UNIVERSIDADE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Possíveis efeitos citoprotetores do antioxidante da dieta coenzima Q₁₀
em modelo de células neuronais

Carla da Silva Machado

Ribeirão Preto
2011

RESUMO

MACHADO, C. S. **Possíveis efeitos citoprotetores do antioxidante da dieta coenzima Q₁₀ em modelo de células neuronais**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A coenzima Q₁₀ é uma provitamina lipossolúvel sintetizada endogenamente e naturalmente encontrada em alimentos como a carne vermelha, peixes, cereais, brócolis e espinafre. É comercializada como suplemento alimentar e utilizada em formulações cosméticas. Localiza-se na membrana de organelas celulares como retículo endoplasmático, vesículas e membrana interna da mitocôndria, onde atua como um cofator essencial na cadeia respiratória. Apresenta propriedades antioxidantes e potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas e neuromusculares. O objetivo deste trabalho foi investigar os possíveis efeitos protetores de uma formulação hidrossolúvel de coenzima Q₁₀ em células PC12 expostas à cisplatina, um fármaco antineoplásico que tem a neurotoxicidade como um dos fatores limitantes à sua utilização. A linhagem celular PC12 (feocromocitoma de ratos) utilizada nesta investigação é um reconhecido modelo *in vitro* para estudos neuronais. Os métodos empregados foram os ensaios do MTT, cometa, citoma micronúcleo com bloqueio da citocinese, crescimento de neuritos e análise da expressão do gene *Tp53*. Os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade da coenzima Q₁₀ (0,1 - 20 µg/mL) mostraram que este antioxidante foi citotóxico às células PC12 na concentração de 20,0 µg/mL e não apresentou citotoxicidade em baixas concentrações. Para os ensaios do citoma e cometa, foram selecionadas três concentrações não citotóxicas de coenzima Q₁₀ (0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL) que não apresentaram mutagenicidade e genotoxicidade às células PC12. O efeito protetor da coenzima Q₁₀ sobre a cisplatina no ensaio do citoma foi caracterizado pela diminuição da frequência de micronúcleos e brotos nucleares, entretanto a proteção da coenzima Q₁₀ não foi evidenciada no ensaio cometa. Alterações significativas na expressão do gene *Tp53* não foram observadas no tratamento coenzima Q₁₀ (1,0 µg/mL) associado à cisplatina (0,1 µg/mL). A coenzima Q₁₀ (0,1 e 1,0 µg/mL) não foi neurotóxica em células PC12 indiferenciadas e diferenciadas após exposição ao fator de crescimento do nervo, e seu melhor efeito neuroprotetor foi observado na menor concentração avaliada. A coenzima Q₁₀ reduziu a citotoxicidade da cisplatina (10,0 µg/mL) em células PC12 indiferenciadas e estimulou o crescimento de neuritos em células PC12 diferenciadas. A determinação dos efeitos citoprotetores da coenzima Q₁₀ em um modelo neuronal é importante para elucidar possíveis estratégias de neuroproteção que poderiam ser aplicadas aos pacientes submetidos à quimioterapia.

Palavras-chave: coenzima Q₁₀, neuroproteção, PC12, *Tp53*, cisplatina

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Coenzima Q₁₀

A Coenzima Q₁₀ (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona) foi primeiramente isolada em 1957 a partir da mitocôndria de coração bovino (KUMAR et al., 2009). É uma provitamina lipossolúvel sintetizada endogenamente também conhecida como CoQ₁₀ ou ubiquinona (COLLINS; KEMPER, 1999). Essa coenzima pertence a uma série de compostos homólogos que compartilham na sua estrutura um anel benzoquinona, mas diferem no comprimento da cadeia isoprenóide (CRANE; SUM, 1993). A Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) está presente em duas formas, a oxidada chamada ubiquinona e a reduzida ubiquinol (LITTARRU; TIANO, 2007).

A CoQ₁₀ é encontrada em todas as células do corpo humano, e as maiores concentrações são observadas nos tecidos do cérebro, coração, fígado e músculo esquelético (SPINDLER; BEAL; HENCHCLIFFE, 2009). Está localizada na membrana interna das mitocôndrias, onde realiza a interação com enzimas complexas específicas, atuando como um cofator essencial na cadeia respiratória mitocondrial (CRANE; SUM, 1993). Localiza-se também na membrana de organelas celulares como retículo endoplasmático, peroxissomos, lisossomos e vesículas, sendo a maior concentração observada na membrana interna da mitocôndria (KUMAR et al., 2009). Essa coenzima possui a capacidade de proteger fosfolipídeos, proteínas da membrana mitocondrial e o DNA dos danos oxidativos (FORSMARK-ANDRÉE; DALLNER; ERNESTER, 1995; TOMASETTI et al., 1999), além de apresentar a capacidade de regenerar outros antioxidantes como o ácido ascórbico e o α -tocoferol (KIM; PARK, 2010).

Acredita-se que nove genes estejam envolvidos na biossíntese da CoQ₁₀ e mutações em três destes genes (*PDSS1*, *PDSS2* e *COQ2*) têm resultado em deficiência primária de CoQ₁₀ (CHONG-HAN, 2010; DIMAURO; QUINZII; HIRANO, 2007). A deficiência de CoQ₁₀ manifesta-se como uma doença rara com apresentações fenotípicas variáveis, incluindo miopatia, atrofia cerebelar com ataxia

e doença multissistêmica infantil (DIMAURO; QUINZII; HIRANO, 2007; SPINDLER; BEAL; HENCHCLIFFE, 2009).

A CoQ₁₀ é sintetizada pelas células humanas, mas também pode ser obtida a partir da dieta. Carne vermelha, de ave e peixe são fontes ricas em CoQ₁₀. Pequenas quantidades são encontradas nos produtos lácteos, cereais, ovos, frutos secos como as nozes e nos vegetais, principalmente espinafre e brócolis (Tabela 1). Ao contrário de outros antioxidantes lipofílicos, a síntese endógena, assim como a ingestão na dieta, contribuem para as concentrações de CoQ₁₀ no organismo (FU; JI; DAM, 2009; KITANO et al., 2006; MASON, 2005).

Tabela 1- Concentração de CoQ₁₀ (µg/100g de peso úmido) nos alimentos

Alimento	CoQ₁₀ µg/100g de peso úmido	Fonte
Carne bovina	3100	Weber, Bysted e Holmer (1997)
Frango	1400	Mattila e Kumpulainen (2001)
Peixe	180-13000	Kubo et al. (2007)
Brócolis	701	Kubo et al. (2007)
Batata	50	Mattila e Kumpulainen (2001)
Leite	31	Kubo et al. (2007)
Ovos	150	Weber, Bysted e Holmer (1997)
Cereais	60-490	Kamei et al. (1986)

Além de sua ocorrência natural, a CoQ₁₀ é comercializada como suplemento alimentar ou nutracêutico em vários países (KITANO et al., 2006) e utilizada em formulações cosméticas (ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

A expressão de genes envolvidos na sinalização celular humana, metabolismo e transporte são modulados pela CoQ₁₀, e alguns dos efeitos da

administração exógena poderiam ser atribuídos a esta atividade. Estudos recentes do perfil de expressão gênica revelaram que a CoQ₁₀ pode influenciar a expressão de centenas de genes. As análises sugerem que os genes *IL-5*, *trombina*, *vitronectina* e *proteína C reativa* são regulados pela CoQ₁₀ via o fator de transcrição NFkappaB1 (SCHMELZER et al., 2008).

O interesse pela CoQ₁₀ tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido à capacidade de transferir elétrons e atuar como antioxidante (GRONEBERG et al., 2005; KUMAR et al., 2009). Na sua forma reduzida, a CoQ₁₀ é um poderoso antioxidante que previne os danos oxidativos causados pelos radicais livres, incluindo a oxidação de lipídios na membrana mitocondrial. Sua atuação como antioxidante também ocorre por meio da ativação e aumento da expressão de proteínas mitocondriais desacopladas ("*mitochondrial uncoupling proteins*"- UCP), um efeito antiapoptótico que resulta na redução de geração de radicais livres (CHATURVEDI; BEAL, 2008; MARCOFF; THOMPSON, 2007).

Estudos recentes demonstraram a importância da CoQ₁₀ na resistência do DNA aos danos oxidativos. Os linfócitos do sangue periférico de indivíduos portadores de doenças mitocondriais apresentaram uma redução significativa das quebras de fita simples e duplas do DNA, após o tratamento por duas semanas com a CoQ₁₀ (MIGLIORE et al., 2004). A redução dos danos oxidativos pela CoQ₁₀ também foi observada em fibroblastos periosteal humano e osteosarcoma MG63 (FIGUERO et al., 2006), em células da mucosa nasal humana (REITER et al., 2009) e em células ganglionares da retina, tanto *in vitro*, linhagem RGC-5, como *in vivo*, em ratos (NAKAJIMA et al., 2008).

Kernt et al. (2010) relataram que a CoQ₁₀ reduziu efetivamente as espécies reativas de oxigênio ("*Reactive Oxygen Species*"- ROS) intracelulares induzidas pela luz UV em células epiteliais do cristalino humano, demonstrando sua capacidade antioxidante. Em modelo de células neuronais e estresse oxidativo, o pré-tratamento com CoQ₁₀ preservou o potencial da membrana mitocondrial e reduziu a geração de ROS (SOMAYAJULU et al., 2005).

A CoQ₁₀ tem grande importância no tratamento de desordens mitocondriais e neuromusculares, bem como nas doenças neurodegenerativas (CLEREN et al., 2008). Em modelos *in vivo* e *in vitro* para doenças neurodegenerativas, a CoQ₁₀ demonstrou neuroproteção (BEAL, 2004; MULLER et al., 2003) e apresentou efeitos protetores sobre a disfunção mitocondrial, ROS e ativação de caspase-3 induzida pelo paraquat, um composto utilizado em herbicidas, além de inibir a morte de células neuronais da linhagem humana de neuroblastoma SHSY-5Y (CHATURVEDI; BEAL, 2008; McCARTHY et al., 2004).

A administração de CoQ₁₀ aumentou a sua concentração nas mitocôndrias de células cerebrais e exerceu efeitos neuroprotetores sobre as lesões induzidas pelo ácido 3-nitropropiónico (MATTHEWS et al., 1998), além de proteger os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos de ratos da disfunção mitocondrial e morte celular (KOONCUMCHOO et al., 2006; MOON et al., 2005). Os resultados obtidos com a CoQ₁₀ em modelos experimentais têm levado a triagens clínicas em doenças neurodegenerativas (YANG et al., 2009). Os estudos clínicos utilizando a CoQ₁₀ na neuroproteção vêm apresentando resultados promissores para as doenças de Huntington, Alzheimer, Parkinson, ataxia de Friedreich, paralisia supranuclear progressiva e esclerose lateral amiotrófica (SPINDLER; BEAL; HENCHCLIFFE, 2009).

Além de sua utilização em doenças neurodegenerativas, a CoQ₁₀ é também utilizada no tratamento de doenças cardíacas como arteriosclerose, isquemia, insuficiência cardíaca crônica (sistólica e diastólica), hipertensão, arritmias e doença de Ménière (KUMAR et al., 2009). Outras aplicações da CoQ₁₀ incluem: a sua eficácia no tratamento e melhoria da qualidade do sêmen de homens com infertilidade idiopática (BALERCIA et al., 2009; LITTARRU; TIANO, 2010); a administração de CoQ₁₀ a crianças com síndrome de Down, em uma tentativa de neutralizar ou diminuir o desequilíbrio oxidativo encontrado nestes casos (TIANO et al., 2008); a suplementação de CoQ₁₀ em pacientes com câncer de mama (BAHAR et al., 2010) e mais recentemente, a sua utilização no tratamento da enxaqueca (SUN-EDELSTEIN; MAUSKOP, 2011).

O processo de envelhecimento também é influenciado pela CoQ₁₀. A propriedade da CoQ₁₀ atuar como pró-oxidante e antioxidante sugere que ela possa modular o estado redox da célula sob condições fisiológicas e patológicas, e desta forma poderia desempenhar um papel no processo de envelhecimento (SOHAL; FORSTER, 2007; SANTOS et al., 2009). Desde que o decréscimo na biossíntese de CoQ₁₀ e sua deficiência nos tecidos estão associados com alterações degenerativas e envelhecimento, a suplementação diária com CoQ₁₀ tem sido utilizada no tratamento de doenças em vários países (HIDAKA et al., 2008).

Entretanto, o uso extensivo da CoQ₁₀ em suplementos alimentares requer a avaliação da sua segurança e dos possíveis riscos à saúde humana (HATHCOCK; SHAO, 2006). Dados publicados referentes a estudos de determinação de riscos para a saúde humana indicaram que a CoQ₁₀ apresenta baixa toxicidade e não induz sérios efeitos adversos no ser humano. A ingestão diária aceitável é de 12 mg/kg/dia, calculada a partir do NOAEL (*“no-observed-adverse-effect level”*) de 1200 mg/kg/dia como resultado de um estudo de toxicidade crônica em ratos, com duração de 52 semanas. As evidências dos estudos farmacocinéticos sugerem que a administração de CoQ₁₀ exógena não tem influência sobre a sua biossíntese endógena, ou acúmulo no plasma e tecidos após o término da suplementação. Adicionalmente, as análises de biodisponibilidade e farmacocinética da CoQ₁₀ complementaram a avaliação dos riscos à saúde humana (HIDAKA et al., 2008).

A CoQ₁₀ é praticamente insolúvel e sua lenta absorção ($T_{\max}$ 2-10 h) no trato gastrointestinal foi atribuída ao seu alto peso molecular e baixa solubilidade em água (BALAKRISHNAN et al., 2009; CHOPRA et al., 1998). A biodisponibilidade dos suplementos alimentares contendo CoQ₁₀ varia extensivamente entre as diferentes formas (FU; JI; DAM, 2009). Várias estratégias de formulação foram desenvolvidas para aumentar a solubilidade da CoQ₁₀, incluindo sistemas com lecitina de soja, microesferas lipídicas, complexos com ciclodextrinas, sendo necessário o desenvolvimento de um método eficiente para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade da CoQ₁₀ (BALAKRISHNAN et al., 2009). No caso da suplementação, os produtos contendo formulações solubilizadas da CoQ₁₀

mostraram aumento da biodisponibilidade quando comparados às cápsulas, comprimidos e suspensões oleosas (BHAGAVAN; CHOPRA, 2006). Uma apresentação de CoQ₁₀ hidrossolúvel foi desenvolvida (SIKORSKA et al., 2003).

Devido a sua natureza lipofílica, poucos estudos foram realizados com a CoQ₁₀ *in vitro* usando meio de cultura aquoso. Uma CoQ₁₀ solúvel em água foi desenvolvida pelos pesquisadores Marianna Sikorska e Henryk Borowy-Borowsky do Conselho Nacional de Pesquisa (National Research Council) em Ottawa no Canadá (BOROWY-BOROWSKI; SIKORSKA; WALKER, 2000). Esta formulação solúvel em água permite que estudos sejam realizados em culturas de células para a elucidação dos mecanismos moleculares da CoQ₁₀ e seu potencial de ação.

1.2 Cisplatina e antioxidantes da dieta

O acúmulo intracelular de ROS, tais como os radicais livres e peróxidos, ocorrem durante os processos metabólicos normais e como resposta a vários estímulos (FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIERE, 2002). As ROS, produzidas pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, são sequestradas pelos antioxidantes e convertidas em compostos não tóxicos pelas enzimas que metabolizam estes radicais livres. O acúmulo de radicais livres nos tecidos pode resultar em disfunção celular e morte (NEUSTADT; PIECZENIK, 2008).

O aumento da morte celular é uma das características de muitas desordens neurológicas, incluindo isquemia, acidente vascular cerebral e as doenças de Parkinson e Alzheimer (SOMAYAJULU et al., 2005). Investigações anteriores mostraram que as células neuronais são altamente sensíveis às espécies reativas (KIM; WON, GWAG, 2002). O excesso de ROS pode ultrapassar a capacidade das defesas antioxidantes, provocando a ativação de neutrófilos, peroxidação lipídica, modificações de proteínas e quebras no DNA, além da indução de apoptose. Os processos pelos quais as espécies reativas induzem apoptose incluem a oxidação dos lipídeos e a ativação da proteína p53 (KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006).

A cisplatina (cDDP) é um fármaco antineoplásico alquilante muito empregado no tratamento dos cânceres de ovário e próstata, esôfago, carcinoma de bexiga, mama, cabeça, pescoço e pulmão, assim como nos linfomas, neuroblastomas, sarcomas, mieloma múltiplo, melanoma e mesotelioma (BRABEC; KASPAROVA, 2005; FLOREA; BÜSSELBERG, 2011; HASSAN; CHIBBER; NASEEM, 2010; WANG; LIPPARD, 2005). Quimicamente, a cDDP é um complexo inorgânico formado por um átomo de platina rodeado por átomos de cloro e amônia na posição *cis* de um plano horizontal (CHIRINO; CHAVERRI, 2009). Seu efeito antineoplásico deve-se a interação com o DNA, onde a cDDP liga-se a posição N7 das purinas, formando aductos que vão se transformar em *crosslinks* (ligações cruzadas) inter e intracadeia, os quais são responsáveis pela citotoxicidade e mutagenicidade da cDDP. Os aductos formados interferem com a duplicação do DNA pelo bloqueio da enzima DNA polimerase, inibem a transcrição e interferem no metabolismo da célula, resultando em bloqueio do ciclo celular e apoptose (KÖBERLE; USANOVA; KAINA, 2010; McDONALD et al., 2005; NADIN et al., 2006; WOZNIAK; CZECHOWSKA; BLASIAK, 2004).

A citotoxicidade da cDDP sobre as células cancerosas, células particularmente sensíveis devido às altas taxas mitóticas e à capacidade diminuída de reparo do DNA, está relacionada com a presença dessas ligações cruzadas ao DNA. Além disso, a cDDP é capaz de gerar ROS como o radical superóxido e o radical hidroxila (KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006).

Vários fármacos empregados nos tratamentos quimioterápicos têm seu uso limitado devido ao desenvolvimento de efeitos adversos, inclusive os compostos de platina (KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007). Apesar do seu sucesso na clínica oncológica, o tratamento com a cDDP está associado a graves efeitos tóxicos, tais como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, mielossupressão, efeitos gastrintestinais e mutagenicidade (ANTUNES et al., 2005; MENDONÇA et al., 2009; WEIJL; CLETON; OSANTO, 1997).

Os principais efeitos adversos dose-limitantes da cDDP incluem a nefrotoxicidade e a neurotoxicidade. Entretanto, a toxicidade renal induzida nos

tratamentos com a cDDP tem sido reduzida com a hiperhidratação. Desta forma, a neurotoxicidade torna-se o principal efeito adverso do quimioterápico (GREGG et al., 1992; PACE et al., 2003).

Durante o tratamento com a cDDP, os efeitos neurotóxicos se manifestam como uma neuropatia periférica, podendo ser graves e afetar significativamente a qualidade de vida do paciente. A neuropatia periférica é definida como uma disfunção dos neurônios periféricos, sensoriais, motores e autônomos, resultando em sintomas de parestesia, disestesia, perda de propriocepção, discriminação de toque e temperatura, dor e fraqueza motora. Na maioria dos casos há uma reversão lenta e incompleta desse quadro, afetando a qualidade de vida e as funções normais do paciente por vários anos após o término do tratamento (ALBERS et al., 2011; KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007).

Os mecanismos pelos quais a cDDP induz a morte de células neuronais ainda é desconhecido, mas podem ser resultado de alterações nos sinais de transdução celulares e dos danos ao DNA. A formação de aductos e as quebras de fita simples podem interferir na transcrição de genes importantes na manutenção dos neurônios, como as vias de sinalização molecular dependentes da proteína p53, contribuindo para a neurotoxicidade (HETMAN; VASHISHTA; REMPALA, 2010).

O tratamento com o antitumoral cDDP induz uma redução dose-dependente na formação de neuritos. A identificação de agentes que possam proteger os neuritos pode contribuir para a elucidação dos mecanismos responsáveis pelas neuropatias induzidas por agentes antineoplásicos (KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007).

Muitos compostos antioxidantes têm sido pesquisados como possíveis agentes quimioprotetores (KELSEY; WILKINS; LINSEMA, 2010; PARACHIKOVA, 2010). O emprego dos antioxidantes em associação aos quimioterápicos é justificado uma vez que muitos desses fármacos provocam um desequilíbrio oxidativo celular, seja pela geração direta de espécies reativas ou pela depleção dos sistemas antioxidantes da própria célula. Esse desequilíbrio oxidativo pode resultar

em efeitos tóxicos em tecidos específicos (BROZOVIC; AMBRIOVIĆ-RISTOV; OSMAK, 2010).

A riboflavina e o ácido caféico atuaram sobre a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade induzida pela cDDP (HASSAN; CHIBBER; NASEEM, 2010; KART et al., 2010), e as propriedades protetoras foram relacionadas às atividades antioxidantes desses compostos. A CoQ₁₀ diminuiu significativamente a superexpressão da proteína p53 e da enzima caspase-3 induzida pela cDDP em células tubulares renais (FOUAD et al., 2010) e foi efetiva na redução da cardiotoxicidade do quimioterápico doxorubicina, sem interferir com a atividade do antineoplásico (CONKLIN, 2004).

Baseado na hipótese que relaciona o envolvimento das espécies reativas no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, a identificação de agentes antioxidantes com potencial terapêutico é um dos desafios das pesquisas em neurociência (KELSEY; WILKINS; LINSEMA, 2010).

A epigallocatequina 3-galato, um composto antioxidante do chá verde, apresentou efeitos neuroprotetores em alguns modelos *in vitro* (SCHROEDER et al., 2009). O resveratrol, um antioxidante polifenólico conhecido por seus benefícios cardiovasculares, demonstrou significativa atividade neuroprotetora em modelos *in vitro* e *in vivo* (ALVIRA et al., 2007). Antioxidantes como a glutatona, vitamina E e a curcumina também apresentaram alguma eficiência na proteção sobre a neurotoxicidade induzida pelo tratamento com agentes antineoplásicos (ARGYRIOU et al., 2006; CASCINU et al., 1995; KANDEMIR et al., 2011; MENDONÇA et al., 2009). Entretanto, nenhum candidato a agente neuroprotetor apresentou resultados conclusivos em estudos clínicos comprovando a prevenção ou redução da neurotoxicidade da cDDP (ALBERS et al., 2011).

Devido a sua extensa aplicação em desordens neuromusculares e doenças neurodegenerativas (MANCUSO et al., 2010; SHULTS, 2003) e ao estudo *in vivo* demonstrando efeitos protetores em associação a cDDP (FOUAD et al., 2010), a CoQ₁₀ pode ter um papel importante sobre a neurotoxicidade induzida por antineoplásicos como a cDDP.

Existem evidências de que a neurotoxicidade induzida pelo antitumoral cDDP está envolvida com o aumento da geração de espécies reativas durante o tratamento (GABAIZEDEH et al., 1997; HUANG et al., 2003). A CoQ₁₀, como agente antioxidante endógeno e da dieta, atua diretamente sobre os radicais livres. Sua característica estrutural (heteroátomos adjacentes doadores de elétrons e longa cadeia isoprenóide) permite que a CoQ₁₀, na sua forma reduzida, se difunda através da bicamada lipídica das membranas e atue como transportadora de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (MODI et al., 2006).

1.3 A linhagem celular PC12

A linhagem celular PC12 foi desenvolvida a partir de células de feocromocitoma isoladas da glândula adrenal de ratos (*Rattus norvegicus*). Por mais de 30 anos esta linhagem tem sido utilizada como ferramenta para muitos aspectos da neurobiologia envolvendo condições normais e neoplásicas (TISCHLER; POWERS, 2004).

Quando expostas ao Fator de Crescimento do Nervo ("*Nerve Growth Factor*"-NGF), as células PC12 se estendem e se diferenciam em células semelhantes aos neurônios (KLESSE et al., 1999; YOO et al., 2004), adquirindo receptores de neurotransmissão, projeções neuríticas, excitabilidade elétrica, vesículas sinápticas e características como bloqueio do ciclo celular e alterações na expressão gênica (ANGELASTRO et al., 2000; KOIKE et al., 2006; SLOTKIN; SEIDLER, 2010), além do potencial em realizar sinapses quando co-cultivada com células musculares (ZHOU et al., 2010). Sob a ação do NGF, as PC12 podem ser induzidas à formação e extensão de neuritos (GELDOLF, 1995) e têm sido frequentemente utilizadas em estudo da função e diferenciação neuronal (PIGA et al., 2007).

As células PC12 são um modelo neuronal bem definido (SLOTKIN; SEIDLER, 2010; TENG et al., 1994) por possuírem características que incluem a síntese, armazenamento e excreção de noradrenalina e dopamina, presença dos receptores

nicotínicos de acetilcolina, do ácido gama-aminobutírico (GABA), da colina acetiltransferase e da tirosina hidroxilase (GARTLON et al., 2006).

1.4 O gene *Tp53*

O gene *TP53*, conhecido como gene supressor tumoral ou “guardião do genoma”, foi descrito em 1979 e originalmente identificado como um oncogene. Dados obtidos com o desenvolvimento da genética demonstraram, 10 anos após a sua descoberta, que o *TP53* era um gene supressor tumoral (MOGI; KUWANO, 2011).

O *TP53* codifica uma fosfoproteína tetramérica de 53kDa, que se liga especificamente ao DNA e age como fator de transcrição. A proteína p53 contém distintos domínios funcionais: o domínio N-terminal de transativação, o domínio de ligação entre o DNA e a proteína, o domínio de oligomerização e o domínio regulatório C-terminal (MOGI; KUWANO, 2011). O gene *TP53* está envolvido em inúmeros processos como reparo do DNA, apoptose, autofagia, senescência, parada do ciclo celular, metabolismo e envelhecimento. O fator de transcrição p53 pode ativar a transcrição de inúmeros genes, tais como o *p21* (um potente inibidor de quinase dependente de ciclina) e o oncogene *mdm2*, por ligação a sequências específicas (MOGI; KUWANO, 2011).

As atividades transcricionais de p53 são reguladas via RNAm e níveis de proteína, localização celular, capacidade de se ligar a inúmeras proteínas celulares e controle da expressão de genes-alvo. Em condições normais, a proteína p53 é sintetizada continuamente, mas não se acumula em níveis significativos, sendo degradada pela célula em poucos minutos (MOURA-GALO et al., 2004). Quando as células são expostas a agentes que danificam o DNA ou ocorre a ativação de um oncogene, observa-se um aumento na meia-vida da p53 e seu acúmulo no interior do núcleo (FENOGLIO-PREISER et al., 2003; MOURA-GALO et al., 2004).

Algumas substâncias carcinógenas podem induzir mutações específicas no gene *TP53*. O benzopireno e a aflatoxina estão relacionados a mutações em códons

específicos do *TP53* e a etiologia do câncer de pulmão e fígado, respectivamente (FETT-CONTE; SALLES, 2002). Mutações no gene *TP53* estão presentes em cerca de 50% dos cânceres humanos (MOURA-GALO et al., 2004). As mutações observadas nos diversos tipos de câncer são pontuais e estão localizadas em regiões da molécula altamente conservadas, correspondentes ao domínio de ligação entre o DNA e a proteína. Aproximadamente 80% das mutações do *TP53* são do tipo *missense* (SOUSSI, 2005). Outras alterações incluem inserções e deleções, mutações sem sentido e silenciosas (OLIVIER et al., 2002).

Em ratos (*Rattus norvegicus*), a nomenclatura oficial do gene supressor tumoral é *Tp53* e este localiza-se no braço curto do cromossomo 10 (10p24). Apresenta homologia com o *TP53* humano e de chimpanzé. Como em humanos, o gene *Tp53* codifica a proteína p53, que está envolvida com os processos anteriormente descritos (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2011).

O aumento das concentrações de proteína p53 em resposta aos danos ao DNA, hipóxia, hipoglicemia e estresse oxidativo induz apoptose dependente da via p53 em células neuronais (BOULEAU et al., 2007). A p53 também está envolvida em processos de distúrbios neurológicos, tais como acidente vascular cerebral e as doenças de Alzheimer e Parkinson (CULMSEE; MATTSON, 2005).

A citotoxicidade da cDDP está relacionada ao aumento das concentrações de p53 intracelulares. Em células tumorais, a cDDP induz danos ao DNA que são reconhecidos como a principal causa de morte celular durante a quimioterapia, enquanto a proteína p53 é a mediadora central da resposta aos danos celulares (JIANG; DONG, 2008). Evidências de que o estresse oxidativo e alterações no metabolismo energético têm um papel importante na patogênese de doenças neurológicas (SPINDLER; BEAL; HENCHCLIFFE, 2009) suportam a hipótese de que o agente neuroprotetor CoQ₁₀ poderia atuar como antioxidante sobre os danos ao DNA induzidos pela cDDP no modelo celular PC12.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Os efeitos protetores da CoQ₁₀ hidrossolúvel foram investigados sobre a citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e neurotoxicidade do quimioterápico cDDP em células PC12, além da influência deste composto na expressão do gene *Tp53*. Com base nos resultados obtidos, nas condições e concentrações avaliadas, podemos concluir que:

- A CoQ₁₀ em altas concentrações foi citotóxica às células PC12;
- No ensaio do CBMN Cyt, a CoQ₁₀ reduziu a frequência dos biomarcadores de danos ao DNA induzidos pela cDDP;
- No ensaio cometa, a CoQ₁₀ não atuou na redução dos *crosslinks* induzidos pela cDDP no DNA;
- A CoQ₁₀, em associação a cDDP, não alterou a expressão do gene *Tp53*;
- As células PC12 indiferenciadas foram mais sensíveis à CoQ₁₀ e cDDP do que as dPC12.
- A CoQ₁₀ na concentração de 0,1 µg/mL reduziu a citotoxicidade da cDDP e estimulou o crescimento de neuritos inibido pelo quimioterápico;

Referências[☆]

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002a. 7 p.

7 REFERÊNCIAS

- ALBERS, J.W. et al. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, 2011, *in press*.
- ALLEMANN, I.B.; BAUMANN, L. Antioxidants used in skin care formulations. **Skin Research & Technology**, Copenhagen, v.13, n.7, p.5-9, 2008.
- ALMEIDA, G.M. et al. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. **DNA Repair**, Amsterdam, v.5, n.2, p.219-225, 2006.
- ALVIRA, D. et al. Comparative analysis of the effects of resveratrol in two apoptotic models: inhibition of complex I and potassium deprivation in cerebellar neurons. **Neuroscience**, Oxford, v.147, n.3, p.746–756, 2007.
- ANGELASTRO, J.M. et al. Identification of diverse nerve-growth factor-regulated genes by serial analysis of gene expression (SAGE) profiling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, n.19, p.10424-10429, 2000.
- ANTUNES, L.M.G., BIANCHI, M.L.P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.1, p.89-96, 2004.
- ANTUNES, L.M.G. et al. Evaluation of the clastogenicity of the carotenoid bixin in humans lymphocyte cultures. **Mutation Research**, Amsterdam, v.585, n.1-2, p.113-119, 2005.
- APPELLA, E.; ANDERSON, C.W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.268, n.10, p.2764-2772, 2001.

- ARGYRIOU, A.A. et al. A randomized controlled trial evaluating the efficacy and safety of vitamin E supplementation for protection against cisplatin-induced peripheral neuropathy: Final results. **Support Care Cancer**, Berlin, v.14, n.11 p.1134-1140, 2006.
- BAHAR, M. et al. Exogenous coenzyme Q10 modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model. **Nutrition Journal**, United Kingdom, v.62, n.9, p.2-8, 2010.
- BALAKRISHNAN, P. et al. Enhanced oral bioavailability of Coenzyme Q10 by self-emulsifying drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.374, v.1, p.66-72, 2009.
- BALERCIA, G. et al. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. **Fertility and Sterility**, Tehran, v.91, n.5, p.1785-1792, 2009.
- BHAGAVAN, H.N.; CHOPRA, R.K. Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. **Free Radicals Research**, United Kingdom, v.40, n.5, p.445-453, 2006.
- BEAL, M.F. Therapeutic effects of coenzyme Q10 in Huntington's disease and early Parkinson's disease. **Biofactors**, Oxford, v.18, n.1-4, p.153-161, 2004.
- BORNER, M.M.; JONCOURT, F.; HOTZ, M.A. Similarity of apoptosis induction by 2-chlorodeoxyadenosine and cisplatin in human mononuclear blood cells. **British Journal of Cancer**, London, v.76, n.11, p.1448-1454, 1997.
- BOROWY-BOROWSKI, H.; SIKORSKA, M.; WALKER, P.R. Water soluble composition of bioactive lipophilic compounds. US patent No. 6,045,826, 2000.
- BOULEAU, S. et al. Fibroblast Growth Factor 1 inhibits p53-dependent apoptosis in PC12 cells. **Apoptosis**, London, v.12, n.8, p.1377-1387, 2007.

- BRABEC, V.; KASPAROVA, T. Modifications of DNA by platinum complexes relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v.8, n.3, p.131-146, 2005.
- BROZOVIC, A.; AMBRIOVIC-RITOV, A.; OSMAK, M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v.40, n.4, p.347–359, 2010.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v.25, n.2, p.169-193, 2000.
- BUSTIN, S.A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, London, v.109, n.4, p.365-379, 2005.
- CASCINU, S. et al. Neuroprotective effect of reduced glutathione on cisplatin-based chemotherapy in advanced gastric câncer: A randomized double-blind placebo-controlled trial. **American Journal of Clinical Oncology**, New York, v.13, n.1, p.26-32, 1995.
- CHATURVEDI, R.K.; BEAL, M.F. Mitochondrial Approaches for Neuroprotection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1147, p.395-412, 2008.
- CHIRINO, YI. ; CHAVERRI, JP. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, New York, v.61, n.3, p.223-242, 2009.
- CHONG-HAN, K. Dietary lipophilic antioxidants: implications and significance in the aging process. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v.50, n.10, p.931-937, 2010.

- CHOPRA, R.K. et al. Relative bioavailability of coenzyme Q10 formulations in human subjects. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Toronto, v.68, n.2, p.109-113, 1998.
- CLEREN, C. et al. Therapeutics effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. **Journal of Neurochemistry**, London, v.104, n.6, p.1613-1621, 2008.
- COLLINS, A. R.; DUTHIE, S. J.; DOBSON, V. L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. **Carcinogenesis**, Oxford, v.14, n. 9, p. 1733-1735, 1993.
- COLLINS, C.; KEMPER, K.J. Coenzyme Q10 (CoQ10 or ubiquinone). The Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research, 1999. Disponível em: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>. Acesso em: 05 mar. 2011.
- COLOGNATO, R. et al. Modulation of hydrogen peroxide-induced DNA damage, MAPKs activation and cell death in PC12 by ergothioneine. **Clinical Nutrition**, Oxford, v.25, n.1, p.135-145, 2006.
- CONKLIN, K.A. Cancer, chemotherapy and antioxidants. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.134, p. S3202-S3204, 2004. Supplement.
- CRANE; F.L.; SUM, E.E. The essential functions of coenzyme Q. **The Clinical investigator**, Berlin, v.71, n.8, p.S55-S59, 1993. Supplement.
- CULMSEE, C.; MATTSON, M.P. p53 in neuronal apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.331, n.3, p.761-777, 2005.
- DIMAURO, S.; QUINZII, C.M.; HIRANO, M. Mutations in coenzyme Q10 biosynthetic genes. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.117, n.3, p.587-589, 2007.

- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, Amsterdam, v.600, n.1-2, p.58-66, 2006.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, London, v.2, n.5, p.1084-1104, 2007.
- FENOGLIO-PREISER, C.M. et al. TP53 and Gastric Carcinoma: A Review. **Human Mutation**, New York, v.21, p.258-270, 2003.
- FETT-CONTE, A.C.; SALLES, A.B.C.F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia**, Rio de Janeiro, v.24, n.2, p.85-89, 2002.
- FIGUERO, E. et al. Oxidant/antioxidant interactions of nicotine, coenzyme Q10, piquenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts. **Steroids**, San Francisco, v.71, n.13-14, p.1062-1072, 2006.
- FILBIN, M.T. Axon regeneration: Vaccinating against spinal cord injury. **Current Biology**, London, v.10, n.3, p.100-103, 2000.
- FISCHER, S.J.; PODRATZ, J.L.; WINDEBANK, A.J. Nerve growth factor rescue of cisplatin neurotoxicity is mediated through the high affinity receptor: studies in PC12 cells and p75 null mouse dorsal root ganglia. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v.308, n.1, p.1-4, 2001.
- FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J.L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, Paris, v.84, n.2-3, p.131-141, 2002.
- FLOREA, A.M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers**, Basel, v.3, p.1351-1371, 2011.

- FORSMARK-ANDRÉE, P.; DALLNER, G.; ERNEST, L. Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.19, n.6, p.749-757, 1995.
- FOUAD, A. et al. Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. **Toxicology**, Amsterdam, v.274, n.3, p.49-56, 2010.
- FOURNIER, A.E.; STRITTMATTER, M. Repulsive factors and axon regeneration in the CNS. **Current Opinion in Neurobiology**, London, v.11, n.1, p.89-94, 2001.
- FU, X.; JI, R.; DAM, J. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of Bio-Quinone® Q10 in mice and rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v.53, n.1, p.1-5, 2009.
- GABAIZADEH, R. et al. BDNF protection of auditory neurons from cisplatin involves changes in intracellular levels of both reactive oxygen species and glutathione. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v.50, n.1-2, p.71-78, 1997.
- GARTLON, J. et al. Evaluation of a proposed in vitro test strategy using neuronal and non-neuronal cell systems for detecting neurotoxicity. **Toxicology in vitro**, Oxford, v.20, n.8, p.1569-1581, 2006.
- GEBICKI, S.; GEBICKI, J.M. Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. **The Biochemical Journal**, London, v. 338, p. 629-636, 1999.
- GELDOF, A.A. Nerve-growth-factor-dependent neurite outgrowth assay: A research model for chemotherapy-induced neuropathy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v.121, n.11, p.657-660, 1995.
- GIRI, A.; KHYNRIAM, D.; PRASAD, S.B. Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v.421, n.2, p.139-148, 1998.

- GOETHEM, V.F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation Research**, Amsterdam, v.392, n.1-2, p.31-43, 1997.
- GREGG, R.S. et al. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v.10, n.5, p.795-803, 1992.
- GRONEBERG, D.A. et al. Coenzyme Q10 affects expression of genes involved in cell signaling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v.37, n.6, p.1208-1218, 2005.
- GUTIERREZ-MARISCAL, F.M. et al. Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 induces postprandial changes in p53 in response to oxidative DNA damage in elderly subjects. **Age**, Dordrecht, 2011, *in press*.
- HASSAN, I.; CHIBBER, S.; NASEEM, I. Ameliorative effect of riboflavin on the cisplatin induced nephrotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.48, n.8-9, p. 2052-2058, 2010.
- HATHCOCK, J.H.; SHAO, A. Risk assessment for coenzyme Q10 (Ubiquinone). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v.45, n.3, p.282-288, 2006.
- HETMAN, M.; VASHISHTA, A.; REMPALA, G. Neurotoxic mechanisms of DNA damage: focus on transcriptional inhibition. **Journal of Neurochemistry**, London, v.114, n.6, p.1537-1549, 2010.
- HIDAKA, T. et al. Safety assessment of coenzyme Q10 (CoQ10). **Biofactors**, Oxford, v.32, n.1-4, p.199-208, 2008.

- HUANG, H.L. et al. DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. **Oncogene**, Basingstoke, v.22, n.50, p.8168-8177, 2003.
- HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, Houndmills, v.6, n.4, p.279-284, 2005.
- HU, N. et al. Quantitative real-time RT-PCR validation of differential mRNA expression of *SPARC*, *FADD*, *Fascin*, *COL7A1*, *CK4*, *TGM3*, *ECM1*, *PPL* and *EVPL* in esophageal squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, London, v.6, n.7, p.1-9, 2006.
- JIANG, M.; DONG, Z. Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v.327, n.2, p.300-307, 2008.
- KALIORA, A.C.; DEDOUSSIS, G.V.Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.187, n.1, p.1-17, 2006.
- KAMEI, M. et al. The distribution and content of ubiquinone in foods. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v.56, n.1, p.57-63, 1986.
- KANDEMIR, F.M. et al. Compensatory effects of curcumin on cisplatin-induced toxicity in rabbit testis. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v.5, n.3, p. 456-461, 2011.
- KART, A. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. **Experimental and Toxicology Pathology**, New York, v.62, n.1, p.45-52, 2010.
- KELSEY, N.A.; WILKINS, H.M.; LINSEMAN, D.A. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. **Molecules**, Basel, v. 15, n.11, p.7792-7814, 2010.

- KERNT, M. et al. Coenzyme Q10 prevents human lens epithelial cells from light-induced apoptotic cell death by reducing oxidative stress and stabilizing BAX / Bcl-2 ratio. **Acta Ophthalmologica**, Oxford, v.88, n.3, p.78-86, 2010.
- KIM, J.M.; PARK, E. Coenzyme Q10 Attenuated DMH-induced precancerous lesions in SD rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.56, n.2, p.139-144, 2010.
- KIM, Y.D.; WON, S.K.; GWAG, B.J. Analysis of mitochondrial free radical generation in animal models of neuronal disease. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v.33, n.5, p.715-723, 2002.
- KITANO, M. et al. Evaluation of the mutagenic potential of ubidecarenone using three short-term assays. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.44, n.3, p.364-370, 2006.
- KIRKLAND, D. et al. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. **Mutation Research**, Amsterdam, v.628, n.1, p.31-55, 2007.
- KLEIN, R.; BROWN, D.; TURNLEY, A.M. Phenoxodiol protects against cisplatin induced neurite toxicity in a PC12 cell model. **BMC Neuroscience**, London, v.8, p.61-69, 2007.
- KLESSE, L.J. et al. Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. **Oncogene**, Basingstoke, v.18, n.12, p.2055-2068, 1999.
- KÖBERLE, B.; USANOVA, M.T.S.; KAINA, B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1806, n.2, p.172-182, 2010.
- KOIKE, T. et al. The heat shock protein inhibitor KNK437 induces neurite outgrowth in PC12 cells. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v.410, n.3, p.212-217, 2006.

- KOONCUMCHOO, P. et al. Coenzyme Q(10) provides neuroprotection in iron-induced apoptosis in dopaminergic neurons. **Journal of Molecular Neuroscience**, Boston, v.28, n.2, p.125-141, 2006.
- KOSMIDER, B. et al. Evaluation of P53 and BAX gene expression and induction of apoptosis and necrosis by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-diamminedichloroplatinum(II) (cis-DDP) in human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v.604, n.1-2, p.28-35, 2006.
- KUBO, H. et al. Food content of Ubiquinol-10 and Ubiquinone-10 in the Japanese diet. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.21, n.3, p.199-210, 2007.
- KUMAR, A. et al. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v.124, n.3, p.259-268, 2009.
- LI, L. et al. The role of oxidative stress in acrolein-induced DNA damage in HepG2 cells. **Free Radical Research**, Yverdon, v.42, n.4, p.354-61, 2008.
- LITTARRU, G.P.; TIANO, L. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.37, n.2, p.31-37, 2007.
- LITTARRU, G.P.; TIANO, L. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. **Nutrition**, New York, v.26, n.3, p.250-254, 2010.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Nucleic Acids Research**, Bethesda, v.29, p.2002-2007, 2001.
- LUXFORD, C.; DEAN, R.T.; DAVIES, M.J. Induction of DNA damage by oxidised amino acids and proteins. **Biogerontology**, Dordrecht, v.3, n.1-2, p.95-102, 2002.

- MANCUSO, M. et al. Coenzyme q10 in neuromuscular and neurodegenerative disorders. **Current Drug Targets**, Hilversum, v.11, n.1, p.111-121, 2010.
- MARCOFF, L.; THOMPSON, P.D. The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v.49, n.23, p.2231-2237, 2007.
- MASON, P. Potencial uses for coenzyme Q10. **The Pharmaceutical Journal**, London, v.275, p.379-382, 2005. Disponível em: www.pjonline.com. Acesso em: 01 jun. 2011.
- MATHEWS, R.T. et al. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v.18, n.1, p.156-163, 1998.
- MATTILA, P.; KUMPULAINEN. Coenzyme Q9 and Q10: Contents in foods and dietary intake. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.14, p.409-417, 2001.
- McCARTHY, S. et al. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.201, n.1, p.21-31, 2004.
- McDONALD, E.S. et al. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: A potential mechanism for neurotoxicity. **Neurobiology of Disease**, Oxford, v.18, n.2, p.305-313, 2005.
- MENDONÇA, L.M. et al. Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. **Human & Experimental Toxicology**, Houndmills, v.29, n.8, p.635-643, 2010.
- MENDONÇA, L.M. et al. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v.675, n.1-2, p.29-34, 2009.

- MIGLIORE, L. et al. Evaluation of cytogenetic and DNA damage in mitochondrial disease patients: effects of coenzyme Q10 therapy. **Mutagenesis**, Oxford, v.19, n.1, p.43-49, 2004.
- MODI, K.P. et al. Beneficial effects of coenzyme Q10 in streptozotocin-induced type I diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, Tehran, v.109, n.1, p.25-34, 2006.
- MOGI, A.; KUWANO, H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. **Journal of Medicine and Biotechnology**, Akron; Ohio, 2011, *in press*.
- MOON, Y. et al. Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. **Journal of Neurochemistry**, London, v.93, n.5, p.1199-1208, 2005.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.
- MOURA-GALO, C.V. Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.2, p.1-9, 2004.
- MULLER, T. et al. Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 341, n.3, p.201-204, 2003.
- NADERI, J. et al. Water-soluble formulation of Coenzyme Q10 inhibits Bax-induced destabilization of mitochondria in mammalian cells. **Apoptosis**, London, v.11, n.11, p.1359-1369, 2006.
- NADIN, S.B. et al. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from health individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.239, n.1, p.84-97, 2006.

- NAKAJIMA, Y. et al. Coenzyme Q10 protects retinal cells against oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. **Brain Research**, Amsterdam, v.1226, p.226-233, 2008.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24842>. Acesso em: 01 jul. 2011.
- NARUSE, T.; NISHIDA, Y.; ISHIGURO, N. Synergistic effects of meloxicam and conventional cytotoxic drugs in human MG-63 osteosarcoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v.61, n.6, p.338-346, 2007.
- NESSLANY, F. et al. In vivo comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v.630, n.1-2, p.28-41, 2007.
- NEUSTADT, J.; PIECZENIK, S.R. Medication-induced mitochondrial damage and disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v.52, n.7, p.780-788, 2008.
- OLIVIER, M. et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Human Mutation**, New York, v.19, n.6, p.607-614, 2002.
- PACE, A. et al. Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v.21, n.5, p.927-931, 2003.
- PANG, S.K. et al. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.363, n.1, p.235-240, 2007.
- PARACHIKOVA, A. et al. Formulation of a medical food cocktail for Alzheimer's disease: beneficial effects on cognition and neuropathology in a mouse model of the disease. **Public Library of Science**, San Francisco, v.5, n.11, 2010.

- PARK, C.M. et al. Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin. **International Journal of Oncology**, Athens, v.28, n.1, p.119-125, 2006.
- PIGA, R. et al. Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidants. **Neurotoxicology**, Park Forest South, v.28, n.1, p.67-75, 2007.
- QUI, J.; CAI, D.; FILBIN, M.T. Glial inhibition of nerve regeneration in mature mammalian CNS. **Glia**, New York, v.29, n.2, p.166-174, 2000.
- RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. **Chemical Reviews**, Easton, v.98, n.8, p.2723-2795, 1998.
- REITER, M. et al. Antioxidant effects of quercetin and coenzyme Q10 in mini organ cultures of human nasal mucosa cells. **Anticancer Research**, Athens, v.29, n.1, p.33-39, 2009.
- RIBEIRO, J.C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.695, n.1-2, p.22-28, 2010.
- SAITO, Y. et al. Characterization of cellular uptake and distribution of coenzyme Q10 and vitamin E in PC12 cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.20, n.5, p.350-357, 2009.
- SALAZAR, A.M.; SORDO, M.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Relationship between micronuclei formation and p53 induction. **Mutation Research**, Amsterdam, v.672, n.2, p.124-128, 2009.
- SÁNCHEZ-MARTÍN, F.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, P.M.; MERINO, J.M. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis in neural growth factor (NGF)-differentiated pheochromocytoma PC12 cells. **NeuroToxicology**, Park Forest South, v.31, n.3, p.267-276, 2010.

- SANTOS, G.C. et al. Coenzyme Q10 and its effects in the treatment of neurodegenerative diseases. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v.45, n.4, p.607-618, 2009.
- SCHMELZER, C. et al. Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression. **Biofactors**, Oxford, v.32, n.4, p.179-183, 2008.
- SCHROEDER, A. et al. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.137, n.1, p.63-68, 2009.
- SERPELONI, J.M. et al. In vivo assessment of DNA damage and protective effects of extracts from Miconia species using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis**, Oxford, v.23, n.6, p.501-507, 2008.
- SHULTS, C.W. Coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n.19, p.1917-1921, 2003.
- SIKORSKA M. et al. Derivatized alpha-tocopherol as a CoQ10 carrier in a novel water-soluble formulation. **Biofactors**, Oxford, v.18, n.4, p.173-183, 2003.
- SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.175, n.1, p.184-191, 1988.
- SLOTKIN, TA; SEIDLER, FJ. Oxidative stress from diverse developmental neurotoxicants: Antioxidants protect against lipid peroxidation without preventing cell loss. **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v.32, n.2, p.124-131, 2010.
- SOHAL, R. S.; FORSTER, M. J. Coenzyme Q, oxidative stress and aging. **Mitochondrion**, Amsterdam, v.7, p.S103-S111, 2007. Supplement.

- SOMAYAJULU, M. et al. Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10. **Neurobiology of Disease**, Oxford, v.18, n.3, p.618-627, 2005.
- SOUSSI, T. The p53 pathway and human cancer. **British Journal of Surgery**, Bristol, v.92, n.11, p.1331-1332, 2005.
- SPINDLER, M.; BEAL, MF.; HENCHCLIFFE, C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. A review. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, Albany, v.5, p.597-610, 2009.
- SUN-ELDELSTEIN, C.; MAUSKOP, A. Alternative headache treatments: nutraceuticals, behavioral and physical treatments. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, Mount Royal, v.51, n.3, p.469-483, 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/>. Acesso em: 14 jun. 2011.
- TENG, K.K.; GREENE, L.A. Cultured PC12 cell: a model for neuronal function and differentiation. **Cell biology: a laboratory handbook**. San Diego: Academic Press Inc, p.218-224, 1994.
- TIANO, L. et al. Coenzyme Q10 and oxidative imbalance in Down syndrome: biochemical and clinical aspects. **Biofactors**, Oxford, v.32, n.1-4, p.161-167, 2008.
- TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.35, n.3, p.206-221, 2000.
- TICE, R.R.; STRAUSS, G. H. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. **Stem Cells**, New York, v.13, n.1, p.207-214, 1995.
- TISCHLER, A.S.; POWERS, J.F. Culturing pheochromocytoma cells. **Cell Biology of the Chromaffin Cell**, Laguna, p.187-190, 2004.

- TOMASETTI, M. et al. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.27, n.9-10, p.1027-1032, 1999.
- VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, **BioTechniques**, London, v.44, n.5, p.619-626, 2008.
- VERSTAPPEN, C.C.P. et al. Amifostine protects against chemotherapy-induced neurotoxicity: An *in vitro* investigation. **Anticancer Research**, Athens, v.24, n.4, p.2337-2342, 2004.
- VERSTAPPEN, C.C.P. et al. In vitro protection from cisplatin-induced neurotoxicity by amifostine and its metabolite WR1065. **Journal of Neuro-Oncology**, Boston, v.44, n.1, p.1-5, 1999.
- WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews**, London, v.4, n.4, p.307-320, 2005.
- WANG, H. et al. Administration of PUMA adenovirus increases the sensitivity of esophageal cancer cells to anticancer drugs. **Cancer Biology & Therapy**, Georgetown, v.5, n.4, p.380-385, 2006.
- WANG, X. et al. Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.95B, n.2, Hoboken, p.357-364, 2010.
- WEBER, C.; BYSTED, A.; HOLMER, G. The coenzyme Q10 content of the average Danish diet. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.67, n.2, p.123-129, 1997.
- WĘGLARZ, L. et al. Quantitative analysis of the level of p53 and p21WAF1 mRNA in human colon cancer HT-29 cells treated with inositol hexaphosphate. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v.53, n.2, p.349-356, 2006.

- WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v.23, n.4, p.209-240, 1997.
- WITTE, I. et al. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, Oxford, v.97, n.1, p.21-26, 2007.
- WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v.147, n.3, p.309-318, 2004.
- XIE, X. et al. Enhancement effect of adenovirus-mediated antisense c-myc and caffeine on the cytotoxicity of cisplatin in osteosarcoma cell lines. **Chemotherapy**, New York, v.55, n.6, p.433-440, 2009.
- YANG, L. et al. Combination therapy with Coenzyme Q10 and creatinine produces additive neuroprotective effects in models of Parkinson's and Huntington's Diseases. **Journal of Neurochemistry**, London, v.109, n.5, p.1427-1439, 2009.
- YOO, Y-E. et al. Iron enhances NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. **Molecules and Cells**, Seoul, v.17, n.2, p.340-346, 2004.
- ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? **Mutation Research**, Amsterdam, v.626, n.1-2, p.1-3, 2007.
- ZHOU, L. et al. Normalization with genes encoding ribosomal proteins but not GAPDH provides an accurate quantification of gene expressions in neuronal differentiation of PC12 cells. **BMC Genomics**, London, v.11, n.75, p.1-13, 2010.