mice Retinal Neurospheres Using Single Cell Calcium Imaging. **Cell Mol Neurobiol**, v. 31, p. 835–846, 2011.
- FREITAS, H. R. et al. Glutathione-Induced Calcium Shifts in Chick Retinal Glial Cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–20, 2016.
- FURMAN, J. L.; NORRIS, C. M. Calcineurin and glial signaling:

neuroinflammation and beyond. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 158, p. 1–12, 2014.

GARCIA, S. et al. Ciclosporina A e tacrolimus : uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 393–401, 2004.

GROTH, R. D. et al. Neurotrophin activation of NFAT-dependent transcription contributes to the regulation of pro-nociceptive genes. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 4, p. 1162–1174, ago. 2007.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49 – 92, 1951.

HERNÁNDEZ, G. L. et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 5, p. 607–620, 2001.

HU, J. et al. Schwann cells promote neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons through secretion of nerve growth factor. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, p. 177–182, 2011.

HUNT, J. et al. Cyclosporin A Has Direct Effects on Adult Neural Precursor Cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 8, p. 2888–2896, 2010.

JAMES, G.; BUTT, A. M. P2X and P2Y purinoreceptors mediate ATP-evoked calcium signalling in optic nerve glia in situ. v. 30, p. 251–259, 2001.

JI, R. R.; RUPP, F. Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin-induced hyperalgesia: relationship to c-fos induction. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 5, p. 1776–85, 1 mar. 1997.

KIM, M.-S. et al. Nerve Growth Factor (NGF) Regulates Activity of Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) in Neurons via the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Akt-Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 45, p. 31349–31360, 2014.

LEE, J. H. et al. Cyclosporine A Induces Nerve Growth Factor Expression Via Activation of MAPK p38 and NFAT5. **Cornea**, v. 30, n. 10, p. 19–24, 2011.

LUO, C. et al. Recombinant NFAT1 (NFATp) Is Regulated by Calcineurin in T Cells and Mediates Transcription of Several Cytokine Genes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 7, p. 3955–3966, 1996.

MANTYH, P. W. et al. Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain. **Anesthesiology**, v. 115, n. 1, p. 189–204, 2011.

MCMILLAN, M. A. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 42, p. 7258, 1989.

MISKO, B. Y. T. P.; RADEKE, M. J.; SHOOTER, E. M. NERVE GROWTH FACTOR IN NEURONAL DEVELOPMENT AND MAINTENANCE. v. 190, p.

177–190, 1987.

MNICH, K. et al. Nerve growth factor-mediated inhibition of apoptosis post-caspase activation is due to removal of active caspase-3 in a lysosome-dependent manner. **Cell death & disease**, v. 5, n. 5, p. e1202, 2014.

NICHOLS, R. A.; SUPLICK, G. R.; BROWN, J. M. Calcineurin-mediated Protein Dephosphorylation in Brain Nerve of Glutamate * Terminals Regulates the Release. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 38, p. 23817–23823, 1994.

PAPERS, J. B. C.; CRABTREE, G. R. Calcium, Calcineurin and the control of Transcription. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 2313–2316, 2000.

REIS, R. A. M. et al. Sympathetic Neuronal Survival Induced by Retinal Trophic Factors. **Journal of Neurobiology**, v. 50, n. 1, p. 13–23, 2001.

REIS, R. A. M. et al. Müller glia factors induce survival and neuritogenesis of peripheral and central neurons. **Brain Research**, v. 1205, p. 1–11, 2008.

RICCIO, A et al. An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5329, p. 1097–1100, 1997.

SACHEWSKY, N. et al. Cyclosporin A enhances neural precursor cell survival in mice through a calcineurin-independent pathway. **The Company of Biologists**, v. 7, p. 953–961, 2014.

SEBBEN, A. D.; LICHTENFELS, M. PERIPHERAL NERVE REGENERATION: CELL THERAPY AND NEUROTROPHIC FACTORS. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 6, p. 643–649, 2011.

SENA, C. B. C. DE et al. Cyclosporine A treatment of leprosy patients with chronic neuritis is associated with pain control and reduction in antibodies against nerve growth factor. **Leprosy review**, v. 77, n. 2, p. 121–9, jun. 2006.

TANIUCHI, M. et al. Expression of Nerve Growth Factor Receptors by Schwann Cells Axotomized Peripheral Nerves: Ultrastructural Location, Suppression by axonal contact, and Binding Properties. **The Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 2, p. 664–681, 1988.

TERENGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of Anatomy**, v. 194, n. 1, p. 1–14, 1999.

THOENEN, H. Neurotrophins and Neuronal Plasticity. **Science**, v. 270, p. 593–598, 1994.

THOMSON, A. W.; WEBSTER, L. M. The influence of cyclosporin A on cell-mediated immunity. **Clinical e Experimental Immunology**, v. 71, n. 3, p. 369–376, 1988.

TONI, T.; DUA, P.; VAN DER GRAAF, P. H. Systems Pharmacology of the NGF Signaling Through p75 and TrkA Receptors. **CPT Pharmacometrics**

Syst. Pharmacol., v. 3, n. 12, p. e150, 2014.

TRIBE, H. The Discovery and Development of Cyclosporin. **Mycologist**, v. 12, n. 1, p. 1–3, 1998.

VENOM, F. S.; COHEN, B. Y. S.; LEVI-MONTALCINI, R. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. **Current biology : CB**, v. 6, n. 6, p. 628–9, 1 jun. 1996.

VIOLA, J. P. B. et al. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 3, p. 335–44, mar. 2005.

VIOLA, J. P. B.; RAO, A. Role of the Cyclosporin-sensitive Transcription Factor NFAT1 in the Allergic Response. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. II, p. 147–155, 1997.

VIZZA, D. et al. Exposure to Nerve Growth Factor Worsens Nephrotoxic Effect Induced by Cyclosporine A in HK-2 Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80113, 2013.

WERNECK, M. B. F. et al. Cyclosporin A inhibits colon cancer cell growth independently of the calcineurin pathway. **Cell cycle**, v. 11, n. 21, p. 3997–4008, 2012.

WIEDUWILT, M. J.; MOASSER, M. M. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 10, p. 1566–1584, 2011.