UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina: estudo dos mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina e do efeito protetor do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em células PC12

Rafaela Scalco Ferreira

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina: estudo dos mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina e do efeito protetor do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em células PC12

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Rafaela Scalco Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardoso dos Santos

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ferreira, Rafaela Scalco

Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina: estudo dos mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina e do efeito protetor do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em células PC12. Ribeirão Preto, 2018.

134 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Santos, Antonio Cardoso

1. Cisplatina. 2. Neuropatia Sensorial Periférica.
3. CAPE. 4. Neuroproteção. 5. Neuritogênese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaela Scalco Ferreira

Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina: estudo dos mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina e do efeito protetor do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em células PC12.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardoso dos Santos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho aos meus pais, Ronaldo e Marlene, pelo incentivo e apoio incondicional, aos meus irmãos, Gabriela e Olavo, pelo carinho, companheirismo e amizade, e ao meu namorado Cleber, pelo cuidado, dedicação e amor.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que em toda sua infinita grandeza sempre me protegeu e me guiou em todas as decisões, tornando-me apta a conduzir e concluir este trabalho. Em todos os momentos, sentia Tua presença diante de mim, com Tua milagrosa mão tocando e acalmando meu coração, me fornecendo sabedoria e perseverança para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Ronaldo e Marlene por acreditarem em mim e por não medirem esforços para que eu realize todos meus sonhos. Agradeço todo o amor, o apoio incondicional, a paciência e a dedicação de vocês. Palavras não conseguem expressar toda a gratidão e a admiração que tenho por vocês. Vocês são meu exemplo de vida. Tudo que eu faço nessa vida é para vocês e por vocês! Obrigada por tudo que vocês proporcionam para nossa família!

Aos meus irmãos, Gabriela e Olavo, pelo amor e carinho dedicados a mim. Mesmo estando longe todos esses anos, vocês se fizeram presentes no meu dia a dia. Agradeço cada gesto de amor, de cuidado, todas as manifestações de saudade, todos os incentivos e orações. Obrigada por serem irmãos tão zelosos. Amo vocês!

Ao meu namorado Cleber, por todo amor, carinho, dedicação e cuidado. Agradeço a paciência e a compreensão, principalmente no período em que ficamos longe um do outro, quando fui aos Estados Unidos fazer o Doutorado Sanduíche. Foram dias de muitas saudades, mas o seu incentivo e seu apoio foram fundamentais para a conclusão de mais uma etapa da minha vida. Obrigada por fazer parte dela!

A todos da minha família, especialmente aos meus avós Alaor, Maria Tereza (*in memoriam*), Ana e Luiz, aos meus cunhados Guilherme e Eduarda e a todos os tios, tias, primos e primas que sempre torceram por mim. Obrigada por todas as orações, carinho, incentivo e atenção de vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Cardoso dos Santos, pela oportunidade e confiança depositada em mim. Obrigada pela orientação, pelos inestimáveis ensinamentos e por acreditar no meu trabalho. Todos os conhecimentos e as experiências compartilhadas representaram a base para minha formação profissional e, sem dúvida, foram essenciais para o meu crescimento.

À Neife, por toda ajuda e atenção dedicadas a mim. Obrigada por não me deixar desistir todas as vezes em que os experimentos davam errados. Sua presença diária foi de fundamental importância e seus sábios conselhos e experiências ajudaram a nortear este trabalho. Obrigada pela confiança depositada em mim.

As minhas queridas amigas de laboratório Lais, Flávia, Carol, Rebeca, Lilian e Taisa, pelo apoio diário e por serem tão prestativas. Obrigada por tornarem a rotina diária em momentos descontraídos e prazerosos. Agradeço a presença em todas as nossas "gordices", em todos os momentos felizes e, principalmente, pelo apoio nas horas difíceis. Agradeço a amizade e companheirismo de vocês.

Um agradecimento em especial à Nádia, a primeira pessoa que me acolheu desde o início no laboratório. Agradeço todo o conhecimento transmitido, toda sua paciência e por estar sempre disposta a me ajudar. Do primeiro contato, passando pelas primeiras ajudas nos experimentos e a convivência diária, fez surgir uma bela amizade. Obrigada por tudo!

À Gilda, que desde quando chegou ao laboratório, foi como uma verdadeira mãe. Agradeço de coração toda a sua preocupação, seu carinho, sua atenção e todos seus abraços diários de bom dia! Toda sua ajuda e seu esforço em manter o laboratório organizado foram essenciais para a condução deste trabalho.

Aos amigos de longa data, Nicole e Samir, que também estiveram presentes durante todos esses anos em Ribeirão. Todos os momentos que vivemos juntos foram especiais e marcaram minha vida. Obrigada por toda a atenção, preocupação e cuidado que tiveram comigo. Agradeço a amizade sincera de vocês!

Aos novos amigos que tive o prazer de conhecer em Ribeirão Preto, em especial à Valéria e ao Daniel. Um casal sensacional que me proporcionou momentos de muita alegria. Que a chegada da Julinha nos proporcione ainda mais vários momentos felizes. Obrigada por todo carinho e atenção dedicados a mim!

As minhas companheiras de apartamento, Nicole e Carla, por todo companheirismo, amizade e respeito ao longo de todos esses anos. Nika, eu não tenho palavras para expressar a gratidão por tudo que você fez e faz por mim. Sou muito grata por ter essa pessoa agradável, carinhosa e tão amorosa ao meu lado durante todos esses anos.

Sua amizade foi essencial em todos as conquistas da minha vida, desde nossa graduação em Alfenas. Obrigada por fazer parte de todos elas!

A todos os funcionários da FCFRP-USP por todo apoio e assistência, em especial à Rose, pela competência, disponibilidade, conversas, carinho e atenção com que sempre fui recebida.

À Andréia C.K. Mortensen, pela disponibilidade em me receber no seu laboratório na Drexel University College of Medicine, durante a realização do meu Doutorado Sanduíche na Filadélfia, Pensilvânia, EUA. Agradeço a oportunidade de poder ter vivenciado esta experiência em um outro país. Todos as técnicas, os procedimentos e os conhecimento adquirido durante os 4 meses que passei no seu laboratório foram fundamentais e contribuíram não só para minha formação profissional, como também para o crescimento pessoal. Era a primeira vez que fazia uma viagem internacional e a forma como fui recebida e tratada durante esses meses, fez com que o medo passasse e tudo foi tão simples que não há palavras para expressar minha gratidão. Agradeço também Ole Mortensen, marido de Andréia e pesquisador na Drexel, por toda ajuda concedida durante o período nos EUA. Agradeço também todos os membros dos laboratórios da Andréia e do Ole, em especial a Stacia Lewandowski, Ryan Wertz, Shaili Aggarwal, Xiaonan Liu, Wasim Kabir e Srawasti Sarker, com os quais tive o prazer de conviver diariamente no laboratório. Muito obrigada por toda a ajuda e paciência de vocês.

As minhas queridas amigas da Artilharia Philly, Mariana, Camila, Tais, Samantha e Larissa. Uma amizade linda que nasceu nos EUA e vai ser levada para o resto da vida. Durante todos os meses fora, vocês foram minha família, meu refúgio nos momentos de saudade de casa. Vivemos ótimos momentos juntas que certamente marcaram a minha vida. Obrigada, de coração, pelo apoio e pelo companheirismo de vocês. Amo muitos vocês. Espero um dia poder reencontrá-las!

Um grande agradecimento também às agências financiadoras CNPq (processo 140106/2015-4) e CAPES (bolsa Doutorado Sanduíche) pelo apoio financeiro concedido. Este apoio foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, à todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

“O dinheiro faz homens ricos, o conhecimento faz homens sábios e a humildade faz grandes homens”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

FERREIRA, R. S. **Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina: estudo dos mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina e do efeito protetor do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em células PC12.** 2018. 134f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Cisplatina é um agente quimioterápico altamente eficaz utilizado no tratamento de vários tipos de câncer. No entanto, seu uso clínico é limitado por ser o mais neurotóxico entre os derivados de platina. A neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina é caracterizada pela degeneração distal dos axônios podendo progredir para a degeneração dos corpos celulares e apoptose. O mecanismo de ação tóxica tem sido associado aos danos no DNA, mas a cisplatina também pode interferir no crescimento de neuritos. No entanto, o mecanismo neurotóxico ainda permanece incerto. Embora vários compostos tenham demonstrado efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida pela cisplatina, nenhum tratamento efetivo foi desenvolvido. O éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) é um composto fenólico extraído da própolis, cujo efeitos neuroprotetores tem sido atribuído às suas propriedades antioxidantes. Do contrário, poucos estudos avaliam o potencial neurotrófico do CAPE como uma possível fonte de proteção. Sendo assim, no presente estudo foram investigados os mecanismos pelos quais a cisplatina induz neurotoxicidade, bem como o possível efeito neuroprotetor do CAPE e os mecanismos envolvidos na neuroproteção. Os resultados demonstraram que os efeitos neurotóxicos da cisplatina foram induzidos por uma concentração não citotóxica (5 µM), a qual foi capaz de inibir o crescimento de neuritos e reduzir a expressão das proteínas neuronais (GAP-43, sinapsina I e sinaptofisina) e do citoesqueleto (NF-200, β-III-tubulina e F-actina) em células PC12 sem induzir dano mitocondrial, apoptose e estresse oxidativo. Neste estágio, a neurotoxicidade da cisplatina não foi mediada pelo NGF e nem pelos receptores trkA, sugerindo um mecanismo independente da via NGF/trkA. A diminuição da captação da glicose induzida pela cisplatina, pode estar associada à redução na expressão das proteínas relacionadas ao estado energético, sugerindo que a regulação negativa da AMPK α, da fosfo-AMPK α e da SIRT1 podem estar envolvidas no mecanismo de neurotoxicidade da cisplatina. A cisplatina também inibiu a captação do glutamato via EAAT2 de uma maneira não específica, sugerindo que outros processos podem ser modulados e participarem desta inibição. O CAPE atenuou os efeitos inibitórios da cisplatina sobre a diferenciação celular, sobre os marcadores da neuroplasticidade axonal (GAP-43, sinapsina I e sinaptofisina), sobre as proteínas do citoesqueleto (NF-200, β-III-tubulina e F-actina) e também sobre os marcadores do perfil energético (AMPK α, da fosfo- AMPK α e da SIRT1). O CAPE também aumentou a viabilidade das células PC12 expostas à IC_{50} da cisplatina. O mecanismo neuroprotetor do CAPE é independente e não aditivo ao efeito do NGF, pode envolver a ativação dos receptores trkA, bem como das vias de sinalização neurotrófica MAPK/Erk e PI3K/Akt. Tais resultados sugerem a contribuição da neuroplasticidade no mecanismo de neuroproteção do CAPE contra a neurotoxicidade induzida pela cisplatina.

Palavras-chave: Cisplatina, Neuropatia sensorial periférica, CAPE, Neuroproteção, Neuritogênese.

ABSTRACT

FERREIRA, R. S. **Peripheral sensory neuropathy induced by cisplatin: study of the mechanisms of neurotoxicity of cisplatin and the protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on PC12 cells.** 2018. 134f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Cisplatin is a highly effective chemotherapeutic agent that is used in the treatment of several types of cancer. However, its clinical use is limited because it is the most neurotoxic among platinum compounds. Peripheral sensory neuropathy induced by cisplatin is characterized by distal axonal degeneration that might progress to degeneration of cell bodies and apoptosis. The toxic mechanism of cisplatin has been mainly associated with DNA damage, but cisplatin might also affect nerite outgrowth. Nevertheless, the neurotoxic mechanism of cisplatin remains unclear. Although many compounds have demonstrated protective effect against the neurotoxicity induced by cisplatin, no effective treatment has been developed. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is a propolis component with neuroprotective effects mainly attribute to antioxidant properties. On the other hand, there are few studies addressing the neurotrophic potential of CAPE as a possible source of protection. Thus, the present study investigated the mechanism by which cisplatin induces neurotoxicity, as well as the possible neuroprotective effect of CAPE and the mechanisms involved in neuroprotection. According to the results, the neurotoxic effects of cisplatin were induced by a non-cytotoxic concentration (5 µM), which was able to inhibit the neurite outgrowth and reduce the expression of neuronal proteins (GAP-43, synapsin I and synaptophysin), and cystoskeleton (NF-200, β-III-tubulin and F-actin) in PC12 cells, without inducing mitochondrial damage, apoptosis and oxidative stress. At this stage, the neurotoxicity of cisplatin was not mediated by NGF or trkA receptors, suggesting a NGF/trkA independent mechanism. Decreased cisplatin-induced glucose uptake might be associated with reduced expression of energy-related proteins, suggesting that downregulation of AMPK α, phospho-AMPK α and SIRT1 expression might be involved in the neurotoxicity mechanism of cisplatin. Cisplatin also inhibited glutamate uptake via EAAT2 in a non-specific manner, suggesting that other processes can be involved in this modulation, resulting in uptake inhibition. CAPE attenuated the inhibitory effects of cisplatin on cell differentiation, on axonal neuroplasticity markers (GAP-43, synapsin I and synaptophysin), on cystoskeleton proteins (NF-200, β-III-tubulin and F-actin) and also on energy profile markers (AMPK α, phospho-AMPK α and SIRT1). CAPE also increased the viability of PC12 cells exposed to IC50 of cisplatin. The neuroprotective mechanism of CAPE is not dependent on NGF nor is it additive to the effect of NGF, but might involve the activation of trkA receptors, as well as the neurotrophic signaling MAPK/Erk and PI3K/Akt pathways. These results suggest the contribution of neuroplasticity in the neuroprotection mechanism of CAPE against cisplatin-induced neurotoxicity.

Keywords: Cisplatin, Peripheral Sensory Neuropathy, CAPE, Neuroprotection, Neuritogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isômeros cisplatina (esquerda) e transplatina (direita) 1

Figura 2. Mecanismo de ação da cisplatina 4

Figura 3. Representação da distribuição “meias e luvas” típica da neuropatia periférica induzida pela cisplatina.....7

Figura 4. Origem da neurotoxicidade 10

Figura 5. Sinalização glutamatérgica sob condições fisiológicas (A) e (B) excitotóxicas.....14

Figura 6. Eventos iniciais no crescimento de neuritos.....18

Figura 7. Estrutura química do CAPE.....25

Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de cisplatina (1 – 100 µM) sobre a diferenciação em células PC12 após 72 h de incubação. 47

Figura 9. Citotoxicidade de diferentes concentrações de cisplatina (MTT). 48

Figura 10. Curva dose-resposta da cisplatina: curva não-linear da viabilidade celular (%) versus log da concentração de cisplatina (µM).....49

Figura 11. Citotoxicidade da cisplatina (LDH).....50

Figura 12. Efeito da cisplatina 5 µM sobre a atividade da caspase-3.....51

Figura 13. Efeito da cisplatina sobre a formação de ERO.....52

Figura 14. Efeito da cisplatina (5 µM) e/ou CAPE (10 µM) sobre a formação de ERO após 72 horas de incubação a 37ºC 53

Figura 15. Efeito da adição simultânea de cisplatina 5µM e ácido retinóico 10 µM sobre a diferenciação de células SH-SY5Y.....55

Figura 16. Efeito do pré-tratamento (24h) com cisplatina 5 µM sobre a diferenciação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas ao ácido retinóico. 56

Figura 17. Efeito da cisplatina sobre a captação de glutamato 58

Figura 18. Curva dose-resposta da cisplatina em células HEK. 60

Figura 19. Curva dose-resposta da cisplatina em astrócitos (Ensaio A). 62

Figura 20. Curva dose-resposta da cisplatina em astrócitos (Ensaio B). 63

Figura 21. Efeito de diferentes concentrações do CAPE (1- 50 µM) contra a inibição da diferenciação celular induzida pela CIS (5 µM). 65

Figura 22. Imagens digitalizadas obtidas por microscopia de contraste de fase (400x) mostrando as mudanças morfológicas em células PC12 após 72h de incubação. 66

Figura 23. Efeito de diferentes concentrações de CAPE sobre a viabilidade das células PC12 expostas à CIS 32 µM (IC_{50}). 67

Figura 24. Efeito da cisplatina e do CAPE na expressão do GAP – 43 em células PC12. 68

Figura 25. Efeito da cisplatina e do CAPE na expressão da sinapsina I em células PC12. 69

Figura 26. Efeito da cisplatina e do CAPE na expressão da sinaptofisina em células PC12. 70

Figura 27. Expressão da F-actina nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE. 71

Figura 28. Expressão da β-III-Tubulina nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE**.** 72

Figura 29. Efeito intrínseco do CAPE na expressão da F-actina em células PC12. .73

Figura 30. Efeito intrínseco do CAPE na expressão da β-III-Tubulina em células PC12. 74

Figura 31. Efeito da cisplatina e do CAPE sobre o neurofilamento-200 em células PC12. 75

Figura 32. Expressão de SIRT-1 nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE. 77

Figura 33. Expressão de AMPK α nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE. 78

Figura 34. Expressão de Fosfo-AMPK α nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE. 79

Figura 35. Efeito do CAPE na expressão de SIRT-1 em células PC12. 80

Figura 36. Efeito do CAPE na expressão de AMPK α em células PC12. 81

Figura 37. Efeito do CAPE na expressão de Fosfo-AMPK α em células PC12. 82

Figura 38. Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a captação de glicose. 83

Figura 39. Efeito do CAPE 10 µM sobre a diferenciação de células PC12 pré-tratadas com K252a (inibidor do receptor trkA). 85

Figura 40. Efeito do CAPE 10 µM sobre a diferenciação de células SH-SY5Y. 87

Figura 41. Efeito do NGF e do CAPE 10 µM sobre a diferenciação de células PC12 pré- tratadas com LY294002 (inibidor da via PI3K/Akt).....89

Figura 42. Efeito do NGF e do CAPE 10 µM na diferenciação de células PC12 pré-tratadas com U0126 (inibidor MEK1/2). 91

Figura 43. Efeito do CAPE sobre a diferenciação celular em células PC12 na ausência e presença de NGF.....93

Figura 44. Efeito da associação de CAPE e NGF sobre a expressão do GAP – 43 em células PC12. 95

Figura 45. Efeito da associação de CAPE e NGF sobre a expressão da sinapsina I em células PC12. 96

Figura 46. Efeito da associação de CAPE e NGF sobre a expressão da sinaptofisina em células PC12. 97

Figura 47. Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a expressão de NGF em células PC12 após 72h de incubação. 98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Proteína quinase dependente de AMP cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
AR	Ácido retinóico
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fatores neurotróficos derivados do cérebro
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblasto
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Soro-albumina bovina
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CAEE	Éster etil do ácido cafeico
CAME	Éster metil do ácido cafeico
CaMK	Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina
CAPE	Éster fenetil do ácido cafeico
CIS	Cisplatina
CMV	Vetor vazio de citomegalovírus humano
CPM	Contagens por minuto
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
CTCF	Fluorescência celular total corrigida
Ctr1	Transportador de cobre de alta afinidade
DCFH-DA	2,7 diclorodihidro fluoresceína diacetato
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
EAAT	Transportador aminoácidos excitatório
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro fetal bovino
FDA	American Food and Drug Administration

GAP-43	Proteína 43 associada ao crescimento
GCPII	Glutamato carboxipeptidase II
GLUT	Transportadores de glicose
GRD	Gânglio da raiz dorsal
GSH	Glutationa reduzida
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
ILGFs	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
KRH	Krebs-ringer hepes
LDH	Enzima lactato-desidrogenase
LPS	Lipopolisacarídeo
MAPs	Proteínas associadas aos microtúbulos
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MPP^+	Íon 1-Metil-4-fenilpiridíneo
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAC	Acetilcisteína
NAD^+	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina – forma oxidada
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina – forma reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-200	Neurofilamento de 200 kda
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa β
NGF	Fator de crescimento neuronal
NMDA	N-metil D-aspartato
PBS	Tampão fosfato-salino
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
rhNGF	NGF humano recombinante
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIRT1	Sirtuina 1
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Enzimas superóxido dismutase

TBOA	Inibidor do transportador de glutamato
trk	Receptores tirosina quinase
trkA	Receptores tropomiosina quinase A
trkB	Receptores tropomiosina quinase B

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
k	Kappa

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vi
LISTA DE SÍMBOLOS ix

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Cisplatina 1
1.2 Farmacocinética e Farmacodinâmica da cisplatina 2
1.3 Limitações no uso clínico da cisplatina 5
1.4 Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina 6
1.5 Mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina 8
1.5.1 Degeneração axonal - Vulnerabilidade do Sistema Nervoso Periférico (SNP) ... 8
1.5.2 Dano neuronal oxidativo, disfunção mitocondrial e os prejuízos no metabolismo energético 10
1.5.3 Excitotoxicidade do glutamato 12
1.6 Marcadores do perfil celular energético 15
1.7 Neuritogênese 17
1.7.1 Proteínas neurotípicas características da neuritogênese 18
1.7.2 Células PC12 como modelo de diferenciação celular 21
1.8 Neuroproteção 22
1.8.1 Estratégias de prevenção e tratamento da neuropatia induzida pela cisplatina 23
1.9 Éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) 24

2. OBJETIVOS 26

3. MATERIAIS E MÉTODOS 27
3.1 Reagentes 27
3.2 Cultura Celular 27
3.2.1 Células PC12 27
3.2.2 Células SH-SY5Y 28
3.3 Contagem em câmara de Neubauer 28
3.4 Determinação da concentração de trabalho 29

3.4.1 Cisplatina.....29
3.4.2 CAPE.....29
3.5 Ensaios de Citotoxicidade 30
3.5.1 Ensaio de redução do MTT – Curva Dose-Resposta da Cisplatina 30
3.5.2 Atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDH) 30
3.5.3 Ensaio do MTT – Proteção do CAPE contra a citotoxicidade da cisplatina.....31
3.6 Determinação da Caspase – 3 31
3.7 Espécies reativas de oxigênio (ERO) 32
3.8 Diferenciação Celular: Ensaio Quantitativo em células PC12 33
3.9 Diferenciação Celular: Ensaio Quantitativo em linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano.....33
3.9.1 Efeito da cisplatina sobre a diferenciação das células SH-SY5Y 33
3.9.2 Efeito do CAPE sobre a diferenciação das células SH-SY5Y 34
3.10 Análise de Sinapsina I, Sinaptofisina e GAP-43 por Western Blot 35
3.10.1 Preparo do Lisado celular.....35
3.10.2 Dosagem de Proteínas do lisado celular (Bradford).....35
3.10.3 Eletroforese (SDS-PAGE) 36
3.10.4 Transferência 36
3.10.5 Reação imune 36
3.11 Análise de F- actina e β-III Tubulina por Western Blot 37
3.11.1 Reação imune 37
3.12 Análise de SIRT-1, AMPK α e FOSFO-AMPK α por Western Blot.....37
3.12.1 Lisado celular 37
3.12.2 Reação imune 38
3.13 Determinação dos níveis de NGF 38
3.14 Imunofluorescência para Neurofilamento-200.....39
3.15 Captação de Glicose 40
3.16 Ensaio inibição dos receptores de trkA em células PC12 41
3.17 Ensaio com inibidores específicos das vias de sinalização celular 41
3.18 Transfecção de transportadores de glutamato EAAT2 em células COS-7.....42
3.18.1 Transformação de bactérias para produção de DNA 42
3.18.2 Ensaios de transfecção em células COS-7 43
3.18.3 Ensaio de captação de neurotransmissores.....44
3.19 Ensaio da captação de glutamato em células HEK.....44
3.19.1 Ensaio de captação de neurotransmissores.....45
3.20 Ensaio da captação de glutamato em astrócitos (glia) 45
3.20.1 Ensaio de captação de neurotransmissores.....46

3.21 Análise Estatística 46

4. RESULTADOS.....47
4.1 Efeito da cisplatina na diferenciação de células PC12 47
4.2 Citotoxicidade da cisplatina – MTT e LDH.....48
4.3 Efeito da cisplatina sobre a atividade da caspase-3.....51
4.4 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....51
4.5 Efeito da CIS (5 µM) sobre a diferenciação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y 54
4.6 Efeitos da cisplatina sobre a captação de glutamato 57
4.6.1 Efeito da cisplatina sobre a captação de glutamato em células (COS-7) com transfecção transiente 57
4.6.2 Efeito da cisplatina sobre a captação de glutamato em células HEK 59
4.6.3 Efeito da cisplatina sobre a captação de glutamato em astrócitos (ou glia) 61
4.7 Determinação da concentração de trabalho do CAPE – Diferenciação de células PC12 64
4.8 Proteção do CAPE contra a morte celular induzida pela IC_{50} da cisplatina.....67
4.9 Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a expressão do GAP-43, sinapsina I e sinaptofisina 68
4.10 Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a expressão da F-actina e β-III tubulina.71
4.11 Efeito intrínseco do CAPE na expressão das proteínas do citoesqueleto 73
4.12 CAPE minimizou o efeito inibitório da CIS sobre o neurofilamento (NF-200)....75
4.13 Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a expressão de SIRT-1, AMPK α e FOSFO-AMPK α 77
4.14 Efeito intrínseco do CAPE sobre a expressão de SIRT-1, AMPK α e Fosfo-AMPK α 80
4.15 Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a captação de glicose 83
4.16 A diferenciação celular induzida pelo CAPE nas células PC12 foi inibida pelo K252a.....84
4.17 Efeito do CAPE na diferenciação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y 87
4.18 Inibidores específicos das vias de sinalização neurotrófica: PI3K/Akt (LY294002) e MAPK (U0126) 89
4.19 O efeito neuritogênico do CAPE não é aditivo ao efeito do NGF 93
4.20 Efeito do CAPE sobre a expressão das proteínas axonais em células PC12 na presença e na ausência de NGF.....95
4.21 Efeitos da cisplatina e do CAPE sobre a expressão de NGF 98

5. DISCUSSÃO 99

6. CONCLUSÃO 115

REFERÊNCIAS.....116

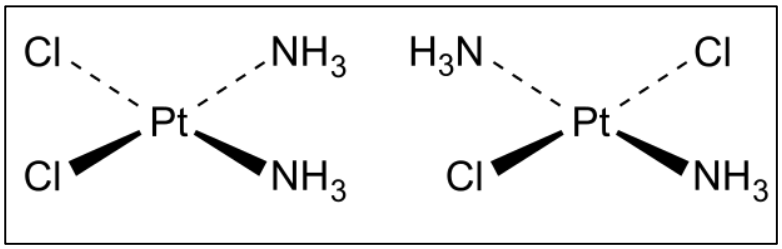
1. INTRODUÇÃO

1.1 Cisplatina

O grande impacto provocado pela cisplatina (*cis*-diaminodicloroplatina II) no tratamento do câncer é um paradigma no uso de metais na medicina. A cisplatina foi o primeiro metal pesado a ser utilizado como agente antineoplásico e, desde a sua aprovação em 1978, é um dos agentes quimioterápicos mais utilizados na terapia oncológica (CEPEDA et al., 2007; KELLAND, 2007; CHIORAZZI; SEMPERBONI; MARMIROLI, 2015). Possui um amplo espectro de ação contra vários tipos de câncer, podendo ser administrada sozinha ou em associação com outros agentes antineoplásicos (MACCIO; MADEDDU, 2013).

A propriedade antineoplásica da cisplatina foi descoberta ao acaso, cerca de 125 anos após a síntese e a caracterização de sua estrutura química (CEPEDA et al., 2007). Em um experimento realizado em 1965, Rosenberg observou que a aplicação de um campo elétrico em eletrodos de platina imersos em solução aeróbica de *Escherichia coli* promovia o crescimento filamentoso bacteriano sem que houvesse a multiplicação do número de células. Os eletrodos de platina liberavam, por meio de reação redox, alguns complexos platínicos, os quais eram responsáveis por tal efeito. Dentre os complexos platínicos, verificou-se que o complexo bivalente *cis*-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ ou cisplatina, era ativo, e seu isômero *trans*, era inativo (Figura 1) (ROSENBERG; VANCAMP; KRIGAS, 1965; ROSENBERG et al., 1969).

Figura 1. Isômeros cisplatina (esquerda) e transplatina (direita)



Desde a identificação da cisplatina como o agente responsável pelo efeito antiproliferativo, foi despertado um interesse considerável no uso de tais complexos para o tratamento do câncer. Aprovado em 1978 pelo FDA (*American Food and Drug Administration*), o uso clínico da cisplatina revolucionou o tratamento do câncer de testículos, elevando o percentual de cura para mais de 90%, podendo atingir 100% nos casos de detecção precoce (WANG; LIPPARD, 2005). Desde então, a cisplatina é um dos agentes quimioterápicos mais utilizados na América do Norte e na Europa (CHABNER; LONGO, 2006), para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o de ovário, o carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês *"No Small Cell Lung Cancer"*), câncer de cabeça e pescoço, bexiga, melanoma, linfomas, câncer de cólon e gástrico (CHABNER; LONGO, 2011; AMABLE, 2016).

1.2 Farmacocinética e Farmacodinâmica da cisplatina

O mecanismo de ação anticâncer da cisplatina se inicia com a entrada na célula, pois a passagem pela membrana celular é necessária para que possa ocorrer a interação com o seu alvo, o DNA nuclear (JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2015). O mecanismo bioquímico pelo qual a cisplatina atravessa a membrana celular ainda é incerto. Estudos iniciais sugeriam que a cisplatina entraria nas células principalmente por difusão passiva, uma vez que sua captação prosseguia linearmente com o tempo em mais de 60 minutos, não saturando até uma concentração de 1,0 mM. Além disso, a sua absorção não era inibida pelos seus análogos estruturais, e a entrada nas células não dependia de um pH ótimo (HROMAS; NORTH; BURNS, 1987; BINKS; DOBROTA, 1990; MANN; ANDREWS; HOWELL, 1991). No entanto, estudos mais recentes demonstraram que parte da absorção de cisplatina dependia de energia. Tais observações apontavam para uma conexão direta entre as concentrações celulares de cobre e platina, propondo um transporte ativo pelo transportador de cobre de alta afinidade Ctr1 (WANG; LIPPARD, 2005; CEPEDA et al., 2007). Adicionalmente, os compostos platínicos podem, ativamente, entrar nas células normais e tumorais através de transportadores catiônicos orgânicos e transportadores de carnitina (AVAN et al., 2015).

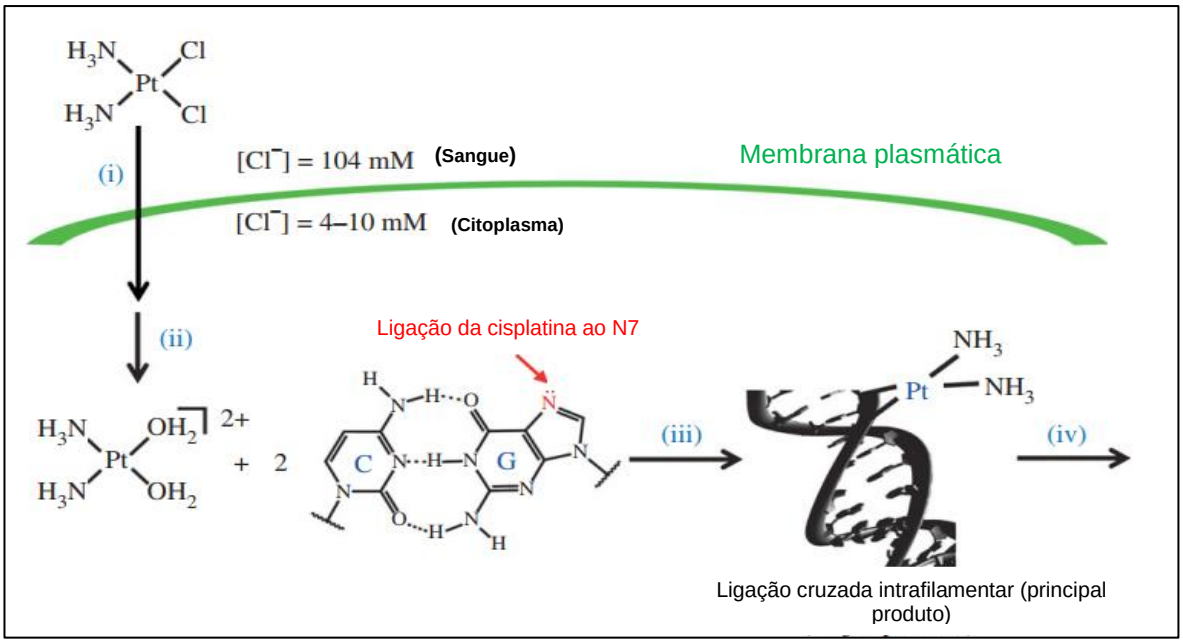
Uma vez na corrente sanguínea, mais de 90% da cisplatina liga-se de modo covalente às proteínas plasmáticas. A fração não ligada, composta principalmente pelo fármaco original, diminui em poucos minutos. Altas concentrações de cisplatina

são encontradas nos rins, fígado, intestino e testículos. Apenas uma pequena parte do fármaco é excretada pelos rins durante as primeiras 6 horas e, em 24 horas, são excretados 25% e, em cinco dias, até 43% da cisplatina administrada é recuperada na urina. A excreção biliar e intestinal da cisplatina é mínima (BRUNTON, 2012).

A cisplatina é um fármaco de configuração plana, possuindo um átomo central de platina ligado a dois átomos de cloro e dois grupos amônia. A presença de íons cloreto no plasma e nas células modula a reatividade da cisplatina. Os dois átomos de cloro são estáveis na corrente sanguínea. Fora das células, a concentração de íons cloreto é cerca de 100 mM, enquanto no interior da célula, a concentração varia de 2 a 30 mM. A baixa concentração intracelular dos íons cloreto facilita o processo de ativação da cisplatina, isto é, moléculas de água podem substituir um ou os dois íons cloretos da molécula da cisplatina, resultando na formação de complexos aquosos carregados positivamente e altamente reativos (ALI; AL MOUNDHRI, 2006). Assim, o efeito antineoplásico da cisplatina depende da sua hidrólise intracelular, com consequente formação de dois metabólitos altamente reativos, mono-cloro-mono-aquo-diamino-platino e diaquo-diamino-platino (Figura 2) (LIPPARD, 1987; JAMIESON; LIPPARD, 1999; WANG; LIPPARD, 2005).

Os metabólitos resultantes da hidrólise intracelular da cisplatina são mais reativos aos alvos celulares. Embora a cisplatina interaja com outros componentes celulares, o DNA é o alvo biológico primário (JAMIESON; LIPPARD, 1999). O átomo central de platina se liga covalentemente a posição N^7 das bases purínicas, formando ligações cruzadas intra (maior proporção) e interfilamentares (menor proporção). A formação dos adutos DNA-cisplatina desencadeia uma série de respostas celulares tais como: inibição da replicação, inibição da transcrição, paralisação do ciclo celular, reparo do DNA e morte apoptótica das células (Figura 2) (WANG; LIPPARD, 2005). Menos de 1% da lesão celular induzida pela cisplatina está relacionada às ligações DNA-proteínas, enquanto as ligações cruzadas intrafilamentares entre o DNA e a cisplatina, representam as lesões mais frequentes. Neste contexto, a cisplatina frequentemente está mais ligada a sítios do DNA contendo bases purínicas, principalmente entre duas guaninas adjacentes (65%), uma adenina e uma guanina adjacente (25%) ou com duas guaninas separadas por uma ou duas bases (9%) (BURSTYN et al., 2000).

Figura 2. Mecanismo de ação da cisplatina



Legenda: (i) captação celular; (ii) ativação da cisplatina; (iii) interação com DNA; (iv) processos celulares resultando em apoptose. Adaptado de Johnstone, Suntharalingam e Lippard (2015).

A interrupção da progressão do ciclo celular é uma resposta comum quando as células sofrem danos no DNA, e possibilitam que tal dano seja reparado antes de ser transmitido para as células filhas. Quando as células são expostas à cisplatina, o dano provocado no DNA induz a paralisação do ciclo celular na fase G2, o que é essencial para induzir apoptose após a exposição à cisplatina (SORENSON; EASTMAN, 1988; WANG; LIPPARD, 2005). A principal forma de reparar o dano induzido pela cisplatina no DNA é o reparo por excisão de nucleotídeos (WANG; LIPPARD, 2005). Se o dano não puder ser reparado, as células iniciam o processo de morte celular programada conhecido como apoptose. Após o dano ao DNA, a expressão de genes pró-apoptóticos regulados pela proteína p53, incluindo BAX, aumentam, levando à liberação de citocromo c das mitocôndrias, com subsequente clivagem das procaspase 9 e ativação das caspases 3, 6 e 7 (HAUPT et al., 2003). Tais caspases degradam os componentes celulares essenciais para a viabilidade (JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2015).

1.3 Limitações no uso clínico da cisplatina

Existem dois problemas associados ao uso clínico da cisplatina: a resistência e a toxicidade.

A resistência à cisplatina tem sido atribuída a três mecanismos moleculares: aumento do reparo do DNA, alteração no acúmulo celular de cisplatina e inativação citosólica da droga (AMABLE, 2016). O acúmulo alterado de cisplatina nas células é resultante de duas vias celulares: diminuição da captação ou aumento da exportação. Foi observado que células resistentes exibem baixos níveis de cisplatina (GATELY; HOWELL, 1993). Já a inativação citosólica da cisplatina resulta na incapacidade da cisplatina em reagir com o DNA. Consequentemente, são produzidos menos danos ao DNA e a célula cancerosa consegue sobreviver ao tratamento medicamentoso. A primeira forma de inativação da cisplatina é a conjugação com a glutationa (GSH) e a segunda forma é por ligação a metalotioneínas (AMABLE, 2016).

Estudos demonstraram que estes três mecanismos contribuem para o processo de resistência, porém, há diferenças em relação ao nível de resistência induzido por cada um. Em baixos níveis de resistência, cerca de 10-15 vezes acima da linha de base, o principal mecanismo de resistência é o aumento do reparo do DNA. Os níveis intermediários de resistência (40-50 vezes acima da linha de base) são decorrentes da redução do acúmulo de compostos de platina, enquanto que, em níveis muito elevados de resistência, a inativação citosólica da cisplatina é o principal mecanismo envolvido. No entanto, tais estudos ainda ressaltam que, em muitas linhagens celulares, mais de um mecanismo pode ocorrer (RICHON; SCHULTE; EASTMAN, 1987; EASTMAN; SCHULTE, 1988; FERRY; HAMILTON; JOHNSON, 2000; AMABLE, 2016).

A resistência tumoral aos quimioterápicos limita a eficácia das terapias contra o câncer, fazendo-se necessário utilizar doses cada vez maiores para obter a mesma eficácia terapêutica. Como muitos outros antineoplásicos, a cisplatina caracteriza-se por possuir baixo índice terapêutico e elevado potencial tóxico (LEE et al., 2001). A toxicidade para os tecidos normais limita a quantidade de fármaco que pode ser administrado e os efeitos farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) limitam a quantidade de fármaco que atinge o tumor (HOLOHAN et al., 2013).

Os efeitos tóxicos induzidos pela cisplatina são dose-dependentes e limitam a administração de doses mais altas, comprometendo assim, a eficácia terapêutica (MACCIO; MADEDDU, 2013). Geralmente, os mecanismos de ação dos agentes quimioterápicos responsável pela ação antineoplásica estão também associados ao desenvolvimento dos efeitos tóxicos, dificultando minimizar a toxicidade sem diminuir a eficácia terapêutica (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015). Os efeitos colaterais decorrentes da utilização da cisplatina incluem: náuseas, vômitos, supressão da medula óssea, ototoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (HORVATH et al., 2006). Análogos de cisplatina foram sintetizados e submetidos a testes clínicos em uma tentativa de reduzir os efeitos colaterais e a resistência à cisplatina. Entre eles, apenas a carboplatina e a oxaliplatina conseguiram aprovação pelo FDA e outros análogos de segunda e terceira geração ainda estão em estudo (CHIORAZZI; SEMPERBONI; MARMIROLI, 2015). A carboplatina provoca menos efeitos colaterais, é menos neurotóxica, porém, menos eficaz do que a cisplatina. A oxaliplatina induz severa neurotoxicidade periférica, porém a cisplatina é o mais neurotóxico entre os compostos de platina usados como quimioterápicos (AMPTOULACH; TSAVARIS, 2011).

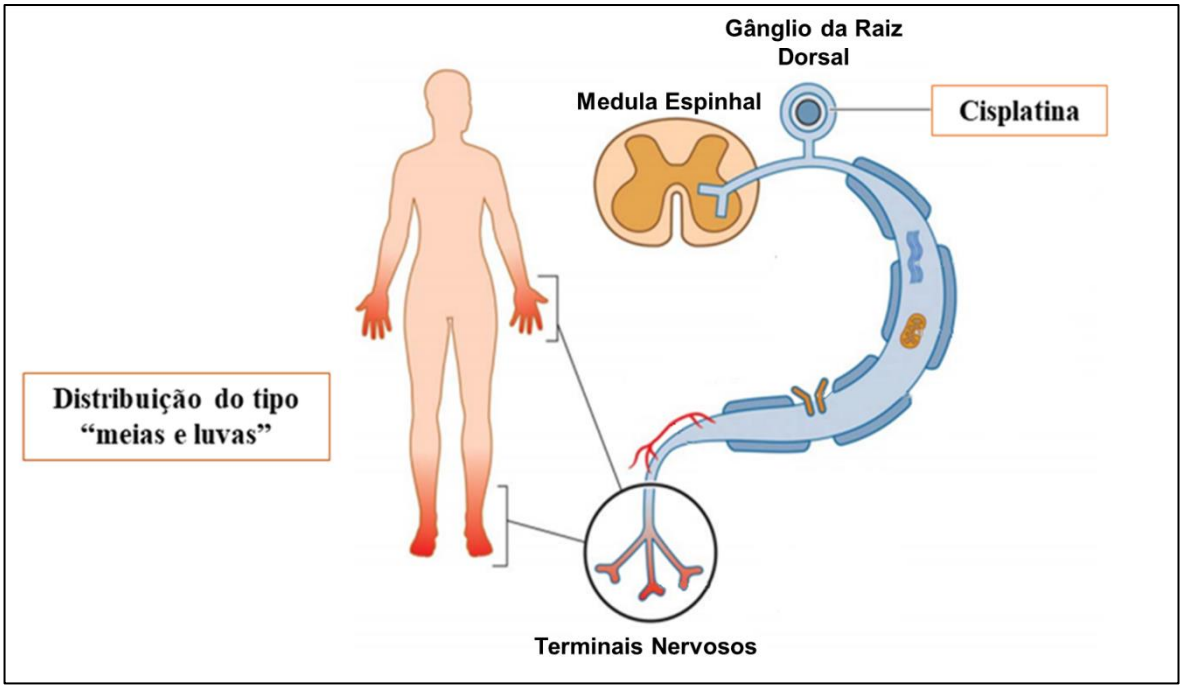
1.4 Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina

O primeiro caso de neurotoxicidade foi descrito por Kedar, Cohen e Freeman (1978), no fim da década de 70, ao observar dormência e formigamento nos membros de uma paciente portadora de osteosarcoma, a qual tinha recebido dose cumulativa de 500 mg/m^2 de cisplatina. Atualmente, sabe-se que a neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina é dose-dependente e que as doses são cumulativas. Normalmente, a neuropatia está associada a doses cumulativas superiores a 300 mg/m^2, desenvolvendo-se em aproximadamente 50% dos pacientes, sendo que cerca de 10 %, apresentam sintomas incapacitantes (PACE et al., 2010; GRISOLD; CAVALETTI; WINDEBANK, 2012; MILTENBURG; BOOGERD, 2014).

O aparecimento da neuropatia induzida pela cisplatina é variável. Alguns pacientes relatam o surgimento dos primeiros sintomas logo após a primeira dose, enquanto outros, após doze ciclos de terapia (CERSOSIMO, 1989). Os sintomas da neurotoxicidade induzida pela cisplatina são sensoriais e ocorrem simetricamente nas mãos e nos pés, em uma distribuição do tipo “meias e luvas” (Figura 3) (BROUWERS

et al., 2009). Os sintomas incluem dormência, formigamento, sensação de queimação, diminuição ou aumento da sensibilidade e dor (HAUSHEER et al., 2006).

Figura 3. Representação da distribuição “meias e luvas” típica da neuropatia periférica induzida pela cisplatina.



Fonte: Adaptado de Park et al. (2013).

Estudos neuropatológicos evidenciaram predomínio de perda das longas fibras sensoriais mielinizadas. Os sintomas sensoriais se desenvolvem primeiro nas extremidades, mãos e pés, indicando que os axônios mais longos são os primeiros a serem afetados. Os pacientes se queixam de parestesia e disestesia nas extremidades inferiores. No exame clínico, foi observada alteração da sensação de vibração e propriocepção com redução ou ausência de reflexos nos tendões. A perda da mielinização e as mudanças no citoesqueleto dos axônios provavelmente alteram a estrutura e função dos nervos periféricos, o que pode contribuir para o desenvolvimento da percepção alterada (STAROBOVA; VETTER, 2017). Em pacientes com alto grau de neuropatia, ataxia sensorial pode se desenvolver (BERNHARDSON; TISHELMAN; RUTQVIST, 2007; GRISOLD; CAVALETTI; WINDEBANK, 2012).

Os sintomas da neuropatia podem persistir por vários meses após a interrupção do tratamento ou podem progressivamente piorar com o tempo, um fenômeno conhecido como "*coasting*" (SIEGAL; HAIM, 1990). A neuropatia sintomática ou assintomática é encontrada em uma porcentagem considerável de pacientes (10-38%), os quais foram avaliados muitos anos após o fim da quimioterapia (ARGYRIOU et al., 2012). Com altas doses cumulativas e longo tempo de exposição à cisplatina, a severidade da neuropatia pode aumentar, assim como a probabilidade de desenvolver uma neuropatia crônica e irreversível (CERSOSIMO, 1989; GREGG et al., 1992). A neuropatia crônica induzida pela cisplatina foi relatada em aproximadamente 5-20% dos pacientes (PARK et al., 2013; STAROBOVA; VETTER, 2017).

1.5 Mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina

Embora diversos mecanismos moleculares pelos quais a cisplatina induz neurotoxicidade já tenham sido propostos, o mecanismo exato ainda permanece incerto (KELLEY et al., 2014). A formação de adutos com o DNA nuclear é o principal mecanismo pelo qual a cisplatina induz apoptose nas células cancerígenas e, provavelmente, exerce um papel central no desenvolvimento da neurotoxicidade (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015). O dano neuronal oxidativo, a disfunção mitocondrial e a alteração do metabolismo energético são outros eventos que contribuem para a apoptose induzida pela cisplatina nos neurônios sensoriais (CAROZZI; MARMIROLI; CAVALETTI, 2010).

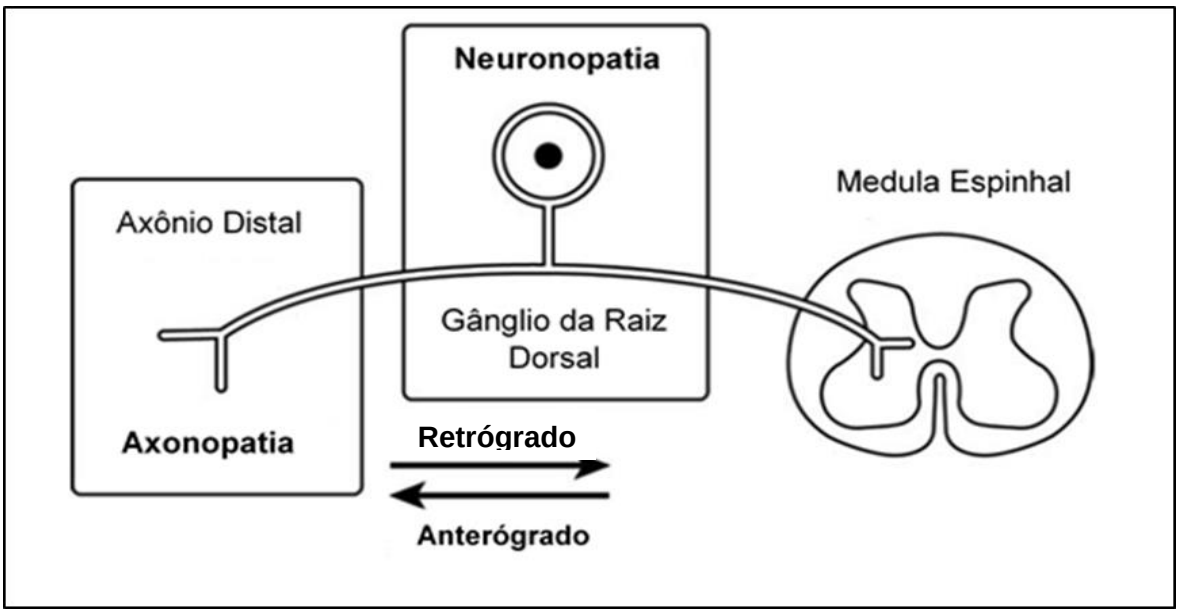
1.5.1 Degeneração axonal - Vulnerabilidade do Sistema Nervoso Periférico (SNP)

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) é frequentemente alvo da ação tóxica de vários agentes antineoplásicos (CAVALETTI et al., 2011). A maioria deles e, principalmente a cisplatina, possuem como alvo principal o gânglio da raiz dorsal (GRD) do sistema nervoso sensorial. O GRD é o tecido neural de acúmulo preferencial da cisplatina, uma vez que, não é protegido pela barreira hematoencefálica (BHE), possui transportadores de membrana específicos (transportadores catiônicos orgânicos) que facilitam o influxo da cisplatina e tem reduzida quantidade de glutationa detoxificante (GREGG et al., 1992; CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

Uma vez no interior do GRD, ocorre a formação de adutos DNA-cisplatina. A cisplatina produz, aproximadamente, três vezes mais adutos no GRD em relação à oxaliplatina, fato consistente com sua maior neurotoxicidade (WANG et al., 2006). Como os neurônios do GRD são pós-mitóticos e, portanto, não se dividem, a formação de adutos DNA-cisplatina não é letal, embora a quantidade de adutos acumulados esteja fortemente correlacionada ao grau de neurotoxicidade (DZAGNIDZE et al., 2007; AVAN et al., 2015). A cisplatina se acumula e persiste por longo tempo no interior do GRD, prejudicando o metabolismo celular e o transporte axonal. Embora a cisplatina induza apoptose nos neurônios sensoriais, os danos axonais parecem preceder a morte neuronal e estão associados a alterações na montagem da estrutura de microtúbulos axonais responsáveis pelo transporte axonal e ao crescimento dos neuritos (QUASTHOFF; HARTUNG, 2002; HAUSHEER et al., 2006).

A cisplatina induz uma degeneração axonal do tipo *Walleriana*, a qual se inicia na porção distal dos axônios sensoriais, consistente com os primeiros sintomas relatados pelos pacientes nas extremidades dos membros inferiores e superiores (distribuição tipo “meias e luvas”). Então, a patogênese da neuropatia periférica estaria relacionada ao início da axonopatia (Figura 4), através da degeneração retrógrada (*dying back*) induzida pelo dano na parte distal do axônio, seguida pela neuronopatia, na qual os corpos celulares do GRD seriam afetados (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015) e, por fim, apoptose neuronal. Essa questão é importante uma vez que a degeneração distal do axônio pode ser reversível depois da interrupção do tratamento, enquanto a degeneração do corpo celular leva à perda neuronal (KRARUP-HANSEN et al., 2007; PARK et al., 2008).

Figura 4. Origem da neurotoxicidade



Legenda: Axonopatia, degeneração retrógrada (*dying back*) induzida pelo dano na parte distal do axônio e neuronopatia, envolvendo os corpos celulares no GRD. Adaptado de Park et al. (2008).

1.5.2 Dano neuronal oxidativo, disfunção mitocondrial e os prejuízos no metabolismo energético

O dano oxidativo, disfunção mitocondrial e as mudanças no metabolismo energético são outros importantes mecanismos que contribuem significativamente para a atividade antineoplásica da cisplatina e também estão relacionados ao desenvolvimento da neurotoxicidade (MACCIO; MADEDDU, 2013).

A cisplatina, assim como a maioria dos agentes quimioterápicos, causa danos às mitocôndrias neuronais e não-neuronais, levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequente aumento no estresse oxidativo (MCDONALD; WINDEBANK, 2002). A cisplatina induz estresse oxidativo aumentando os níveis das ERO e diminuindo as defesas antioxidantes, especialmente da glutationa reduzida (GSH), bem como das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa peroxidase e glutationa redutase (SRIVASTAVA et al., 2010).

A cisplatina se liga covalentemente ao DNA mitocondrial e forma adutos, os quais não podem ser reparados, uma vez que a mitocôndria não expressa sistema de reparo de DNA (CANTA; POZZI; CAROZZI, 2015). Podratz et al. (2011) demonstrou que a cisplatina forma adutos com o DNA mitocondrial na mesma proporção que com

o DNA nuclear e, tais adutos podem inibir a replicação do DNA mitocondrial e causar vacuolização mitocondrial e degradação dos neurônios do GRD, *in vitro* e *in vivo* (PODRATZ et al., 2011). Estes efeitos da cisplatina no DNA mitocondrial podem produzir falhas energéticas graduais e também prolongar a neurotoxicidade da cisplatina, uma possível explicação para a piora dos sintomas da neuropatia (fenômeno "*coasting*") observado após a interrupção do tratamento (GRUNBERG et al., 1989).

A disfunção mitocondrial induzida pela cisplatina, geralmente provoca dano oxidativo no sistema nervoso periférico. O estresse oxidativo induzido pela cisplatina no fígado, rins e no coração é bem documentado (DOS SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2007; WANG et al., 2009), porém, estes eventos são menos estudados nos neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (CAROZZI; MARMIROLI; CAVALETTI, 2010). Alguns mecanismos sugerem a indução da apoptose pela ativação das caspases 3 e 7, por meio da via Bax-mitocondrial-citocromo c, ou pela ligação ao DNA mitocondrial ou pela inibição da transcrição e/ou síntese de proteínas mitocondriais com a subsequente perda da função mitocondrial (WINDEBANK; GRISOLD, 2008; CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

Estudo realizado em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) demonstrou que, após a exposição a concentrações tóxicas de cisplatina, tais neurônios apresentaram redução nas mitocôndrias funcionais, perda do potencial de membrana e alterações estruturais características de degeneração vacuolar (MELLI et al., 2008). O potencial de membrana mitocondrial é responsável pela produção de ATP (adenosina trifosfato), utilizado pelos neurônios como fonte de energia para conduzir os processos bioquímicos envolvidos em várias funções celulares (MATTSON; LIU, 2002). A disfunção e degeneração do citoesqueleto são fenômenos resultantes da alteração do potencial de membrana mitocondrial, anormalidades na cadeia transportadora de elétrons e falhas energéticas, que afetam o transporte de mitocôndrias ao longo dos axônios (MELLI et al., 2008).

Estima-se que cerca de 95% das mitocôndrias do sistema nervoso periférico (SNP) estejam situadas nos axônios (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015). Durante o desenvolvimento e regeneração neuronal, o transporte de mitocôndrias está associado com o crescimento de axônios (DEDOV; ARMATI; ROUFOGALIS, 2000). Mitocôndrias com elevado potencial de membrana são transportadas em direção ao cone de crescimento, um local com grande demanda de energia necessária para os

axônios em crescimento. Por outro lado, as mitocôndrias com potencial despolarizado são transportadas em direção ao corpo celular, supostamente como um passo inicial no processo de autofagia. Esses dados sustentam a hipótese de que, na neuropatia periférica induzida por compostos de platina, a perda da dinâmica e da função mitocondrial exerce um papel importante na patogênese da neurodegeneração (MELLI et al., 2008).

As fibras nervosas periféricas mais longas, tais como fibras sensoriais que transportam a sensação de toque, temperatura e dor, são mais suscetíveis às interferências no metabolismo energético, função mitocondrial e, principalmente a distúrbios no transporte axonal, sendo este direta ou indiretamente associado com alterações no citoesqueleto (WINDEBANK; GRISOLD, 2008; PRIOR et al., 2017).

O transporte axonal é classificado de acordo com a velocidade do transporte. O mecanismo rápido é um transporte vesicular baseado nos microtúbulos, podendo ser anterógrado, quando vai do corpo celular para o axônio ou retrógrado, quando vai do axônio em direção ao corpo celular do neurônio. Diferentemente do transporte axonal rápido, o mecanismo lento pode ser apenas anterógrado e refere-se, principalmente aos elementos do citoesqueleto. O citoesqueleto não apenas assegura as características estruturais, como também suporta vários processos funcionais dentro do neurônio, como a dinâmica do transporte axonal. Duas proteínas dependentes de ATP são responsáveis por esse transporte. Os membros da família cinesina são responsáveis pelo transporte anterógrado, enquanto no transporte retrógrado, as dineínas são utilizadas como proteínas motoras. Estudo *in vitro* demonstrou a habilidade da cisplatina em danificar as proteínas motoras cinesinas e dineínas através da formação de adutos, e diretamente prejudicar o transporte axonal rápido (RUSSELL et al., 1995; NICOLINI; MONFRINI; SCUTERI, 2015; PRIOR et al., 2017).

1.5.3 Excitotoxicidade do glutamato

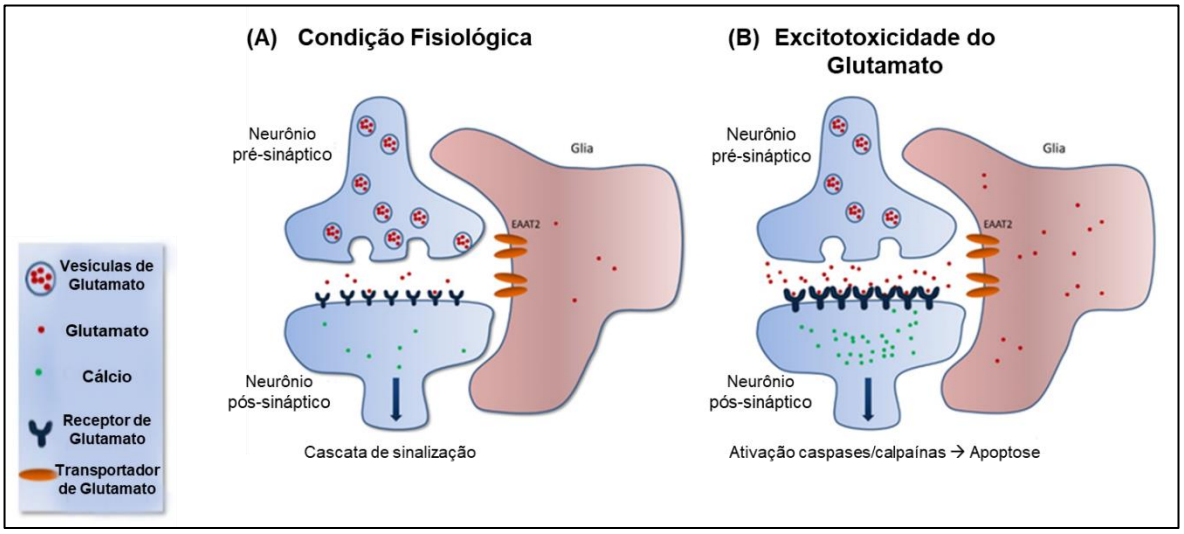
Glutamato é o principal mediador da sinalização excitatória no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos e essencial para as diversas funções cerebrais normais incluindo cognição, memória, aprendizado, plasticidade e potencialização a longo prazo (WANG; QIN, 2010; PENG et al., 2011). Além disso, o glutamato também possui função central em alguns processos de desenvolvimento do SNC, tais como a

formação e a eliminação de sinapses, migração celular, diferenciação e morte celular (DANBOLT, 2001; KOSTANDY, 2012).

No entanto, estudos também tem demonstrado o papel do glutamato na transdução sensorial periférica, bem como nas vias nociceptivas. Os terminais sensoriais periféricos expressam moléculas envolvidas na sinalização do glutamato e os ligantes glutamatérgicos podem causar comportamento nociceptivos em vários modelos experimentais de patologia (CAROZZI; MARMIROLI; CAVALETTI, 2008).

A maioria dos neurônios e células da glia expressam em suas membranas plasmáticas receptores e transportadores envolvidos na sinalização do glutamato (BERGLES et al., 2000). Em condições fisiológicas normais, o glutamato é liberado nas fendas sinápticas e exerce seu papel ativando os receptores de glutamato pós-sinápticos (Figura 5). A estimulação dos receptores de glutamato é mediada pela concentração de glutamato na fenda sináptica. O glutamato é removido do espaço extracelular através da captação celular realizada pelos transportadores de glutamato (JOHNSTON, 1981; BEART; O'SHEA, 2007). Foram identificados e caracterizados 5 subtipos de transportadores aminoácidos excitatórios (em inglês *EAATs, excitatory amino acid transporters*), chamados EAAT1 - EAAT5 (AMARA; FONTANA, 2002), sendo o transportador aminoácidos excitatório tipo 2 (EAAT2/GLT-1, nomenclatura referente ao homólogo humano e de ratos) o subtipo de transportador de glutamato predominante no SNC desempenhando assim, um papel fundamental na regulação da transmissão do glutamato. Sendo assim, o EAAT2 remove o glutamato liberado no interior da fenda sináptica e mantem a concentração extracelular de glutamato abaixo dos níveis considerados neurotóxicos. Porém, em situações de excitotoxicidade, o glutamato é liberado em altas concentrações e seu *clearance* fica reduzido. Consequentemente, ocorre uma ativação excessiva dos receptores de glutamato, resultando em influxo de cálcio e ativação das caspases, fosfolipases, endonucleases e proteases que podem levar à morte celular apoptótica ou necrótica (FONTANA, 2015).

Figura 5. Sinalização glutamatérgica sob condições fisiológicas (A) e excitotóxicas (B)



Fonte: Adaptado de Fontana (2015).

O potencial envolvimento da toxicidade mediada pelo glutamato em doenças neurodegenerativas agudas e crônicas tem sido demonstrada por diversos estudos, sendo que, a excessiva liberação pré-sináptica e/ou a prejudicada reabsorção do glutamato são apontados como os principais mecanismos envolvidos nesses processos (CAROZZI; MARMIROLI; CAVALETTI, 2008; CAROZZI; CERESA, 2012; MEHTA et al., 2013).

Disfunções nos receptores de glutamato estão associados especificamente a condições neuropáticas, tais como a hiperalgesia, dor neuropática e crônica e outras neuropatias periféricas (WALKER et al., 2001; ANJANEYULU; BERENT-SPILLSON; RUSSELL, 2008). Por outro lado, disfunções na captação de glutamato determinadas pelas alterações na função e/ou na expressão dos EAATs, tem sido relacionadas à várias desordens neurológicas e neurodegenerativas do SNC, tais como o acidente vascular cerebral isquêmico (MALLOLAS et al., 2006; YI; HAZELL, 2006), a epilepsia (LU et al., 2008), a doença de Alzheimer (SCOTT et al., 2002; WOLTJER et al., 2010), a esclerose lateral amiotrófica (WILSON et al., 2003; VAN DEN BOSCH et al., 2006) entre outras, e também em vários modelos de danos nos nervos periféricos, dores neuropáticas e hiperalgesia induzida por quimioterápicos (AUTHIER et al., 2003a; AUTHIER et al., 2003b; MAWRIN et al., 2003; SUNG; LIM; MAO, 2003).

As funções do glutamato no SNC são continuamente alvo de vários estudos. No entanto, pouco ainda se sabe sobre as características básicas do sistema

glutamatérgico no SNP (CAROZZI et al., 2008), bem como o envolvimento da sinalização do glutamato na neurotoxicidade periférica induzida pela cisplatina.

As alterações induzidas por compostos de platina na expressão de algumas moléculas relacionadas à sinalização do glutamato são apontadas como responsáveis pelo desenvolvimento da neuropatia periférica (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015). Neste contexto, foi demonstrado que as alterações induzidas pela cisplatina na concentração de magnésio modificaram a taxa de ligação do glutamato ao seu receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA), evento apontado como o responsável pelo aumento dos sintomas nociceptivos (AUTHIER et al., 2003a; AUTHIER et al., 2003b). Além disso, outro estudo mostrou que a inibição farmacológica da enzima glutamato carboxipeptidase II (GCPII), reduziu a severidade da neurotoxicidade periférica induzida pela cisplatina em ratos (CAROZZI et al., 2010). No entanto, não foram encontrados estudos que avaliem o efeito da cisplatina sobre os transportadores de glutamato.

1.6 Marcadores do perfil celular energético

Neurônios são células de alto consumo de energia, cujas funções são grandemente afetadas pelo estado energético. Glicose é um dos principais combustíveis cerebrais, que deve, obrigatoriamente, ser fornecido continuamente pelo sangue para manter a função cerebral. No cérebro, a maioria da energia é consumida para gerar potenciais de ação e potenciais de ação pós-sinápticos. Adicionalmente, o metabolismo da glicose fornece energia para a biossíntese de neurotransmissores em neurônios diferenciados. Os transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3 são responsáveis por mediar a captação da glicose do meio extracelular para as células da glia e neurônios, respectivamente (DIENEL, 2012; MAINARDI; FUSCO; GRASSI, 2015). A cisplatina interfere no metabolismo da glicose, sendo também apontado como uma das causas dos seus efeitos tóxicos (MACCIO; MADEDDU, 2013).

Pouco ainda se sabe a respeito do mecanismo molecular pelo qual a cisplatina reduz a captação de glicose. Apesar do DNA ser o alvo principal da cisplatina, ela pode afetar outros componentes celulares, tais como RNA, membrana plasmática, microfilamentos, mitocôndria e retículo endoplasmático (REBILLARD; LAGADIC-GOSSMANN; DIMANCHE-BOITREL, 2008). Consequentemente, existem diversos mecanismos possíveis para explicar a redução da captação de glicose. Em um estudo

realizado em linhagem celular de câncer de ovário, foi observada redução na captação de glicose em curto período de tempo após a exposição à cisplatina, sendo que esta redução foi atribuída à rápida modificação na distribuição dos transportadores GLUT1. A interação entre a cisplatina e a membrana plasmática pode ter afetado a distribuição dos transportadores (EGAWA-TAKATA et al., 2010).

Embora os neurônios sejam células de alta atividade metabólica, possuem baixa capacidade de armazenamento de nutrientes. As baixas reservas energéticas associadas a uma estreita margem entre a quantidade de energia gerada e a energia necessária, os tornam particularmente sensíveis às flutuações dos níveis de energia. A fim de manter um fornecimento energético constante, todas as células eucarióticas utilizam a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) como um mecanismo de monitoramento entre a energia produzida e a energia consumida (SPASIC; CALLAERTS; NORGA, 2009).

De fato, a AMPK atua como um sensor celular energético que controla o metabolismo da glicose e de lipídeos em reposta às mudanças dos níveis de nutrientes e de energia intracelular. A AMPK é ativada pela elevação dos níveis de adenosina monofosfato (AMP), os quais são produzidos em condições de baixa produção de ATP (XU; ASH, 2016). Quando ativada, a AMPK protege as células contra a depleção de ATP estimulando processos como, a oxidação de ácidos graxos, os quais promovem a geração de ATP, e inibindo outros, como a síntese de lipídeos e proteínas, que também requerem ATP, porém não são necessários para a sobrevivência (HARDIE et al., 2003). A fosforilação de Thr172 na subunidade α é um marcador da ativação da AMPK (HARDIE; ALESSI, 2013).

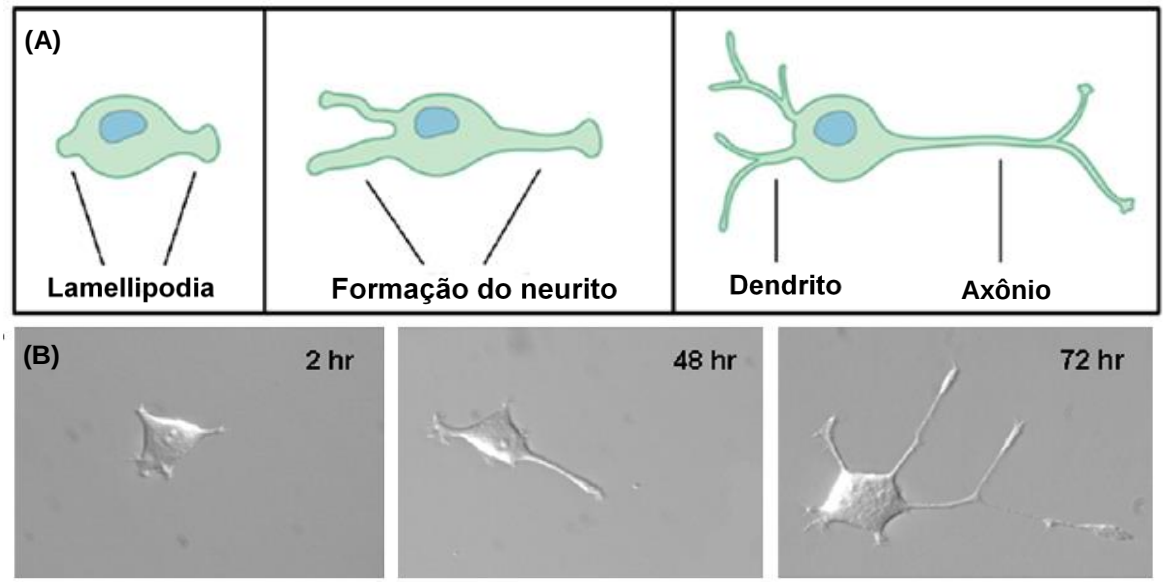
Outra importante proteína relacionada ao metabolismo energético celular é a SIRT-1, uma desacetilase dependente de NAD^+ que funciona como um sensor de energia celular. Além dos seus efeitos bem caracterizados nos tecidos periféricos, evidências mais recentes sugerem que a atividade neuronal de SIRT-1 desempenha um papel na regulação do equilíbrio energético e do metabolismo da glicose (LU et al., 2013). A SIRT-1 faz uma ponte entre o estado metabólico celular a regulação da expressão gênica, modulando assim uma variedade de processos celulares, como sobrevivência, metabolismo de glicose, manutenção da homeostase de energia (LI, 2013), manutenção da estabilidade genômica, a supressão da inflamação, o aumento da plasticidade sináptica e a proteção contra a neurodegeneração (MIN et al., 2013).

1.7 Neuritogênese

A função do sistema nervoso depende de uma complexa arquitetura de redes neuronais. Os principais processos celulares críticos para o desenvolvimento normal do cérebro incluem a proliferação, diferenciação de células precursoras em neurônios ou glia, migração, formação de axônios e dendritos, formação de sinapses, mielinização e morte celular programada (COWAN; JESSELL; ZIPURSKY, 1997).

O bom funcionamento do cérebro depende da formação de uma conectividade cerebral adequada, a qual é dependente da germinação e alongamento dos axônios e dendritos no momento e direção correta. Apesar da ampla variedade de neurônios no cérebro em desenvolvimento, o surgimento inicial de um neurito pode ser observado para os neurônios de uma maneira similar. Inicialmente, as células ainda são relativamente arredondadas e exibem uma distribuição apolar da lamellipodia. Pouco tempo depois, o corpo celular é rompido, e os processos cilíndricos que contém o cone de crescimento na parte distal, começam a brotar. Os neuritos imaturos então formados não possuem características moleculares e estruturais de axônios e dendritos maduros. A transição para a próxima etapa consiste na seleção de um desses neuritos para formar o axônio. Este neurito é distinguido por um cone de crescimento maior que se alonga rapidamente sem retração. Após a formação do axônio, uma elaborada rede dendrítica é formada mais lentamente. A formação do dendrito é um processo mais dinâmico, o qual é controlado por uma combinação de fatores internos e externos, que conduzem a uma adição e retração contínua de ramos de dendritos. Finalmente, cerca de uma semana após a indução do neurito, os neurônios formam os contatos sinápticos criando, assim, as redes neuronais (Figura 6) (DA SILVA; DOTTI, 2002; KESSELS et al., 2011).

Figura 6. Eventos iniciais no crescimento de neuritos



Legenda: (A) Diagrama demonstrando os eventos iniciais no crescimento de neuritos ilustrando a ruptura do corpo celular para formação do botão inicial, seguida pela formação dos neuritos e por fim, a transformação dos processos em axônios e dendritos. (B) Imagens de contraste de fase demonstrando o crescimento de neuritos em células PC12 após 2, 48 e 72 horas de tratamento com 100 ng/mL de NGF (fator de crescimento neuronal). Adaptado de Radio e Mundy (2008).

As principais características morfológicas da diferenciação celular, também conhecida como neuritogênese, são as formações das extensões neuríticas, que produzem uma polaridade estrutural e funcional promovendo o alongamento dos axônios e ramificação dendríticas (BRADKE; DOTTI, 1997; KIRYUSHKO; BEREZIN; BOCK, 2004), os quais são tidos como uma condição prévia para a sinapotogênese e a conectividade celular (HARRILL; ROBINETTE; MUNDY, 2011).

1.7.1 Proteínas neurotípicas características da neuritogênese

A neuritogênese é dependente dos principais componentes do citoesqueleto. O citoesqueleto é composto por três tipos de filamentos, sendo eles, os microtúbulos, os filamentos de actina e filamentos intermediários (também chamados de neurofilamentos) (LEWIS; COURCHET; POLLEUX, 2013). Existem centenas de moléculas acessórias que tanto interligam os filamentos entre si, como também os conectam aos outros componentes celulares. Os neurofilamentos são formados por subunidades que são, por si só, fibrosas e longas, enquanto os filamentos de actina e

os microtúbulos são formados por actina e tubulina, respectivamente (ALBERTS, 2010).

Os principais componentes do citoesqueleto dos quais a neuritogênese é dependente são os neurofilamentos, os microtúbulos e as proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs). Os neurofilamentos são principais os filamentos intermediários encontrados nas células neuronais, os quais são responsáveis por fornecer suporte específico para o desenvolvimento do neurito e manutenção do calibre neuronal (MURPHY et al., 1993). São agrupados de acordo com seu peso molecular em NF-68, NF-160 e NF-200 kDa. O neurofilamento de 200 kDa (NF-200) é considerado um marcador axonal e de diferenciação neuronal muito útil na imunocitoquímica, uma vez que axônios maduros apresentam alta densidade desse neurofilamento (WU et al., 1998).

Os microtúbulos, por sua vez, são essenciais para diversos processos celulares, como a migração neuronal, a polaridade e a diferenciação. Dessa forma, a montagem, a organização e a remodelação dos microtúbulos são fatores essenciais para completar, com sucesso, todos os estágios de desenvolvimento neuronal (KAPITEIN; HOOGENRAAD, 2015). Os microtúbulos são constituídos por heterodímeros de α e β-tubulina. A maioria deles estão presentes nos corpos celulares, nos axônios e em dendritos dos neurônios maduros (CONDE; CACERES, 2009). Nos dendritos, os microtúbulos estão predominantemente localizados nos eixos, embora estudos recentes revelaram a entrada temporária dos microtúbulos nas espinhas dendríticas, uma região rica em actina, que se pensava ser desprovida de microtúbulos (HU et al., 2008; JAWORSKI et al., 2009). Vários distúrbios do desenvolvimento neurológico humano, assim como anormalidades do sistema nervoso tem sido associados às alterações nos microtúbulos. Estudos genéticos que identificaram diversas mutações nos membros da família das tubulinas fornecem evidências mais diretas do envolvimento dos microtúbulos nas doenças neurodegenerativas (FRANKER; HOOGENRAAD, 2013; KAPITEIN; HOOGENRAAD, 2015).

Os filamentos de actina (F-actina) representam outro abundante constituinte do citoesqueleto neuronal. O comportamento dinâmico do citoesqueleto de actina próximo à membrana celular o torna o principal responsável pela morfologia celular (POLLARD; COOPER, 2009). Nos neurônios, a actina é particularmente abundante nos cones de crescimento axonal, nos dendritos e nas espinhas dendríticas

(HOTULAINEN; HOOGENRAAD, 2010). O início da formação dos neuritos nas células neuronais requer a ruptura do corpo celular. Curiosamente, a lamellipodia formada durante a fase inicial, por si só, não é o suficiente para a neuritogênese, mas a ruptura da borda lamelipodial por protrusões filapodiais é de extrema importância. A formação de tais protrusões é extremamente dependente da polimerização dos filamentos de actina (WILLIAMS et al., 1988; EDSON; WEISSHAAR; MATUS, 1993).

A proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43) é uma proteína neuro-específica, preferencialmente distribuída no cone de crescimento e nos axônios em alongamento durante o desenvolvimento e regeneração (MCGUIRE; SNIPES; NORDEN, 1988; SKENE, 1989; BENOWITZ; ROUTTENBERG, 1997). Os neurônios em desenvolvimento, tanto *in vivo* como *in vitro*, expressam altos níveis da proteína GAP-43, que são coincidentes com o início e o alongamento dos neuritos. Estudos sugerem o envolvimento da GAP-43 em sinais intra e extracelulares que regulam a organização do neuroesqueleto nas terminações nervosas, além de influenciar o crescimento do terminal pré-sináptico por meio da associação com as proteínas do citoesqueleto (DANI; ARMSTRONG; BENOWITZ, 1991; BENOWITZ; ROUTTENBERG, 1997; CHO; TIFFANY-CASTIGLIONI, 2004). Adicionalmente, foi demonstrado que os níveis de GAP-43 estão correlacionados com o crescimento axonal em culturas neuronais primárias (PRZYBORSKI; CAMBRAY-DEAKIN, 1994) e crescimento de neuritos em células PC12 (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004).

As sinapsinas e as proteínas relacionadas às sinaptofisinas são membros da família das fosfoproteínas que estão localizadas na membrana pré-sináptica e são responsáveis por regular a fusão das vesículas sinápticas e a liberação de neurotransmissores (THEIL, 1993). Os níveis de ambas proteínas aumentam com a formação de sinapses maduras (EHRHART-BORNSTEIN et al., 1991; FLETCHER et al., 1991). A sinapsina I foi descoberta em 1972 como sendo um dos principais substratos para a proteína quinase dependente de AMP cíclico (AMPc) e para a proteína quinase dependente de Ca2+/calmodulina (JOHNSON et al., 1972). Desde então, outros membros da família das sinapsinas foram descobertos e, em conjunto, as sinapsinas representam uma das famílias de proteínas sinápticas mais abundantes, compreendendo cerca de 1% do total de proteínas no cérebro (UEDA; GREENGARD, 1977; FERREIRA; RAPOPORT, 2002). A expressão da sinapsina em células PC12 diferenciadas na presença de NGF, aumentou cerca de três vezes,

sendo esse aumento diretamente correlacionado com o aparecimento das vesículas sinápticas nos terminais nervosos maduros (THEIL, 1993).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a sinapsina I e as proteínas relacionadas podem ser utilizadas como marcadores de danos induzidos por compostos tóxicos ao desenvolvimento de terminais nervosos (O'CALLAGHAN; MILLER, 1989; MONNET-TSCHUDI et al., 1995). Além disso, outro estudo demonstrou que a inibição induzida por compostos químicos na diferenciação das células PC12 foi refletida através da diminuição da expressão de GAP-43 e de sinapsina I (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004).

1.7.2 Células PC12 como modelo de diferenciação celular

As células PC12 são células clonais derivadas de um tumor transplantável da medula adrenal (feocromocitoma) de ratos. Exibem propriedades fenotípicas associadas aos feocromocitomas e também às células de cromafina da adrenal (GREENE; TISCHLER, 1976).

Na presença do fator de crescimento neuronal (NGF), as células PC12 sofrem mudanças drásticas no seu fenótipo, adquirindo propriedades características de neurônios simpáticos, incluindo expressão de neurotransmissores catecolaminérgicos, receptores colinérgicos e a acetilcolinesterase (FUJITA; LAZAROVICI; GUROFF, 1989).

Células PC12 tratadas com NGF paralisam a proliferação, estendem neuritos e se tornam eletricamente excitáveis (GREENE; TISCHLER, 1976). O NGF induz diferenciação nas PC12 através da sua ação sobre os receptores TrkA (KAPLAN; STEPHENS, 1994). Uma vez ligado ao receptor TrkA, uma série de cascatas de sinalização são desencadeadas, tais como, a via Raf/MEK/MAP quinases e a via PLCγ/PKC, as quais inibem a proliferação celular e promovem o crescimento de neuritos (OHMICHI; ZHU; SALTIEL, 1993; KAO et al., 2001).

Portanto, as células PC12 são consideradas um sistema útil para estudar tanto o mecanismo de ação de agentes tóxicos, como o potencial para alterar a diferenciação neuronal (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004; HARRILL; MUNDY, 2011). Adicionalmente, as PC12 são amplamente utilizadas para avaliar o envolvimento das vias de sinalização ativadas pelo NGF como um possível

mecanismo pelo qual os agentes neurotóxicos afetam a diferenciação e o crescimento de neuritos (WILLIAMS et al., 2000; PARRAN; BARONE; MUNDY, 2003).

1.8 Neuroproteção

A neuroproteção certamente é um dos objetivos terapêuticos mais desejáveis na maioria dos distúrbios neurológicos. Neuroproteção é definida como um mecanismo homeostático do sistema nervoso central (SNC) que protege os neurônios da apoptose ou da degeneração após uma lesão cerebral ou como consequência de uma doença neurodegenerativa (KIM, 2010). Logo, de um modo geral, a neuroproteção refere-se à preservação da estrutura e da função neuronal (CASSON et al., 2012; WIENDL et al., 2015).

Por muito tempo, acreditou-se que a regeneração do sistema nervoso fosse irreversível. No entanto, estudos recentes evidenciaram que tanto a regeneração fisiológica, como a de reparação ocorrem no sistema nervoso central para manter a homeostase e sustentar o reparo tecidual (MARTINO et al., 2011). Foi evidenciado que os neurônios danificados se regeneravam através de um processo ativo, na presença de fatores neurotróficos, como fator de crescimento neuronal (NGF) e fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) (FILBIN, 2000).

A habilidade dos fatores neurotróficos em prevenir ou reverter a degeneração neuronal, promover a regeneração dos neuritos e de aumentar a plasticidade sináptica em vários modelos *in vivo* e *in vitro*, fazem deles potenciais candidatos para terapias primárias ou adjuvantes em uma série de transtornos neurológicos (ALLEN; DAWBARN, 2006; CHAO; RAJAGOPAL; LEE, 2006). Adicionalmente, outros estudos destacaram a capacidade dos fatores neurotróficos em alterar o metabolismo energético neuronal e a produção de oxiradicais (MATTSON; LIU, 2002). Por exemplo, culturas de neurônios do hipocampo tratadas com fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF) ou fatores de crescimento semelhantes à insulina (ILGFs) apresentaram maior habilidade em manter a função mitocondrial sob condições de baixa disponibilidade de glicose (MATTSON; ZHANG; BOSE, 1993). Os fatores neurotróficos também agem localmente nos terminais sinápticos aumentando o transporte de glicose e a função mitocondrial, reforçando a habilidade dos terminais sinápticos em lidar com o estresse oxidativo (MATTSON; PARTIN, 1999; GUO; MATTSON, 2000).

Os níveis de fatores neurotróficos, bem como de seus receptores, encontram-se alterados na maioria das doenças neurodegenerativas e, portanto, tem sido proposto o uso de tais fatores como potenciais candidatos para o tratamento de tais doenças (LEVY et al., 2005). Entretanto, fatores neutrotróficos, incluindo o NGF, não são capazes de atravessar a barreia hematoencefálica (LIN et al., 2010).

O NGF desempenha seu papel trófico durante o desenvolvimento e na idade adulta, garantindo a manutenção das características fenotípicas e funcionais de várias populações de neurônios. A ação do NGF em neurônios colinérgicos e em neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal chamou a atenção de pesquisadores, com relação ao possível uso clínico em pacientes com a doença de Alzheimer e nas neuropatias periféricas, respectivamente. Estudos clínicos de fase I a fase III, utilizando NGF humano recombinante (rhNGF), foram conduzidos em pacientes diabéticos com sintomas de neuropatia periférica. Porém os estudos clínicos foram interrompidos devido ao desenvolvimento de efeitos colaterais, tais como mialgia, hiperalgesia e artralgias, impossibilitando o conhecimento da eficácia real do NGF no tratamento da neuropatia diabética (ALOE et al., 2012; MANNI et al., 2013).

Redução dos níveis de NGF circulantes foi observado em pacientes com neuropatia induzida por agentes quimioterápicos (DE SANTIS et al., 2000), existindo uma positiva correlação entre redução dos níveis circulantes e a severidade da neuropatia (CAVALETTI et al., 2004). Um estudo realizado em ratos demonstrou que a cisplatina reduziu os níveis de NGF em tecidos periféricos produtores de NGF e que, a administração exógena de NGF, restaurou os déficits neurológicos induzidos pela cisplatina nestes animais (ALOE et al., 2000).

1.8.1 Estratégias de prevenção e tratamento da neuropatia induzida pela cisplatina

Diferentes compostos tem sido propostos como sendo eficazes na prevenção da neuropatia induzida pela cisplatina (ALBERS et al., 2014). Alguns exemplos são descritos abaixo:

- Amifostina, um tiofosfato orgânico que atua como sequestrador de radicais livres, apresentou proteção seletiva dos tecidos normais contra os efeitos tóxicos induzidos pelos compostos de platina, sem influenciar a eficácia antitumoral (KANAT et al., 2003).

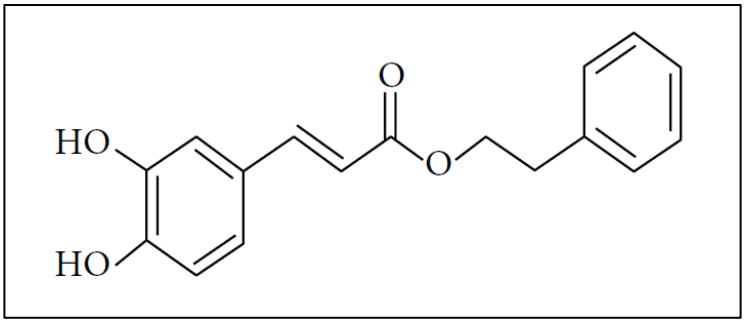
- Glutationa reduzida (GSH), cuja região nucleofílica apresenta alta afinidade para metais pesados, talvez seja capaz de prevenir o acúmulo de cisplatina no interior do gânglio da raiz dorsal (CASCINU et al., 2002).
- Neuropeptídeo Org 2766, um análogo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), foi relatado como capaz de melhorar a neuropatia induzida pela cisplatina por meio de efeitos tróficos, reforçando os mecanismos endógenos de reparo do nervo (VAN DER HOOP et al., 1990).
- Vitamina E, um poderoso antioxidante, protege contra os danos induzidos pelos radicais livres (PACE et al., 2003).
- Acetilcisteína (NAC), um suplemento nutricional capaz de aumentar a concentração de glutationa no sangue, inibindo o acúmulo de cisplatina nos gânglios da raiz dorsal (LIN et al., 2006).
- Ácido retinóico – todos os *trans*-ácidos retinóicos se ligam e ativam receptores de ácido retinóico, além de estimular NGF e também a expressão de seus receptores (ARRIETA et al., 2005).

Dentre todos os compostos acima relatados, destacam-se a amifostina, glutationa e vitamina E, porém, os resultados ainda são modestos. Até o presente momento, não existem evidências sólidas da eficácia e segurança desses agentes que suportem seu uso terapêutico contra a neuropatia periférica induzida pela cisplatina (ALBERS et al., 2014; AVAN et al., 2015).

1.9 Éster fenetil do ácido cafeico (CAPE)

O éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) é um composto bioativo extraído do própolis, um produto natural secretado pelas abelhas (MURTAZA et al., 2014). O CAPE é um polifenol com grupos hidroxilas, os quais são responsáveis por muitas de suas atividades biológicas (Figura 7) (WANG et al., 2006).

Figura 7. Estrutura química do CAPE.



Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* vêm abordando o potencial neuroprotetor do CAPE; porém os mecanismos tem sido atribuídos principalmente às suas propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias e anti-oxidantes (FAROOQUI; FAROOQUI, 2012; TOLBA et al., 2013). O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, mediadores pró-inflamatórios e citocinas são eventos comuns às diversas doenças neurodegenerativas (TOLBA et al., 2013) e as propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes do CAPE poderiam ter efeitos benéficos nesses processos. Porém, muitos estudos tem associado a neurodegeneração do SNC e periférico aos efeitos precoces relacionados ao dano axonal e perdas na plasticidade sináptica (GORDON, 2009; KANAAN et al., 2013; CAMINITI et al., 2017). Tais estudos sugerem um papel relevante da regeneração da plasticidade axonal e sináptica nas estratégias de proteção contra a neurodegeneração e justificam a busca de moléculas com atividade neurotrófica, isto é, que sejam capazes de ativar receptores de neurotrofinas e ativar as mesmas vias das neurotrofinas endógenas, proporcionando novas opções terapêuticas para uma ampla gama de desordens neurológicas tanto do sistema nervoso central quanto periférico (LONGO; MASSA, 2013).

Em nosso laboratório já demonstramos a participação da atividade neurotrófica no mecanismo de proteção do CAPE em células PC12 tratadas com a neurotoxina MPP^+, (SANTOS et al., 2014) e em ratos tratados com a neurotoxina 6-OHDA (SILVA et al., 2013), ambos modelos relacionados ao Parkinsonismo.

Até o momento não há estudos acerca do efeito protetor do CAPE contra a neurotoxicidade da cisplatina e pouco se sabe sobre os mecanismos neurotóxicos da cisplatina, particularmente com relação à plasticidade axonal e sináptica. Estes temas foram abordados no presente estudo.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo estudar os mecanismos moleculares pelos quais a cisplatina induz neurotoxicidade, bem como investigar o possível efeito neuroprotetor do CAPE e os mecanismos envolvidos na neuroproteção em modelo *in vitro* de diferenciação neuronal com células PC12 tratadas com cisplatina.

Para alcançar tais objetivos, foram usadas as seguintes estratégias:

A. Avaliação da viabilidade celular (MTT e LDH), do crescimento de neuritos, da expressão de proteínas axonais e do citoesqueleto, de marcadores de apoptose, de estresse oxidativo, da bioenergética celular e da sinalização glutamatérgica em células tratadas com cisplatina e/ou CAPE;

B. Investigação do envolvimento do NGF, de receptores trkA bem como da cascata de sinalização neurotrófica ativada pela ligação NGF/trkA no mecanismo de neurotoxicidade da cisplatina e no efeito neurotrófico do CAPE, na presença e na ausência de inibidores e antagonistas específicos de moduladores dessas vias em células PC12 tratadas com cisplatina ou CAPE;

C. Investigação do envolvimento dos receptores trkB no efeito neurotóxico da cisplatina e no efeito neurotrófico do CAPE em modelo *in vitro* de diferenciação neuronal com células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas com cisplatina ou CAPE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA), exceto quando especificado de maneira diferente. Meio de cultura celular, soro equino, soro fetal bovino e a solução de antibióticos foram obtidos da GIBCO® (Life Technologies Corporation, USA). Os reagentes para Western blot foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories, Inc., (Hercules, CA, USA). A glicose marcada com radionuclídeo (^{3}H), líquido de cintilação (Ultima Gold™) e a solução de lise celular (SOLVABLE™) foram obtidos da PerkinElmer (Boston, MA, USA). Todos os demais reagentes usados foram grau analítico P.A.

As soluções foram preparadas com água do tipo I (ultra pura) obtida em sistema de purificação Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, USA). A solução estoque de cisplatina (3,3 mM) foi preparada em solução salina (NaCl 0,9%) e a solução estoque do CAPE (100 mM) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções de trabalho foram preparadas no momento do ensaio. A solução de trabalho da cisplatina (5 µM) foi preparada em solução salina 0,9%, enquanto a solução de trabalho do CAPE (10 µM) foi obtida através da diluição da solução estoque em meio de diferenciação celular (F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification).

3.2 Cultura Celular

Células PC12 e SH-SY5Y foram obtidas da American Type Culture Collection, ATCC (Rockville, MD).

3.2.1 Células PC12

Células PC12 foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm^2 contendo 20 mL de meio de cultura Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS, heat-inactivated, GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA), 10% de soro equino (heat-inactivated, GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) e 1% de uma solução antibiótica contendo 5 mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10

mg/mL de neomicina (PNS, GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) e mantidas a 37ºC em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% ar (Thermo Scientific® Forma Water Jacketed CO_2 Incubator). O meio de cultura foi substituído a cada 3 dias. Para colher as células, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 10 mL de salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês, *phosphate-buffered saline*) para inativação do soro. Em seguida, as células foram incubadas com 5 mL de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich®, diluída 1:2 em PBS) por 5 minutos e posteriormente, a tripsina foi inativada com 10 mL de meio de cultura completo. A suspensão celular foi centrifugada (1000 rpm, 5 min) e ressuspendida em meio de cultura de modo a obter-se a concentração de trabalho necessária para os experimentos. Células de terceira passagem com 80% de confluência foram utilizadas nos experimentos.

3.2.2 Células SH-SY5Y

As células SH-SY5Y foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm^2 contendo 20 mL de meio de cultura F12 Nutriente Mixture (F12 HAM; Sigma Cell Culture, St. Louis, MO) suplementado com 15% de soro fetal bovino (FBS, heat-inactivated, GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) e 1% de uma solução antibiótica contendo 5 mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10 mg/mL de neomicina (PNS, GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA). Células foram mantidas a 37ºC em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 e 95% ar (Thermo Scientific® Forma Water Jacketed CO_2 Incubator). O meio de cultura foi substituído todos os dias. Para colher as células, o meio foi removido e as células foram incubadas com 5 mL de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich®, diluída 1:2 em PBS) por 5 minutos. Em seguida, as células foram diluídas com 5 mL de meio F12 completo, centrifugadas (1000 rpm, 5 min) e ressuspendidas em meio de cultura de modo a obter-se a concentração de trabalho. Células de terceira passagem com 80% de confluência foram utilizadas nos experimentos.

3.3 Contagem em câmara de Neubauer

As células foram centrifugadas e retomadas com tampão PBS e contadas nos quadrantes laterais da câmara de Neubauer (10 µL da suspensão de células foram

colocados em microtubo contendo 90 µL de azul de tripan 0,5%). O critério de inclusão das células nos experimentos foi viabilidade superior a 80%.

3.4 Determinação da concentração de trabalho

3.4.1 Cisplatina

Células PC12 (2,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) por 24 horas para melhor adesão (volume final 300 µL/poço). Após este período, o meio foi substituído por F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification (GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) suplementado com 1% de soro equino, 1% de solução antibiótica. As células foram tratadas com diluições seriais de cisplatina (1, 5, 10, 20, 50 e 100 µM), incubadas por 24 ou 72 horas e, posteriormente, submetidas aos ensaios de viabilidade celular e diferenciação celular, respectivamente. O intervalo de concentrações testado foi baseado em estudo prévio (KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007). A menor concentração de cisplatina que provocou um efeito inibitório sobre a diferenciação celular sem, contudo, matar as células no ensaio de viabilidade celular (não citotóxica), foi escolhida como a concentração de trabalho.

3.4.2 CAPE

Cinco diferentes concentrações de CAPE (1, 5, 10, 25 e 50 µM) foram avaliadas em relação ao potencial de minimizar a inibição da diferenciação celular induzida pela cisplatina.

Células PC12 (2,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) por 24 horas para maior adesão (volume final 300 µL/poço). Após este período, o meio foi substituído por F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification (GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) suplementado com 1% de soro equino e 1% de solução antibiótica. As células foram então incubadas (37ºC, 72h) com as seguintes adições: NGF 100 ng/mL; CIS 5 µM + NGF ou CIS 5 µM + NGF + diluições seriais de CAPE (1, 5, 10, 25 e 50 µM). Células sem tratamento foram utilizadas como controle. A concentração de CAPE com maior capacidade de minimizar a inibição da

diferenciação celular induzida pela concentração não citotóxica de cisplatina (5 µM) foi selecionada como concentração de trabalho.

.

3.5 Ensaios de Citotoxicidade

3.5.1 Ensaio de redução do MTT – Curva Dose-Resposta da Cisplatina

O ensaio do MTT é um indicador de viabilidade celular que avalia a função mitocondrial das células com base na redução enzimática do MTT a cristais de formazan (azul escuro/púrpura), pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989).

Alíquotas de 200 µL de suspensão celular (2,0 x 10^4 células/poço) foram incubadas com diferentes concentrações de cisplatina (1, 5, 10, 20, 50, 100 ou 200 µM) em placas de 96 poços, por 24 horas a 37ºC em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. Ao término da incubação, foram adicionados 20 µL de uma solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço, seguida de incubação por 3 horas a 37°C. Em seguida, a placa foi centrifugada (1000 rpm, 5 min), o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 200 µL de DMSO em cada poço. A placa foi agitada (37°C, 5 min) e a absorbância da solução foi determinada a 570 nm em leitora de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific) utilizando-se o DMSO como branco de reagentes.

3.5.2 Atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDH)

Este ensaio avalia a integridade da membrana em função da quantidade de LDH citoplasmática liberada para o meio de cultura. O ensaio é baseado na redução do NAD a NADH pela ação da LDH, sendo que o NADH é determinado por espectrofotometria a 450 nm.

Para isso, alíquotas de 1 mL de suspensão celular (1,0 x 10^6 células/poço) foram incubadas em placas de 12 poços (37ºC, 5% CO_2) por 24 horas para maior adesão. As células foram expostas à diferentes concentrações de cisplatina (1, 5, 10, 20, 42; 84; 167 ou 333 µM) por 24 horas. Após o período de incubação, coletou-se o meio de cultura com a finalidade de determinar o nível de LDH que foi liberada para o meio, um marcador da perda da integridade da membrana. A determinação da

atividade de LDH liberada foi realizada como descrito pelo fabricante (Colorimetric Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, TOX7, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA).

3.5.3 Ensaio do MTT – Proteção do CAPE contra a citotoxicidade da cisplatina

O efeito protetor do CAPE contra a citotoxicidade induzida pela cisplatina foi avaliado através do ensaio colorimétrico do MTT brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, de acordo com método previamente descrito (MOSMANN, 1983).

Alíquotas de 200 µL de suspensão celular (2,0 x 10^4 células/poço) foram incubadas em placas de 96 poços com CIS 32 µM (IC_{50}) e diferentes concentrações de CAPE (1, 5, 10, 25, 50 ou 100 µM) por 24 horas, a 37ºC em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. Ao término da incubação, foram adicionados 20 µL de uma solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço, seguida de incubação por 3 horas a 37°C. Em seguida, a placa foi centrifugada (1000 rpm, 5 min), o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 200 µL de DMSO em cada poço. A placa foi agitada (37°C, 5 min) e a absorbância da solução foi determinada a 570 nm em leitora de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific), utilizando-se o DMSO como branco de reagentes. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem do controle sem tratamento.

3.6 Determinação da Caspase – 3

Alíquotas de 1 mL de suspensão celular (1,0 x 10^7 células/poço) foram incubadas com CIS 5 µM em placas de 6 poços (37ºC, 24 horas). Após a incubação, o meio de cultura foi descartado, foram adicionados 500 µL de PBS gelado e as células foram removidas dos poços e centrifugadas (2500 rpm, 5 minutos) a 4ºC. O sobrenadante foi removido, os precipitados foram lavados com PBS e centrifugados novamente (2500 rpm, 5 minutos) a 4ºC. O PBS foi removido e os precipitados foram retomados em tampão de lise. Os lisados foram submetidos ao procedimento para determinação da atividade da caspase-3 conforme descrito pelo fabricante (Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric. Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). A atividade da caspase-3 foi determinada através da monitorização da absorbância a 405 nm.

3.7 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Foi empregado o reativo não fluorescente DCFH-DA (2,7 diclorodihidro fluoresceína diacetato), para o qual a membrana celular é permeável. Após difusão para o interior celular, o DCFH-DA sofre a ação das esterases celulares e é convertido a DCFH (não fluorescente), que ao ser oxidado é convertido em DCF (altamente fluorescente). Assim, a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de espécies reativas de oxigênio.

As células (1,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placa de 96 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% por 24 horas, para melhor adesão. No dia seguinte, o meio de cultura celular foi removido e foram realizadas 2 lavagens com tampão KRH (Krebs-Ringer HEPES, pH=7,2), seguida pela incubação com o reativo DCFH-DA (100 µM) por 30 minutos. Ao término da incubação, o reativo foi removido, seguida pelas lavagens (2x) com tampão KRH. Em seguida, as células foram incubadas com o tampão KRH em associação com várias concentrações de cisplatina (1, 5, 10, 20, 42; 84; 167; 333 µM). Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo, enquanto que, as células tratadas com H_2O_2 (300 µM), foram utilizadas como controle positivo. A fluorescência foi determinada em leitora de microplacas operando a 485/530nm (excitação/emissão, respectivamente), nos seguintes tempos de incubação: 0, 30 min, 1h, 1h:30min, 2h, 2h:30 min, 3h).

Avaliou-se também o efeito da longa incubação (72 h) de cisplatina (5 µM) e da possível proteção do CAPE (10 µM) sobre a formação das ERO. Para isso, as células (1,0 x 10^5 células/poço) foram plaqueadas em placa de 96 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% e incubadas por 24 horas, para melhor adesão. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com DCFH-DA (100 µM) em meio F12K (livre de soro), durante 30-60 minutos. Ao término da incubação, o meio dos poços foi removido, seguido pela lavagem (2x) com 200 µL de PBS 1x. Em seguida, as células foram incubadas (37ºC, 72h) com pelo menos uma das seguintes adições: H_2O_2 300 µM, CIS 5 µM, CAPE 10 µM e CIS 5 µM + CAPE 10 µM. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. Ao fim da incubação, o meio da placa foi removido e os poços foram lavados (1x) com 200 µL de PBS1x. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de lise celular (SOLVABLE™) em cada poço, seguida pela transferência do conteúdo para uma placa de 96 poços preta

(específica para fluorescência) e leitura em espectrofluorímetro a 485/530 nm (excitação/emissão, respectivamente).

3.8 Diferenciação Celular: Ensaio Quantitativo em células PC12

Alíquotas de 300 µL de suspensão celular (2,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) por 24 horas para maior adesão. Após este período, o meio foi substituído por F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification (GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) suplementado com 1% de soro equino e 1% de solução antibiótica. As células foram então incubadas (37ºC, 72h) com uma das seguintes adições: NGF 100 ng/mL; CIS 5 µM + NGF; CAPE 10 µM; CAPE 10 µM + NGF ou CAPE 10 µM + CIS 5 µM + NGF. Células sem tratamento foram utilizadas como controle.

A análise morfométrica foi realizada nas imagens digitalizadas de 4 campos por poço, obtidas sob microscopia invertida de contraste de fase (Carl Zeiss Axio Observer A1, 400x), após 24, 48 e 72 horas de exposição. O número de células diferenciadas (porcentagem de células com neuritos) foi analisado usando o Image J open source software (RASBAND, 1997-2014). Apenas aquelas células com pelo menos um neurito com comprimento igual ou superior ao diâmetro do corpo celular foram consideradas diferenciadas (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando culturas celulares preparadas em dias diferentes. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.9 Diferenciação Celular: Ensaio Quantitativo em linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano

3.9.1 Efeito da cisplatina sobre a diferenciação das células SH-SY5Y

Células SH-SY5Y (3,0 x 10^4 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços em meio F12 HAM suplementado com 15% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução antibiótica (penicilina, estreptomicina, neomicina, PNS, GIBCO®) por 24 horas para maior adesão. Após este período, o meio de cultura foi substituído pelo meio de diferenciação (F12 HAM suplementado com 1% FBS e 1% mix de antibiótico)

e as células foram incubadas por 5 dias, durante os quais o meio (com as respectivas adições) foi renovado a cada 2 dias (volume final de 500 µL/poço).

O efeito da cisplatina sobre a diferenciação em células SH-SY5Y foi avaliado em duas condições experimentais diferentes: (a) tratamento simultâneo com cisplatina e ácido retinóico (AR), e (b) pré-tratamento de 24 h com cisplatina antes da adição de AR. Na primeira condição, células foram simultaneamente tratadas com CIS 5 µM e AR 10 µM durante 5 dias. Na segunda condição, as células foram previamente, tratadas com CIS 5 µM por 24 horas. Após este período, o meio foi substituído (para remoção da cisplatina), seguindo-se adição de AR 10 µM e incubação por 5 dias, sendo que o meio de cultura (com as adições) foi renovado a cada dois dias. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. A análise morfométrica foi realizada nas imagens digitalizadas de 4 campos por poço, obtidas sob microscopia invertida de contraste de fase (Carl Zeiss Axio Observer A1, 400x), a cada 24h de incubação durante 5 dias (120h). O número de células diferenciadas (porcentagem de células com neuritos) foi analisado usando o Image J open source software (RASBAND, 1997-2014). Apenas aquelas células com pelo menos um neurito com comprimento igual ou maior que o diâmetro do corpo celular foram consideradas diferenciadas (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando cultura celulares preparadas em dias diferentes. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.9.2 Efeito do CAPE sobre a diferenciação das células SH-SY5Y

Células SH-SY5Y (3,0 x 10^4 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços em meio F12 HAM suplementado com 15% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de mix de antibiótico (penicilina, estreptomicina, neomicina, PNS, GIBCO®) por 24 horas para melhor adesão. Após este período, o meio de cultura foi substituído (F12 HAM suplementado com 1% FBS, 1% mix de antibiótico; volume final de 500 µL/poço). Então, as células foram incubadas (37ºC, 72 horas) com pelo menos uma das seguintes adições: CAPE 10 µM; AR 10 µM ou CAPE 10 µM + AR 10 µM. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo.

A análise morfométrica foi realizada nas imagens digitalizadas de 4 campos por poço, obtidas sob microscopia invertida de contraste de fase (Carl Zeiss Axio Observer A1, 400x), a cada 24h de incubação durante 3 dias (72h). O número de células

diferenciadas (porcentagem de células com neuritos) foi analisado usando o Image J open source software (RASBAND, 1997-2014). Apenas aquelas células com pelo menos um neurito com comprimento igual ou maior que o diâmetro do corpo celular foram consideradas diferenciadas (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando cultura celulares preparadas em dias diferentes. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.10 Análise de Sinapsina I, Sinaptofisina e GAP-43 por Western Blot

3.10.1 Preparo do Lisado celular

Células PC12 (2,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) por 24h para adesão e então tratadas conforme descrito na seção 3.8. Após 72 h de incubação, as células foram removidas com auxílio de raspador, transferidas para microtubos e centrifugadas (5 min, 4ºC, 1000 rpm). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspendido em 40 µL de tampão de lise CelLytic (C29978 Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) contendo coquetel inibidor de protease 1:200 e coquetel inibidor de fosfatase 1%. O procedimento de lise foi realizado com os tubos colocados no gelo para reduzir a atividade das proteases. Após 10 minutos, o lisado celular foi centrifugado (10 min, 4ºC, 12.000 rpm), os precipitados foram desprezados e os lisados celulares (sobrenadantes) foram armazenados em freezer (-80°C) até a realização dos ensaios. Uma alíquota de 10 µL de cada lisado celular foi analisado para determinação das proteínas pelo método de Bradford.

3.10.2 Dosagem de Proteínas do lisado celular (Bradford)

O reativo de cor Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Os lisados celulares e o reagente de cor foram diluídos com água (1:5) e foi utilizada uma curva de calibração (40, 80, 200 e 400 µg/mL) preparada com soro-albumina bovina (BSA) a partir de uma solução estoque (10 mg/mL). A absorbância (595 nm) foi determinada em leitora de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific) e a concentração de proteínas de cada

amostra foi calculada com base na curva de calibração e multiplicada pelo fator de diluição (5).

3.10.3 Eletroforese (SDS-PAGE)

As amostras foram adicionadas de igual volume de tampão de Laemmli (1X) (65,8 mM Tris; pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol; 5% β mercaptoetanol) e aquecidas a 98°C por 5 minutos. Alíquotas de 25 µL contendo 10 µg de proteína total foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (10 poços) e separadas em cuba eletroforética contendo 1 L de tampão Tris /glicina/SDS (1h, 160V).

3.10.4 Transferência

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em cuba eletroforética contendo 1L de tampão Tris/Glicina (1h, 0,37 A).

3.10.5 Reação imune

As membranas foram bloqueadas por 30 minutos (temperatura ambiente, 300 rpm) com 5% de leite desnatado ou 5% de BSA (para fosfoproteína) em TTBS (tampão TBS com Tween 20). As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários rabbit anti-Sinapsina I (1:1000), mouse anti-Sinaptofisina (1:400) e mouse anti-GAP-43 (1:1250), todos obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA), overnight a 4°C, 300 rpm. Ao término da incubação, as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas (1h, temperatura ambiente, 300 rpm) com o anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase (anti-mouse ou anti-rabbit IgG – HRP, 1:20,000). Após lavagem com TTBS e TBS, a membrana foi tratada com reativo ECL (Clarity, BioRad) e foi realizada a digitalização das bandas em sistema de detecção de quimioluminescência ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). A quantificação das bandas foi realizada por densitometria ótica (D.O) usando o Image J open source software (RASBAND, 1997-2014). Posteriormente, as membranas foram tratadas com tampão de *stripping* (SDS 2 %; Tris 62,5 mM pH 6,8; mercaptoetanol 100 mM) e foram submetidas à imunorreação para quantificação de

beta-actina (1:3000) (controle interno de carregamento). Os valores de D.O das proteínas sinapsina I, sinaptofisina e GAP- 43 foram normalizados dividindo-se pelo valor de D.O da beta-actina (L'EPISCOPO et al., 2011).

3.11 Análise de F- actina e β-III Tubulina por Western Blot

O preparo do lisado celular, a dosagem de proteínas e as etapas de eletroforese e transferência foram realizadas conforme descritos nos itens 3.10.1; 3.10.2; 3.10.3 e 3.10.4, respectivamente.

3.11.1 Reação imune

As membranas foram bloqueadas por 30 minutos (temperatura ambiente, 300 rpm) com 5% de leite desnatado ou 5% de BSA (para fosfoproteína) em TTBS (tampão TBS com Tween 20). Então, as membranas foram incubadas (overnight a 4°C, 300 rpm) com os anticorpos primários mouse anti-F-actina (1:100) e rabbit anti-β-III tubulina (1:1000), ambos obtidos da Abcam (Cambridge, MA, EUA). Ao término da incubação, as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas (1h, temperatura ambiente, 300 rpm,) com o anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase (anti-rabbit IgG – HRP ou anti-mouse IgM, 1:20.000). Após lavagem com TTBS e TBS, a membrana foi tratada com reativo ECL (Clarity, BioRad) e foi realizada a digitalização das bandas em sistema de detecção de quimioluminescência ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). A quantificação das bandas foi realizada por densitometria ótica (D.O) usando o Image J open source software (RASBAND, 1997-2014). Posteriormente, as membranas foram tratadas com tampão de *stripping* (SDS 2 %; Tris 62,5 mM pH 6,8; mercaptoetanol 100 mM) e foram submetidas à imunorreação para quantificação de beta-actina (1:3000) (controle interno de carregamento). Os valores de D.O das proteínas F-actina e β-III-tubulina foram normalizados dividindo-se pelo valor de D.O da beta-actina (L'EPISCOPO et al., 2011).

3.12 Análise de SIRT-1, AMPK α e FOSFO-AMPK α por Western Blot

3.12.1 Lisado celular

Células PC12 (5,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 12 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) para adesão e então tratadas conforme descrito na seção 3.8.

O preparo do lisado celular, a dosagem de proteínas e as etapas de eletroforese e transferência foram realizadas conforme descritos nos itens 3.10.1; 3.10.2; 3.10.3 e 3.10.4, respectivamente.

3.12.2 Reação imune

As membranas foram bloqueadas por 30 minutos (temperatura ambiente, 300 rpm) com 5% de leite desnatado de ou 5% BSA (para fosfoproteínas) em TTBS (tampão TBS com Tween 20). Então, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários rabbit anti-SIRT1 (1:1000), rabbit anti-AMPK α (1:500) e rabbit anti-fosfo-AMPK α (1:500), todos obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA), overnight a 4°C, 300 rpm. Ao término da incubação, as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas (1h, temperatura ambiente, 300 rpm,) com o anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase (anti-rabbit IgG – HRP 1:20,000). Após lavagem com TTBS e TBS, a membrana foi tratada com reativo ECL (Clarity, BioRad) e foi realizada a digitalização das bandas em sistema de detecção de quimioluminescência ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). A quantificação das bandas foi realizada por densitometria ótica (D.O) usando o Image J open source software (RASBAND, 1997-2014). Posteriormente, as membranas foram tratadas com tampão de *stripping* (SDS 2 %; Tris 62,5 mM pH 6,8; mercaptoetanol 100 mM) e foram submetidas à imunorreação para quantificação de beta-actina (1:3000) (controle interno de carregamento). Os valores de D.O das proteínas SIRT-1, AMPK α e FOSFO-AMPK foram normalizados dividindo-se pelo valor de D.O da beta-actina (L'EPISCOPO et al., 2011).

3.13 Determinação dos níveis de NGF

Células PC12 (2,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placa de 24 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% por 24 horas para melhor adesão. Após este período, foram feitas as seguintes adições: CIS 5 µM ou CAPE 10 µM. Células sem

tratamento foram utilizadas como controle negativo. As células foram incubadas por 72 horas a 37ºC. Depois disso, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi analisada utilizando o kit RAB0381 Ensaio Imunosorbente Ligado a Enzima (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) conforme as recomendações do fabricante. A leitura da absorbância foi determinada a 450 nm em leitora de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific).

3.14 Imunofluorescência para Neurofilamento-200

A imunofluorescência para o neurofilamento 200 foi realizada de acordo com procedimento descrito na literatura com pequenas modificações (SCHIMMELPFENG; WEIBEZAHN; DERTINGER, 2004).

Células PC12 (2,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas (37ºC, 5% CO_2, 24 h) em placas de 12 poços, contendo em cada poço, uma lamínula estéril revestida com poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Após esse período, as células foram incubadas (37ºC, 5% CO_2, 72 h) com uma das seguintes adições: NGF 100 ng/mL; CIS 5 µM + NGF; CAPE 10 µM; CAPE 10 µM + NGF ou CAPE 10 µM + CIS 5 µM + NGF. Então, o meio de cada poço foi removido, as células foram fixadas com 1 mL de paraformoldeído 4% em PBS, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 2 lavagens com 500 µL de PBS e as células foram permeabilizadas por 10 minutos a temperatura ambiente em 400 µL de PBS contendo 0,2% de Triton X-100. Uma nova lavagem foi realizada com 500 µL de PBS e a ligação não específica do anticorpo foi bloqueada com PBS contendo 1% de BSA + 0,1% de Tween, por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com o anticorpo primário rabbit anti-neurofilamento 200 (diluição 1:80 em PBS, contendo 3% de BSA, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), overnight a 4ºC. No dia seguinte, as células foram cuidadosamente lavadas 2 vezes com 500 µL de PBS, seguindo-se a reação com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG Fluorescein Isothiocynate (FITC) produzido em cabra (diluição 1:80 em PBS, contendo 3% de BSA, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), à temperatura ambiente, por 1 hora e protegido da luz. Uma nova etapa de lavagem foi realizada com 500 µL de PBS seguido da marcação do núcleo com 20 µM de Hoeschst 33342 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), por 2 minutos.

Por fim, as lâminas foram analisadas sob microscopia de fluorescência (Olympus BX51, 400x) utilizando os filtros específicos para FITC e Hoechst. As

imagens foram capturadas utilizando o software Standard Cell Sense. Três experimentos independentes foram executados. Após a obtenção das imagens, a fluorescência celular total corrigida (CTCF) foi calculada utilizando-se o Image J open source software (RASBAND, 1997-2014) de acordo com a seguinte fórmula: CTCF = Densidade Integrada – (área celular selecionada x média da fluorescência de background).

3.15 Captação de Glicose

As células PC12 (1,0 x 10^6 células/poço) foram incubadas em placas de 12 poços, revestidas com poli-L-lisina 0,01%, por 24 horas para melhor adesão. Após este período, as células foram incubadas (37ºC, 72 horas) com as seguintes adições: CIS 5 µM; CAPE 10 µM ou CIS 5 µM + CAPE 10 µM. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo.

Ao término do período de incubação, o meio de cultura celular foi removido e foram realizadas 2 lavagens com 1 mL de PBS. Em seguida, foi adicionado 1 mL de DMEM sem glicose (GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) em todos os poços e, então, as células do controle positivo foram incubadas com Citocalasina B 10 µM, um inibidor da captação de glicose, durante 1 hora. Em seguida, as células foram incubadas com uma solução de glicose não marcada (50 µM) e glicose marcada com radionuclídeo trício (Deoxi-D-glicose, 2-[1,2-^{3}H(N)]; 1,0 µCi) durante 30 minutos. Ao término da incubação, o meio dos poços foi removido e foram realizadas 3 lavagens com 1 mL de PBS. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de lise celular (SOLVABLE^{TM}, PerkinElmer; Boston, MA, USA) em cada poço, aguardando-se 10 minutos para completa lise celular, seguida pela adição de 1 mL de líquido de cintilação (Ultima Gold^{TM}, PerkinElmer; Boston, MA, USA). A placa foi agitada por 10 minutos e, em seguida, o conteúdo dos poços foi transferido para tubos cônicos de 2 ml. A leitura foi realizada em detector de cintilação Microbeta 1450 LSC Luminescence Counter (PerkinElmer, Waltham, MA) e os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM) (ABDUL MUNEER et al., 2011).

3.16 Ensaio inibição dos receptores de trkA em células PC12

K-252a (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), é um inibidor específico dos receptores trkA (tirosina quinase) e, então, bloqueia seletivamente os efeitos do fator de crescimento neuronal (NGF) e agonistas de trkA em células PC12 (TAPLEY; LAMBALLE; BARBACID, 1992). A solução estoque do inibidor K252a (1 mM) foi preparada em DMSO, armazenada a -20ºC e protegida da luz. A solução de trabalho (100 nM) foi obtida pela diluição da solução estoque em PBS, no momento do uso.

Células PC12 (2,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% por 24 horas para melhor adesão (volume final 300 µL/poço). Após este período, o meio foi substituído por F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification (GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) suplementado com 1% de soro equino e 1% mix de antibiótico (penicilina, estreptomicina, neomicina, PNS, GIBCO®). Primeiramente, as células foram expostas ao inibidor K252a (100 nM), por 1 hora, seguindo-se incubação (37ºC, 168 horas) com as seguintes adições: CAPE 10 µM, NGF 100 ng/mL, K252a 100 nM + CAPE 10 µM ou K252a 100 nM + NGF 100 ng/mL. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. O crescimento de neuritos foi avaliado utilizando microscopia invertida de contraste de fase (Carl Zeiss Axio Observer A1, microscópio invertido, 400x). As imagens digitalizadas de 4 campos por poço foram obtidas após 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 horas de incubação e foram analisadas usando-se o Image J open source software (RASBAND, 1997-2014). Apenas aquelas células com pelo menos um neurito com comprimento igual ou maior do que o diâmetro do corpo celular foram consideradas diferenciadas (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004).

3.17 Ensaio com inibidores específicos das vias de sinalização celular

Foram empregados os inibidores quinase-específicos MEK1/2 (U0126) e PI3K/Akt (LY294002), ambos obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). As soluções estoque do inibidor LY294002 (30 mM) e U0126 (10 mM) foram preparadas em DMSO, armazenadas a -20ºC e protegidas da luz. As soluções de trabalho de LY294002 (30 µM) e U0126 (10 µM) foram preparadas pela diluição em meio de diferenciação celular F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification (GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) no momento do uso.

Células PC12 (2,0 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços revestidas com poli-L-lisina 0,01% por 24 horas para melhor adesão (volume final 300 µL/poço). Após este período, o meio foi substituído por F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification (GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) suplementado com 1% de soro equino e 1% mix de antibiótico (penicilina, estreptomicina, neomicina, PNS, GIBCO®). Primeiramente, as células foram incubadas com os inibidores nas concentrações específicas, por 1 hora, seguindo-se incubação (37ºC, 72 horas) com as seguintes adições: CAPE 10 µM, NGF 100 ng/mL, LY294002 30 µM + CAPE 10 µM, LY294002 30 µM + NGF 100 ng/mL, U0126 10 µM + CAPE 10 µM ou U0126 10 µM + NGF 100 ng/mL. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo.

O crescimento de neuritos foi avaliado utilizando microscopia invertida de contraste de fase (Carl Zeiss Axio Observer A1, microscópio invertido, 400x). As imagens digitalizadas de 4 campos por poço foram obtidas após 24 h, 48 h, 72 horas de incubação e foram analisadas usando-se o Image J open source software (RASBAND, 1997-2014). Apenas aquelas células com pelo menos um neurito com comprimento igual ou maior do que o diâmetro do corpo celular foram consideradas diferenciadas (DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004).

3.18 Transfecção de transportadores de glutamato EAAT2 em células COS-7

3.18.1 Transformação de bactérias para produção de DNA

Uma suspensão celular de bactérias *E. coli* competentes (XL10 Gold) foi retirada do freezer -80ºC e, em seguida, foi feito o descongelamento mantendo a suspensão celular no gelo. Placas de ágar contendo o antibiótico carbenecilina (50 µg/mL) foram aquecidas a 37ºC na incubadora. A carbenecilina foi o antibiótico utilizado para selecionar o plasmídeo de interesse, neste caso, o vetor CMV (vetor de citomegalovírus humano), que teve introduzido com técnicas de Biologia Molecular, o DNA do EAAT2. Posteriormente, 50 µL da suspensão celular descongelada foram transferidos para um tubo de polietileno, os quais foram mantidos no gelo. Em seguida, foi adicionado um volume necessário de DNA à suspensão celular para obter-se a concentração final de 1 ng/µL de DNA. Os tubos foram homogeneizados e incubados

por 20 a 30 minutos, no gelo. Ao término da incubação, foi realizado um choque térmico, no qual o tubo foi aquecido, em banho maria, a 42ºC, por 1 minuto. Em seguida, o tubo foi incubado no gelo por 5 minutos para permitir a recuperação das células. Foram adicionados 150 µL de meio de crescimento SOC (Thermofisher Scientific, USA) em cada tubo, mantidos sob agitação por 1 hora a 37ºC. O conteúdo do tubo foi plaqueado para a placa de ágar, previamente aquecida, a qual foi incubada a 37ºC, overnight. No outro dia, as colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para um volume apropriado de caldo LB (Luria Broth, Thermofisher Scientific, USA) contendo 50 µg/mL de antibiótico carbenecilina e, posteriormente, incubados sob agitação, a 37ºC, overnight para permitir o crescimento. No outro dia, o DNA foi extraído das bactérias usando-se o kit de extração MidiPrep (Qiagen, USA) e sua concentração foi determinada. O DNA foi estocado no freezer e utilizado posteriormente para transfecção de células.

3.18.2 Ensaios de transfecção em células COS-7

As células COS-7 foram obtidas da American Type Culture Collection, ATCC (Rockville, MD), e mantidas no meio de cultura Dulbecco´s Modified Eagle's Medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e solução antibiótica contendo penicilina e estreptomicina, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 a 37 ºC.

Para a realização da transfecção, o meio de cultura das garrafas contendo as células COS-7 foi removido, e em seguida, foi realizado uma lavagem com 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS). Em seguida foram adicionados 5 mL de tripsina, e as células foram incubadas por 5 minutos, a 37ºC, 5% CO_2. Foi preparado uma quantidade de tubos necessários para a quantidade de DNA transfectado. Neste caso, foram preparados dois tubos, sendo que um deles para o CMV, vetor vazio de citomegalovírus humano (utilizado como background), e o outro tubo contendo o DNA com o EAAT2. Nesses tubos foram adicionados meio Optimem (50 µL/poço) (Thermofisher Scientific), solução de transfecção Mirus (1,5 µL/poço) (TransIT®-LT1, Mirus, USA) e os DNA (CMV e EAAT2; 0,5 µg/poço) em volumes adequados para a quantidade de placas. A solução foi incubada por 15-30 min e, em seguida, foram adicionados volumes apropriados da suspensão celular (5,0 x 10^4 células/poço).

Alíquotas de 500 µL da suspensão celular foram transferidas para placas de 24 poços, as quais foram incubadas a 37ºC a 5% CO_2 até a realização do ensaio de captação.

3.18.3 Ensaio de captação de neurotransmissores

Após a transfecção celular, as células foram incubadas com as diferentes concentrações de cisplatina (0,48; 2,4; 12; 60 e 300 µM) por 30 minutos, 12 horas ou 24 horas. Ao fim do período de incubação, o meio de cada poço foi removido e, em seguida, os poços foram lavados com 300 µL de tampão fosfato suplementado com cálcio e magnésio [PBS – CM (PBS+1 mM $CaCl_2$ + 0,1 mM $MgCl_2$)]. Ao término da lavagem, iniciou-se o ensaio de captação através da adição de 100 µL de glutamato radiomarcado com trício ([^{3}H]-L- glutamato) na concentração final de 50 nM, ao tampão PBS-CM. As placas foram incubadas por 10 minutos, à temperatura ambiente para permitir a continuação da captação. Por fim, a captação foi finalizada realizando-se 2 lavagens com 300 µL de PBS-CM. Em seguida, foram adicionados 400 µL de SDS 1% / NaOH 0,1M em cada poço, mantendo a placa sob agitação por 20 minutos. Foram adicionados 3 mL de líquido de cintilação em cada *vial* de cintilação e, em seguida, os 400 µL da suspensão celular homogeneizada foram transferidos para os tubos de cintilação. A contagem (1 minuto/amostra) foi realizada no contador de cintilação MicroBeta Wallac 1450 (Perkin Elmer).

3.19 Ensaio da captação de glutamato em células HEK

Os ensaios em células HEK foram realizados com dois tipos de células, sendo as que não expressam transportadores (controle) e as células com transfecção estável para o transportador de glutamato EAAT2. As células HEK transfectadas estavelmente com EAAT2 foram produzidas no laboratório de Susan G. Amara, na Universidade de Pittsburgh, Pensilvânia, EUA, e gentilmente doadas para o laboratório de Andréia C.K. Mortensen, na Universidade Drexel, Filadélfia, Pensilvânia, EUA, onde foram conduzidos os ensaios durante o doutorado sanduíche.

As células HEK foram mantidas no meio de cultura Dulbecco´s Modified Eagle's Medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), solução

antibiótica contendo penicilina e estreptomicina e higromicina (100 µg/mL) em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 a 37 ºC.

Para a realização do ensaio, o meio de cultura das garrafas contendo as células foi removido, e em seguida, foi realizada uma lavagem com 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS). Em seguida, foram adicionados 5 mL de tripsina, e as células foram incubadas por 5 minutos, a 37ºC, 5% CO_2. As células foram transferidas para placas de 24 poços (5,0 x 10^4 células/500 µL/poço). As placas foram incubadas a 37ºC a 5% CO_2 até a realização do ensaio de captação.

3.19.1 Ensaio de captação de neurotransmissores

No dia posterior ao plaqueamento, as células foram incubadas com as concentrações de cisplatina (0,48; 2,4; 12; 60 e 300 µM) durante 24, 48 e 72 horas. Ao fim do período de incubação, o meio de cada poço foi removido e, em seguida, os poços foram lavado com 300 µL de tampão fosfato suplementado com cálcio e magnésio [PBS – CM (PBS+1 mM $CaCl_2$ + 0,1 mM $MgCl_2$)]. Ao término da lavagem, iniciou-se o ensaio de captação através da adição de 100 µL de glutamato radiomarcado com trício ([^{3}H]-L- glutamato) na concentração final de 50 nM, ao tampão PBS-CM. As placas foram incubadas por 10 minutos, à temperatura ambiente para permitir a continuação da captação. Por fim, a captação foi finalizada realizando-se 2 lavagens com 300 µL de PBS-CM. Em seguida, foram adicionados 400 µL de SDS 1% / NaOH 0,1M em cada poço, mantendo a placa sob agitação por 20 minutos. Foram adicionados 3 mL de líquido de cintilação em cada *vial* de cintilação e, em seguida, os 400 µL da suspensão celular homogeneizada foram transferidas para os tubos de cintilação. A contagem (1 minuto/amostra) foi realizada no contador de cintilação MicroBeta Wallac 1450 (Perkin Elmer).

3.20 Ensaio da captação de glutamato em astrócitos (glia)

Os astrócitos são células que, obtidas de cérebros de ratos neonatos (dois a quatro dias de vida), expressam os transportadores de glutamato endógeno. Tais células foram, gentilmente dissecadas e plaqueadas pelo aluno Ryan Wertz do laboratório de Andréia C.K. Mortensen, na Universidade Drexel, Filadélfia, Pensilvânia, EUA. Após a obtenção, as células foram mantidas no meio de cultura

Dulbecco´s Modified Eagle's Medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e solução antibiótica contendo gentamicina (50 µg/mL) em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 a 37 ºC. O meio de cultura foi renovado a cada 3 a 4 dias.

Ao adquirirem confluência adequada para a realização dos experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($1x10^4$ células/ 250 µL/poço). As placas foram incubadas a 37ºC a 5% CO2, durante 14 dias até a realização do ensaio de captação.

3.20.1 Ensaio de captação de neurotransmissores

No dia posterior ao plaqueamento, as células foram tratadas com cisplatina nas concentrações de 3, 30 e 300 µM, durante 30 minutos, 12, 24, 48 e 72 horas. Para as placas de 96 poços, o ensaio de captação foi realizado de maneira similar ao descrito no item 3.19.1, porém, foi utilizado a Elx50 Biotek *plate washer* para troca de tampões. A contagem foi realizada no contador de cintilação Wallac, Shelton, CT, USA.

3.21 Análise Estatística

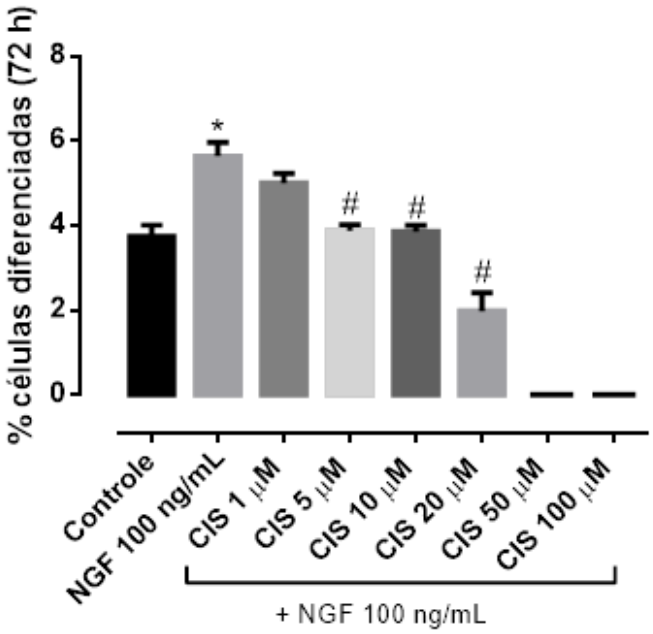
Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se análise de variância (One-way ANOVA) para comparações múltiplas, seguida por Bonferroni post-test (GraphPad Software, versão 5.0 para Windows, San Diego, California, USA). Diferenças entre pares foram analisados utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes com culturas celulares preparadas em dias diferentes.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da cisplatina na diferenciação de células PC12

O efeito de diluições seriais da cisplatina (1, 5, 10, 20, 50 e 100 µM) sobre a diferenciação de células PC12 estimuladas com NGF foi avaliado após 72 horas de exposição. A porcentagem de células diferenciadas no grupo controle positivo (NGF 100 ng/mL; 5,64 ± 0,32%) foi significativamente maior em relação às células sem tratamento (controle negativo; 3,74 ± 0,26%). Nenhuma diferença significativa foi observada na diferenciação das células tratadas com CIS 1 µM (5,00 ± 0,22%) em relação ao controle positivo (NGF 100 ng/mL). No entanto, houve redução na porcentagem de diferenciação nas células tratadas com CIS 5 µM (3,87 ± 0,14%), CIS 10 µM (3,86 ± 0,14%) e 20 µM (1,97 ± 0,43%) quando comparadas ao controle positivo (NGF 100 ng/mL). Altas concentrações de cisplatina (50 e 100 µM) bloquearam totalmente a diferenciação das células PC12. Os resultados são apresentados na Figura 8.

Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de cisplatina (1 – 100 µM) sobre a diferenciação em células PC12 após 72 h de incubação.



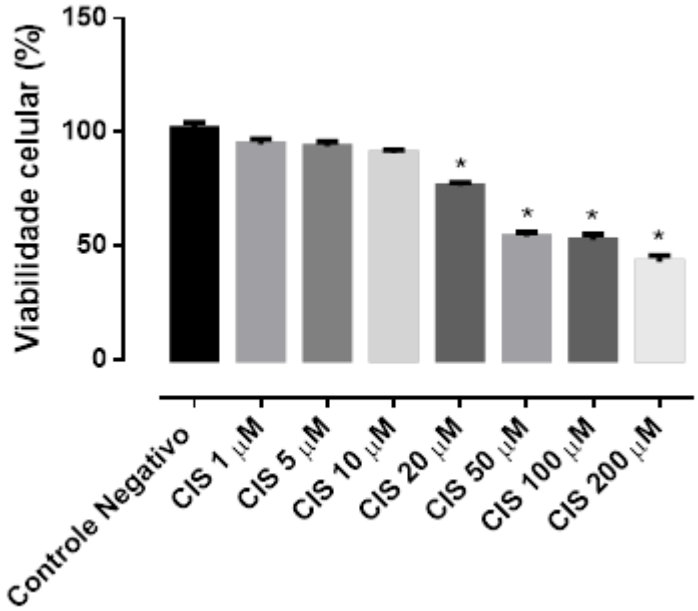
Legenda: Os neuritos foram contados após 72 horas de exposição ao NGF e/ou diferentes concentrações de cisplatina (1, 5, 10, 20, 50 e 100 µM). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao controle positivo (NGF 100 ng/mL).

4.2 Citotoxicidade da cisplatina – MTT e LDH

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, que reflete a atividade mitocondrial. Os grupos tratados foram comparados ao controle negativo (não tratado), assumindo-se 100% de viabilidade para o controle negativo.

Como observado na Figura 9, nenhuma redução significativa foi observada na viabilidade das células tratadas com CIS 1 μM (94,86 ± 2,12%), 5 μM (93,84 ± 2,10%) e 10 μM (90,86 ± 1,42%). Quando as células PC12 foram expostas a 20 μM (76,53 ± 1,50%), 50 μM (54,24 ± 1,83%), 100 μM (52,78 ± 2,39%) ou 200 μM de cisplatina (43,13 ± 2,66%), houve redução significativa na viabilidade celular em relação ao controle negativo (101,8 ± 2,55%).

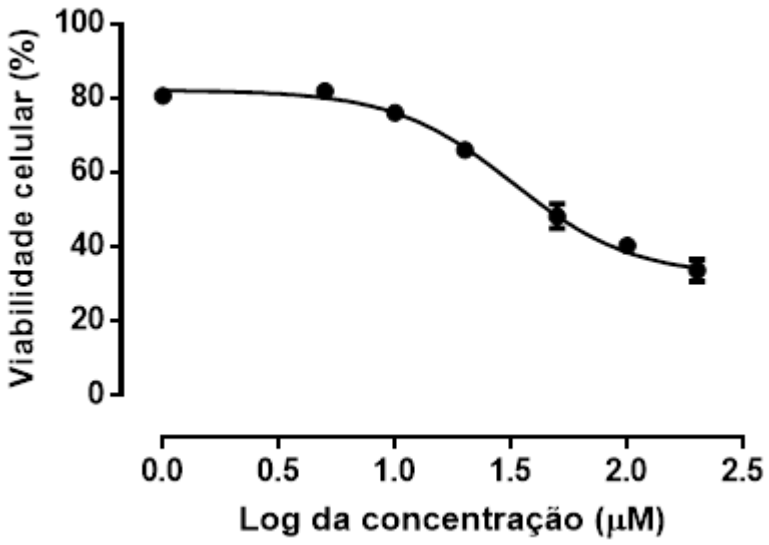
Figura 9. Citotoxicidade de diferentes concentrações de cisplatina (MTT).



Legenda: Ensaio do MTT realizado em células PC12 tratadas com diferentes concentrações de cisplatina (1 – 200 μM) após 24 horas de incubação a 37ºC. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

A curva não-linear da viabilidade celular (%) *versus* o log da concentração da cisplatina (µM) está representada na Figura 10. Os valores de absorbância obtidos no ensaio de MTT foram normalizados (0 – 100%) e as concentrações de cisplatina foram transformadas nos logaritmos correspondentes. A concentração inibitória que reduziu a viabilidade celular à 50% (IC_{50}) em relação ao controle não tratado foi calculada através da equação: Y = 100 / (1 +10 ^ (LogIC_{50}-X) x hillslope) e o resultado obtido foi 32,27 µM.

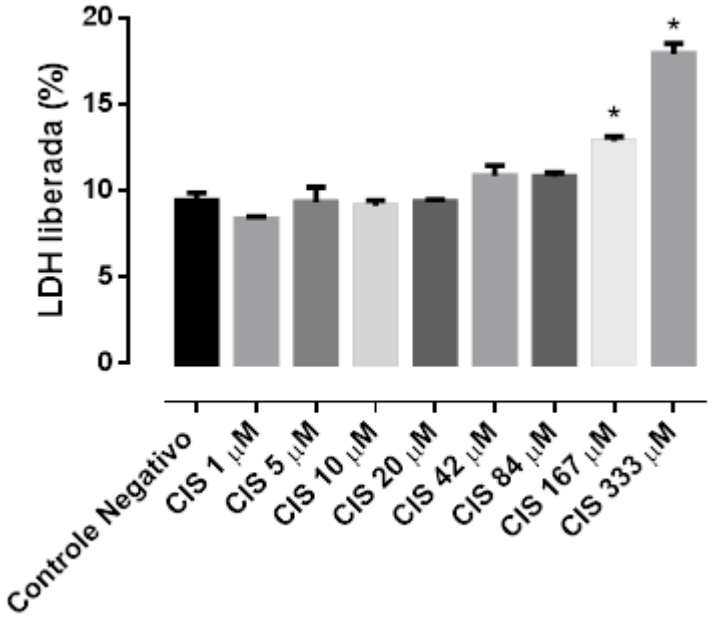
Figura 10. Curva dose-resposta da cisplatina: curva não-linear da viabilidade celular (%) versus log da concentração de cisplatina (µM).



Legenda: As células foram incubadas (24 h, 37ºC) com diferentes concentrações de cisplatina (1 – 200 µM). Equação: [Y = 100 / (1 +10 ^ (LogIC50-X) x hillslope], na qual hillslope é -1,682 e Log IC_{50} é 1,509. IC_{50} = 32,27 µM. O traço é representativo de três experimentos independentes sendo que cada experimento foi realizado em triplicata.

A viabilidade das células PC12 expostas a diferentes concentrações de cisplatina também foi avaliada através do monitoramento da liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH), um indicador da perda da integridade da membrana citoplasmática. Como observado na Figura 11, apenas as duas maiores concentrações de cisplatina (167 e 333 µM) aumentaram significativamente a liberação de LDH quando comparadas ao controle.

Figura 11. Citotoxicidade da cisplatina (LDH).



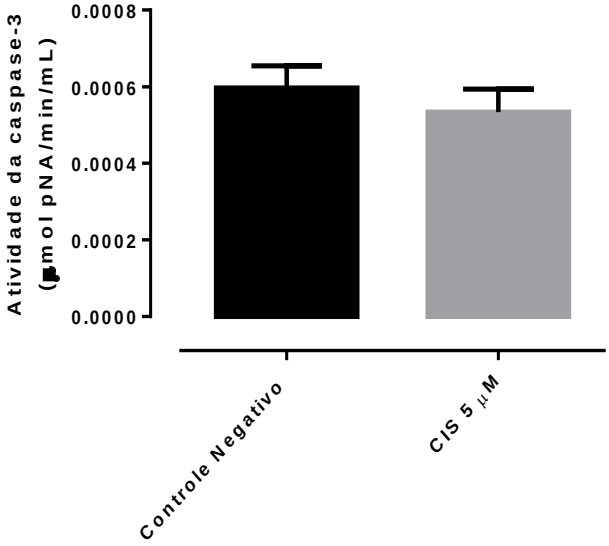
Legenda: Efeito de diferentes concentrações de cisplatina (1 – 333 µM) sobre a viabilidade celular (ensaio de LDH) após 24 horas de incubação a 37ºC. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

A concentração de trabalho da cisplatina foi selecionada com base nos resultados obtidos nos ensaios de diferenciação celular (Figura 8) e de citotoxicidade (Figuras 9, 10 e 11). Foi selecionada a menor concentração que provocou um efeito inibitório significativo sobre a diferenciação celular sem reduzir a viabilidade celular, ou seja, 5 µM. Os ensaios relacionados à diferenciação celular foram todos realizados com cisplatina 5 µM.

4.3 Efeito da cisplatina sobre a atividade da caspase-3

Cisplatina 5 µM (0.000534 ± 0,038) não alterou a atividade da caspase-3 em relação ao controle negativo (0,000596 ± 0,040) (Figura 12).

Figura 12. Efeito da cisplatina 5 µM sobre a atividade da caspase-3.



Legenda: Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cisplatina 5 µM não alterou a atividade da caspase-3 em relação ao controle.

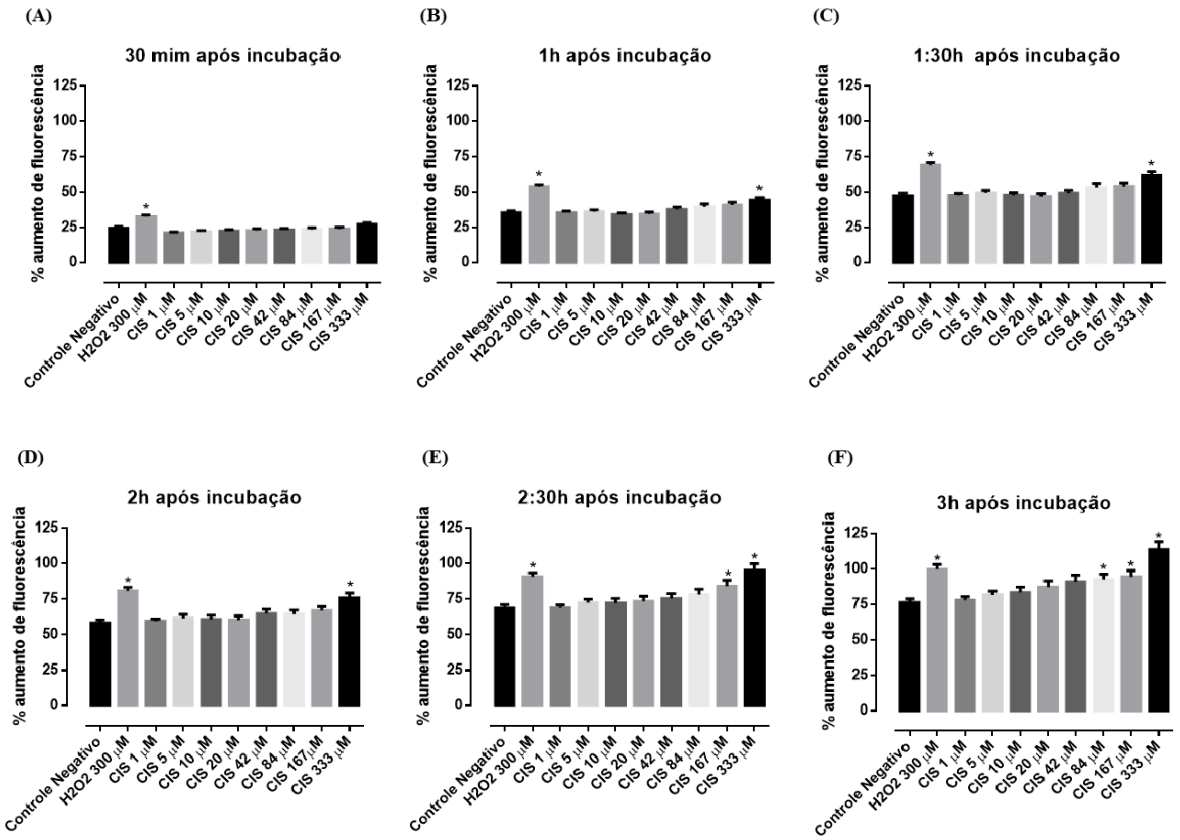
4.4 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Como observado na Figura 13 A-F, cerca de 1 hora após o tratamento das células, a maior concentração de cisplatina (333 µM) induziu um aumento significativo na formação de ERO (44,25 ± 1,83%) em relação às células sem tratamento (35,43 ± 1,36%). Após 2h:30 min de incubação, as duas maiores concentrações (167 e 333 µM) aumentaram a formação de ERO (64,26 ± 4% e 95,36 ± 4,6%, respectivamente) em relação às células sem tratamento (68,76 ± 2,48%); cerca de 3 horas após o tratamento, as três maiores concentrações de cisplatina (84, 167 e 333 µM) aumentaram a formação de ERO (92,72 ± 3,8%; 94,61 ± 4,33% e 113,9 ± 5,47%, respectivamente) em relação ao controle negativo (76,42 ± 2,53%). As demais

concentrações testadas (1, 5, 10, 20 e 42 µM) não induziram a formação de ERO no período analisado.

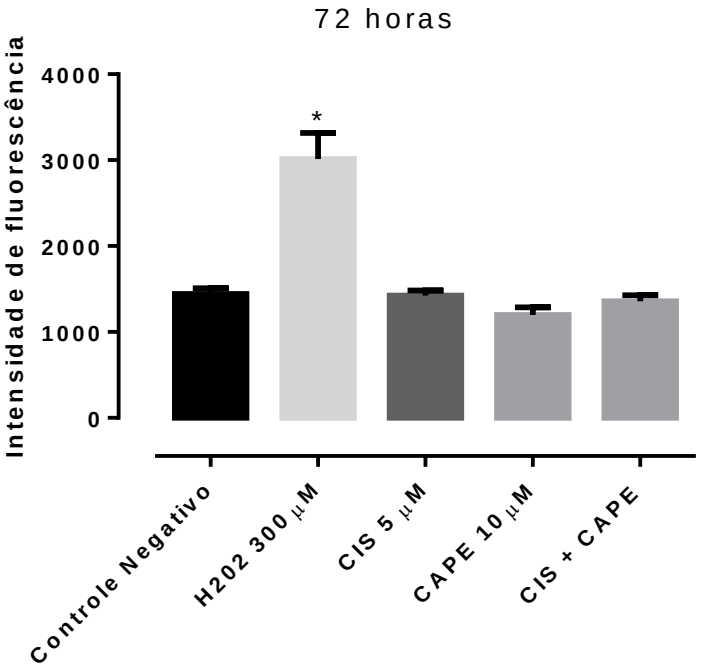
Na exposição por 72h, a cisplatina (5 µM) não alterou a formação de ERO (1424 ± 58,5) em relação ao controle negativo (1441 ± 69,8); também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CAPE 10 µM e controle ou CIS 5 µM + CAPE 10 µM e controle. No grupo tratado com H_2O_2 (controle positivo) houve aumento significativo da geração de ERO (3013 ± 301,7) em relação ao controle negativo (Figura 14).

Figura 13. Efeito da cisplatina sobre a formação de ERO.



Legenda: Efeito de diferentes concentrações de cisplatina (1 – 333 µM) sobre a formação de ERO após 3 horas de incubação a 37ºC. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

Figura 14. Efeito da cisplatina (5 µM) e/ou CAPE (10 µM) sobre a formação de ERO após 72 horas de incubação a 37ºC



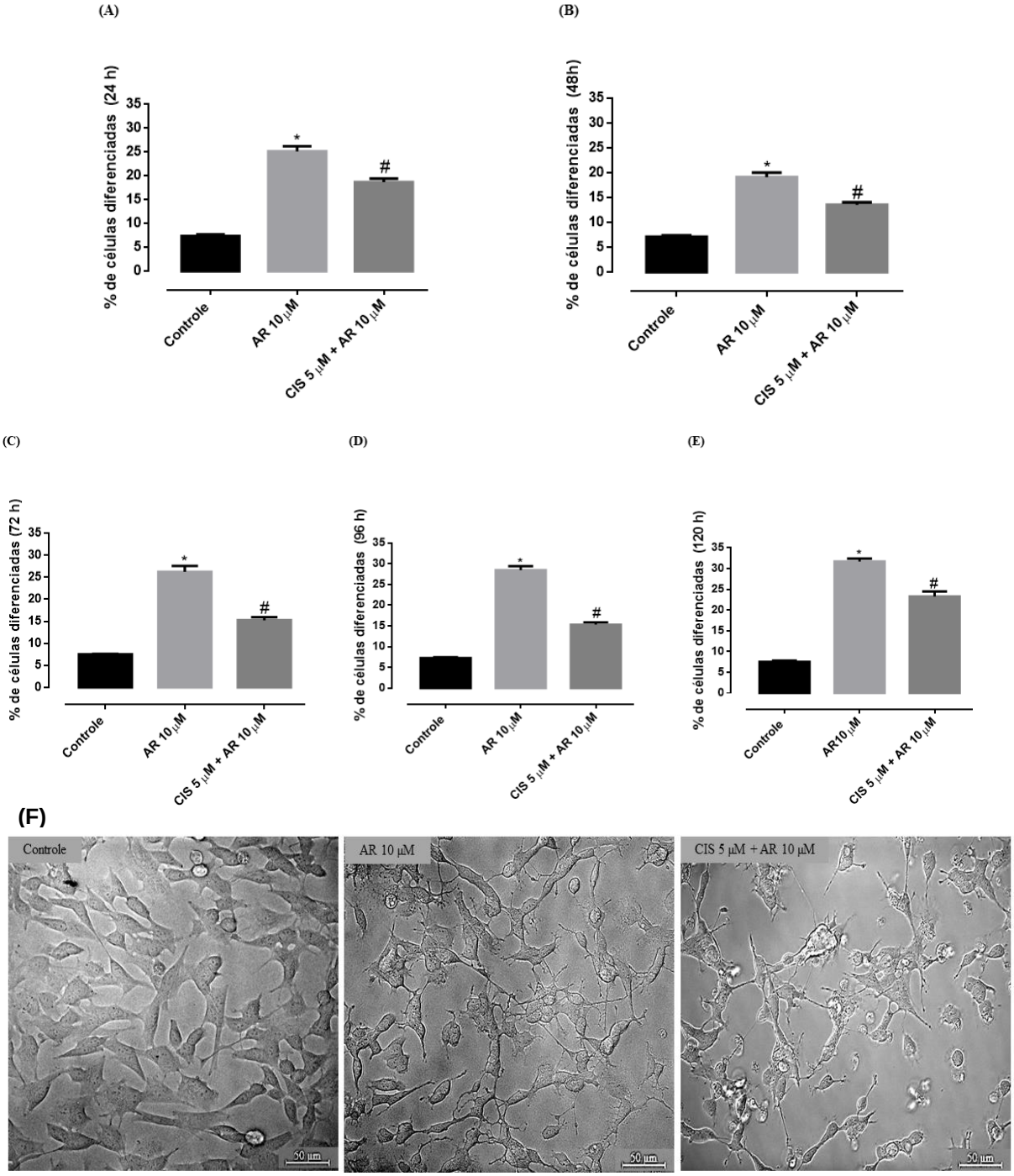
Legenda: Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

4.5 Efeito da CIS (5 µM) sobre a diferenciação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

O efeito da CIS 5 µM sobre a diferenciação em células SH-SY5Y foi avaliado em duas condições experimentais diferentes, sendo que na primeira, as células receberam tratamento simultâneo de cisplatina e ácido retinóico (AR), enquanto que na segunda, foi realizado um pré-tratamento de 24 h com cisplatina e remoção antes da adição de ácido retinóico. As células SH-SY5Y de neuroblastoma humano são amplamente empregadas como modelo *in vitro* para estudos de neurotoxicidade e diferenciam-se quando expostas ao ácido retinóico, adquirindo fenótipo neuronal. Como esperado, o ácido retinóico aumentou a porcentagem de células diferenciadas em relação ao controle durante todo o período de incubação (120 horas). A Figura 15 (A-E) mostra a redução na porcentagem de diferenciação das células SH-SY5Y quando incubadas simultaneamente com CIS 5 µM e AR 10 µM nos tempos de incubação de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A Figura 15 F mostra o aumento do número de neuritos e as mudanças morfológicas nas células tratadas com ácido retinóico após 120 horas de incubação, assim como a inibição parcial destes efeitos nas células simultaneamente tratadas com CIS 5 µM e AR 10 µM.

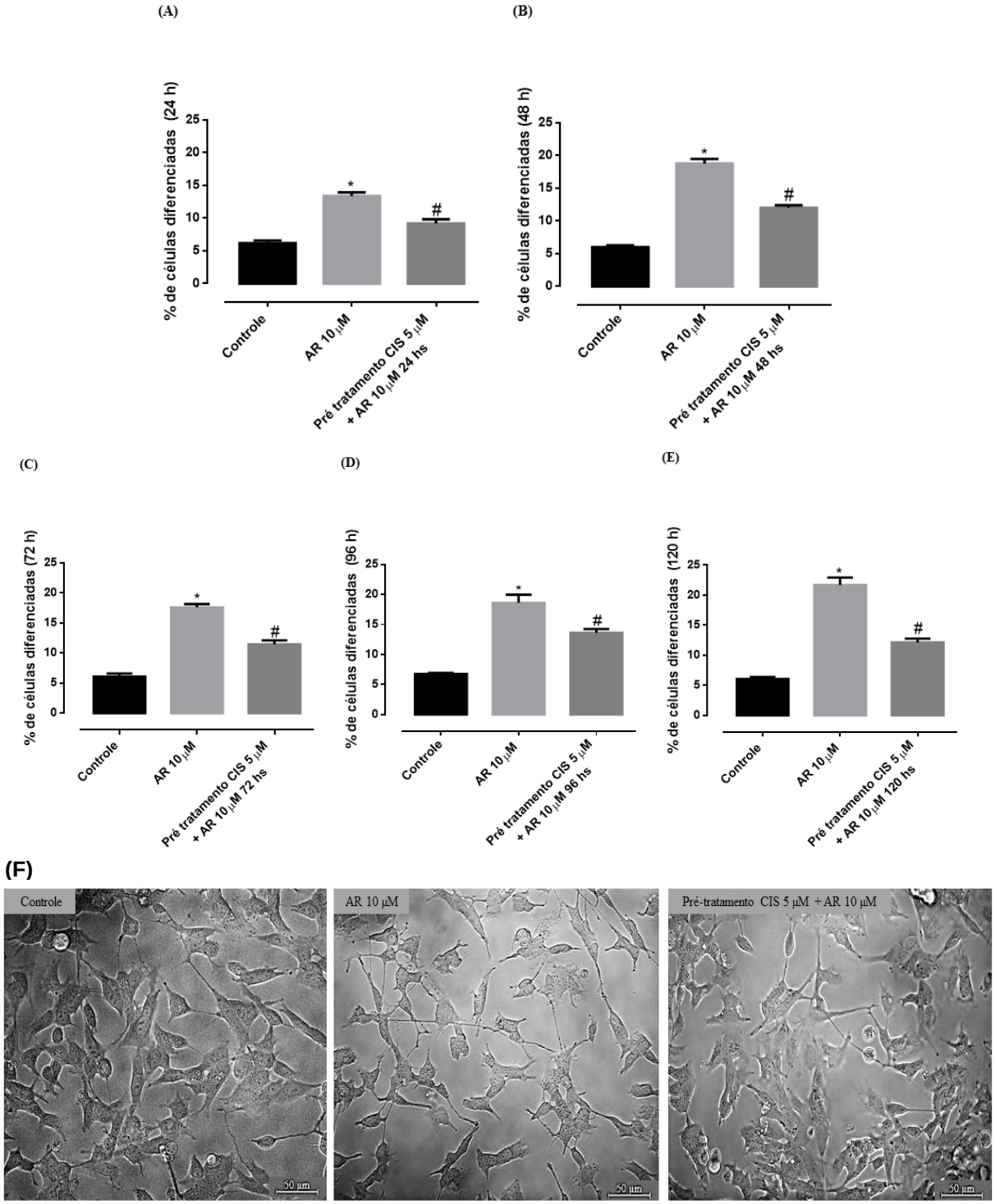
Na segunda condição experimental (Figura 16 A-E), o pré-tratamento com CIS 5 µM (incubação por 24h e remoção) reduziu a porcentagem de diferenciação em células expostas ao ácido retinóico nos tempos de incubação de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A Figura 16 F mostra o aumento do número de neuritos e as mudanças morfológicas induzidas pelo ácido retinóico, e a inibição parcial destes efeitos nas células expostas à CIS 5 µM por 24h antes da adição de ácido retinóico.

Figura 15. Efeito da adição simultânea de cisplatina 5µM e ácido retinóico 10 µM sobre a diferenciação de células SH-SY5Y.



Legenda: **(A)** Gráficos de barras mostrando a porcentagem de células diferenciadas após 24 h, **(B)** 48 h, **(C)** 72 h, **(D)** 96 h, **(E)** 120 h de incubação com o AR 10 µM associado ou não à CIS 5 µM. **(F)** Imagens digitalizadas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as mudanças morfológicas em células SH-SY5Y após 120 h de incubação. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao grupo AR 10 µM.

Figura 16. Efeito do pré-tratamento (24h) com cisplatina 5 µM sobre a diferenciação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas ao ácido retinóico.



Legenda: **A)** Gráficos de barras mostrando a porcentagem de células diferenciadas após 24 h, **(B)** 48 h, **(C)** 72 h, **(D)** 96 h, **(E)** 120 h de incubação com o ácido retinóico 10 µM em células previamente expostas à CIS 5 µM por 24h. **(F)** Imagens digitalizadas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as mudanças morfológicas em células SH-SY5Y após 120 h de incubação. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao grupo AR 10 µM.

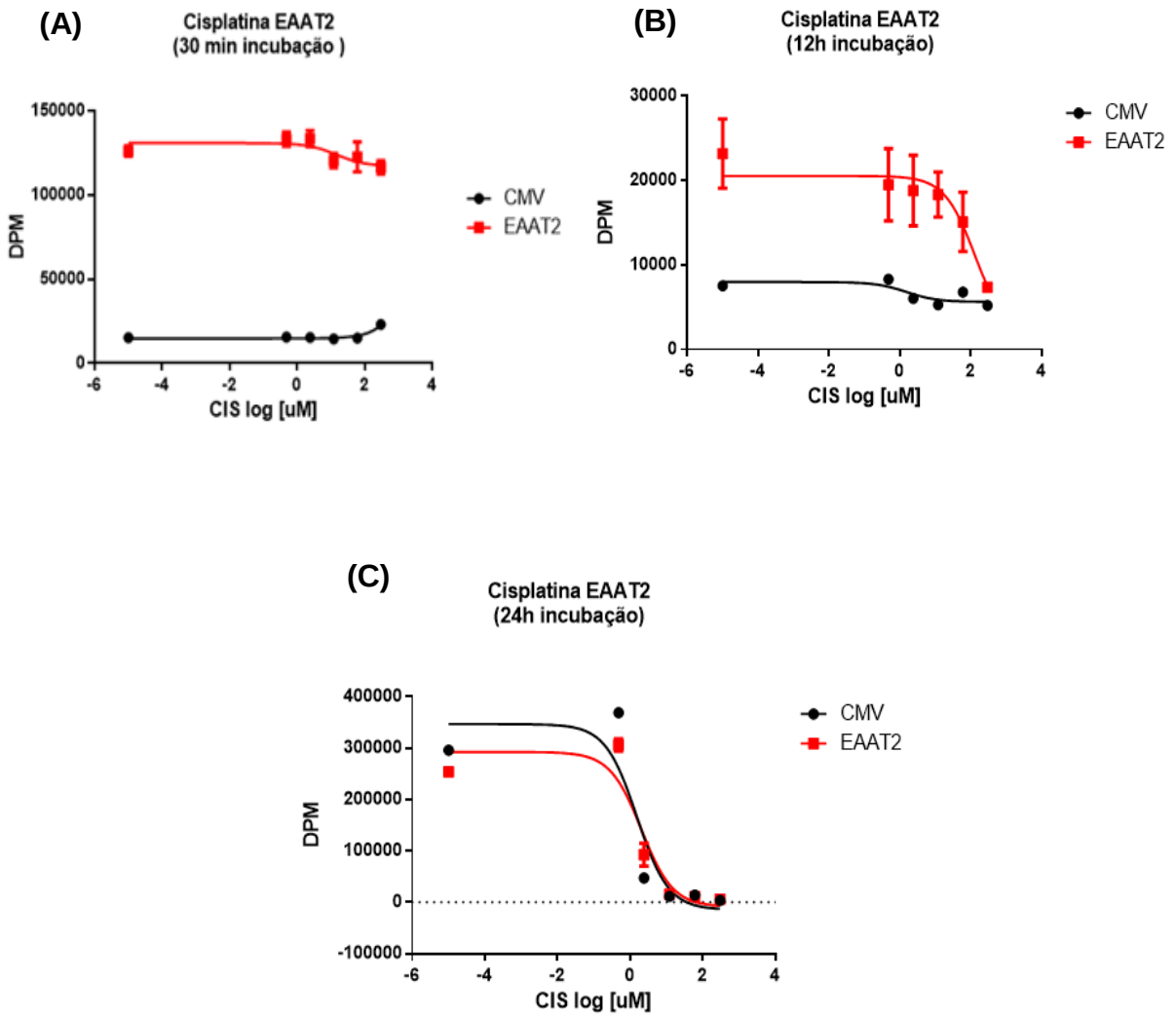
4.6 Efeitos da cisplatina sobre a captação de glutamato

4.6.1 Efeito da cisplatina sobre a captação de glutamato em células (COS-7) com transfecção transiente

Os resultados (Figura 17) sugerem que longos períodos de incubação (12 e 24 horas) da cisplatina interferiram na tradução e na expressão dos transportadores. Na transfecção do tipo transiente, a expressão máxima do DNA transfectado geralmente ocorre por volta de 48 horas após a transfecção. A presença da cisplatina nesse processo resultou em modulação no background (que foi obtido com a transfecção das células COS-7 com o vetor vazio de citomegalovírus humano CMV). O background mostrou-se bem variável, o que não aconteceu nos ensaios de curta incubação (30 min), e na própria expressão dos transportadores.

Sendo assim, verificou-se que a transfecção transiente não é a melhor escolha quando se é necessário avaliar o efeito da longa incubação da cisplatina sobre a captação do glutamato. Por isso, o efeito da cisplatina foi avaliado em células com transfecção estável (HEK) de EAAT2, e em células que expressam os transportadores endógenos (astrócitos), ambos descritos a seguir.

Figura 17. Efeito da cisplatina sobre a captação de glutamato

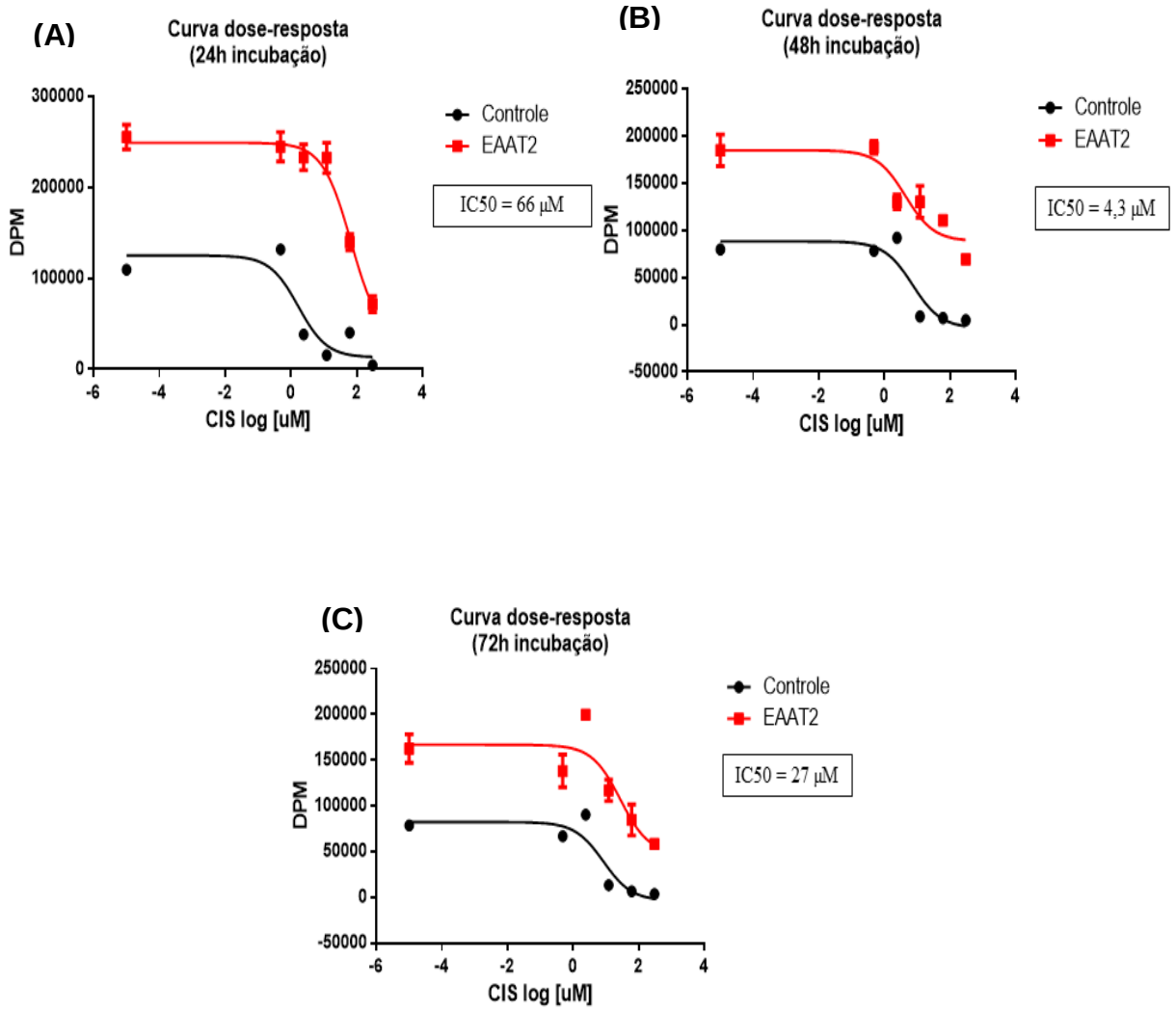


Legenda: As células COS-7 transfectadas com EAAT2 foram expostas a diferentes concentrações de cisplatina (0,48; 2,4; 12; 60 e 300 µM) por **(A)** 30 min, **(B)** 12 horas **(C)** 24 horas e depois submetidas ao ensaio de captação de glutamato. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas

4.6.2 Efeito da cisplatina sobre a captação de glutamato em células HEK

O background (controle) variou na presença de diferentes concentrações de cisplatina. Observa-se também que houve inibição da captação de glutamato via EAAT2, com IC_{50} variando conforme o tempo de incubação. Para a cisplatina, os valores de IC_{50} encontrados foram: 66 µM; 4,3 µM e 27 µM após 24, 48 e 72 horas de incubação, respectivamente. Tais resultados sugerem que 48 horas parece ser o tempo de maior potência da cisplatina para inibição da captação e, em 72 horas, as células estejam dessensibilizadas pela presença da droga ou que algum processo não específico possa estar ocorrendo. Sendo assim, acredita-se que a cisplatina iniba a captação do glutamato de uma maneira não-específica, onde mais de um processo possa estar sendo modulado (Figura 18).

Figura 18. Curva dose-resposta da cisplatina em células HEK.



Legenda: As células HEK foram expostas a diferentes concentrações de cisplatina (0,48; 2,4; 12; 60 e 300 µM) por 24, 48 e 72 horas e depois submetidas ao ensaio de captação de glutamato. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

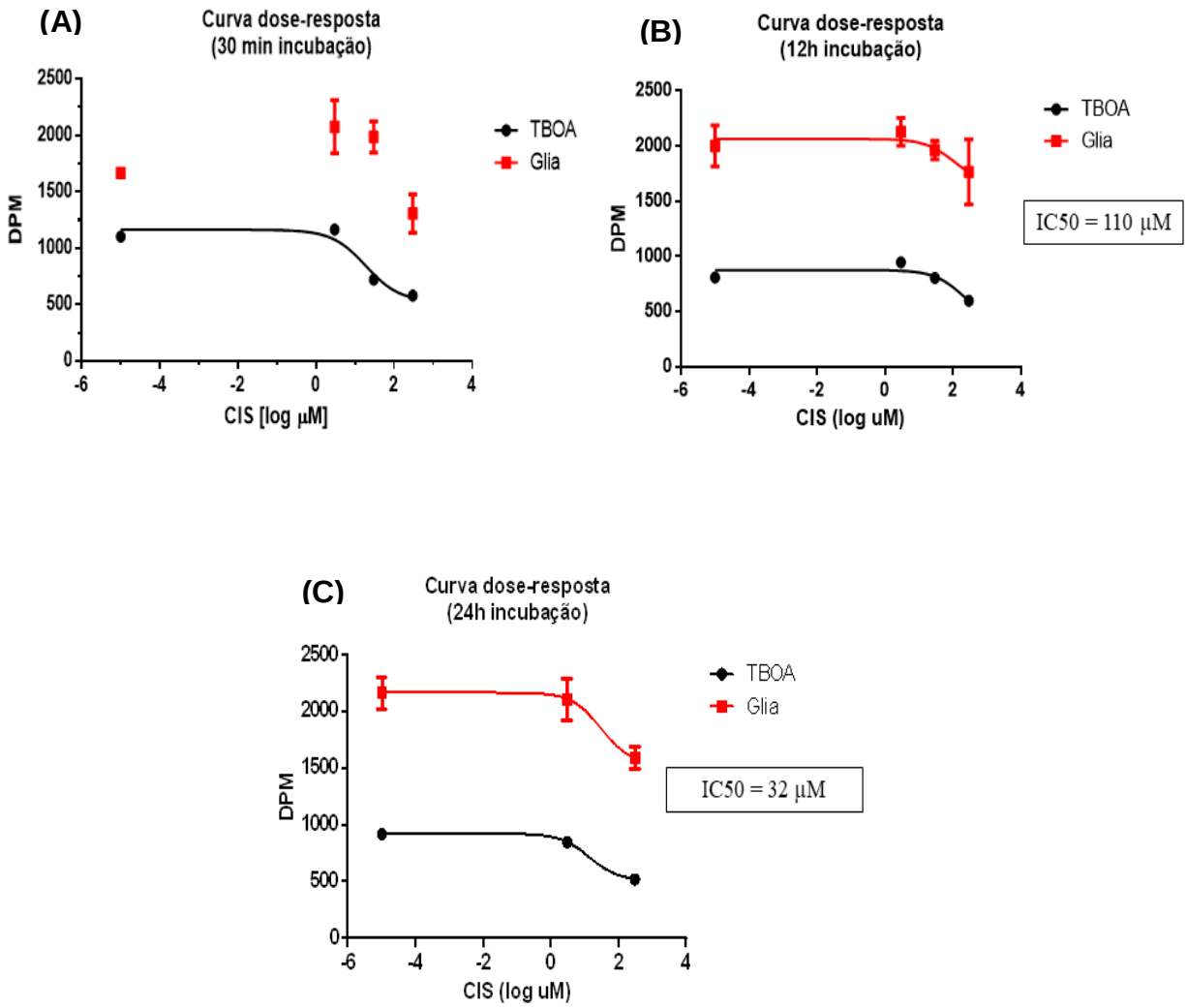
4.6.3 Efeito da cisplatina sobre a captação de glutamato em astrócitos (ou glia)

O efeito da cisplatina sobre a captação de glutamato nos astrócitos foram avaliados sob duas maneiras: o background foi obtido com a presença de inibidor do transportador de glutamato (TBOA). A cisplatina foi incubada sob duas maneiras: (A) na presença do TBOA; (B) na presença do veículo.

No estudo A, as células do background foram incubadas na presença da cisplatina para avaliar os possíveis efeitos não-específicos da cisplatina no background, como por exemplo, a inativação do TBOA pela cisplatina, durante 30 min, 12 e 24 horas (Figura 19). Já no estudo B, as células do background foram incubadas apenas na presença do veículo, por 48 e 72 horas de incubação, para analisar os efeitos específicos na captação mediada por transportadores (Figura 20).

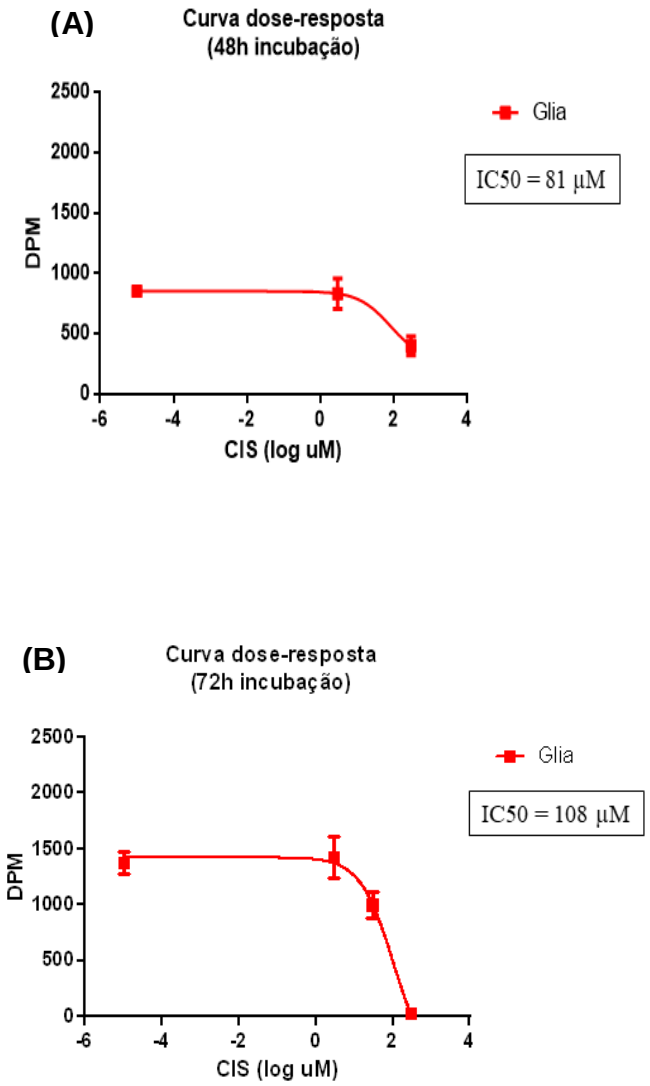
Os valores de IC_{50} foram calculados independentemente do background, uma vez que foi observado variação no background. Os valores de IC_{50} encontrados para a cisplatina foram: 110 µM (12h incubação); 32 µM (24h incubação); 81 µM (48h incubação); 108 µM (72h incubação). Novamente, sugere-se que a ação da cisplatina é de inibição da captação do glutamato por ação não-específica nos transportadores, o que foi observado nos experimentos do estudo A, onde o background variou conforme a concentração da droga.

Figura 19. Curva dose-resposta da cisplatina em astrócitos (Ensaio A).



Legenda: Os astrócitos foram expostos à cisplatina nas concentrações de 3, 30 e 300 µM, durante **(A)** 30 minutos, **(B)** 12, (**C)** 24 horas e depois submetidos ao ensaio de captação de glutamato. As células do background foram incubadas na presença da cisplatina, para avaliar se a cisplatina possui efeito não-específico sob o background. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

Figura 20. Curva dose-resposta da cisplatina em astrócitos (Ensaio B).



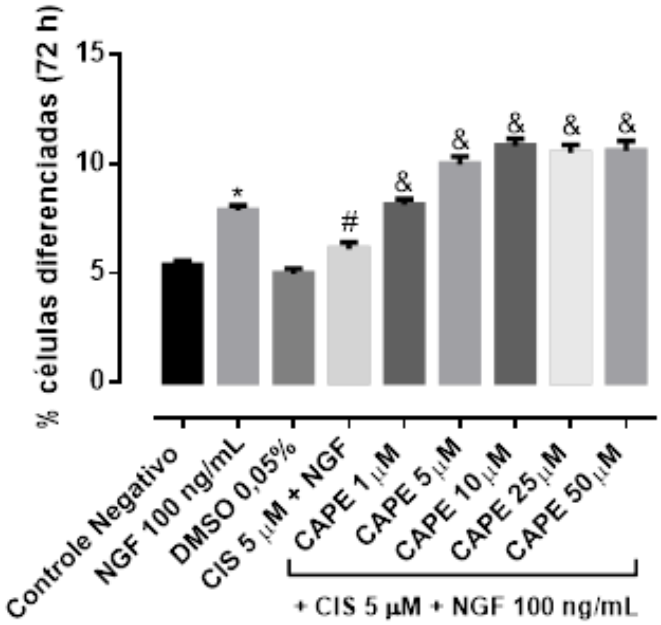
Legenda: Os astrócitos foram expostos à cisplatina nas concentrações de 3, 30 e 300 µM, **(A)** 48 e **(B)** 72 horas e depois submetidos ao ensaio de captação de glutamato. As células do background foram incubadas apenas na presença do veículo, para analisar os efeitos específicos na captação mediada por transportadores. TBOA foi incluído nesse ensaio para obter o background, o qual foi subtraído na análise final. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

4.7 Determinação da concentração de trabalho do CAPE – Diferenciação de células PC12

Cinco diferentes concentrações de CAPE (1, 5, 10, 25 e 50 µM) foram avaliadas em relação ao potencial de minimizar a inibição da diferenciação celular induzida pela CIS (5 µM), que, de acordo com os resultados apresentados anteriormente, foi a menor concentração de cisplatina que inibiu a diferenciação celular sem causar morte celular.

Todas as concentrações de CAPE apresentaram efeito protetor contra a inibição da diferenciação celular induzida pela CIS (5 µM), no entanto, a menor concentração de CAPE com maior efeito protetor foi 10 µM. Acima dessa concentração, não houve aumento na diferenciação celular. A porcentagem de diferenciação celular foi estatisticamente maior nas células tratadas com CAPE 10 µM + CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (10,85 ± 0,31%) em relação às células expostas apenas a CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (6,12 ± 0,29%). Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o veículo (DMSO 0,05%) e o controle de células não tratadas. Os resultados são apresentados na Figura 21.

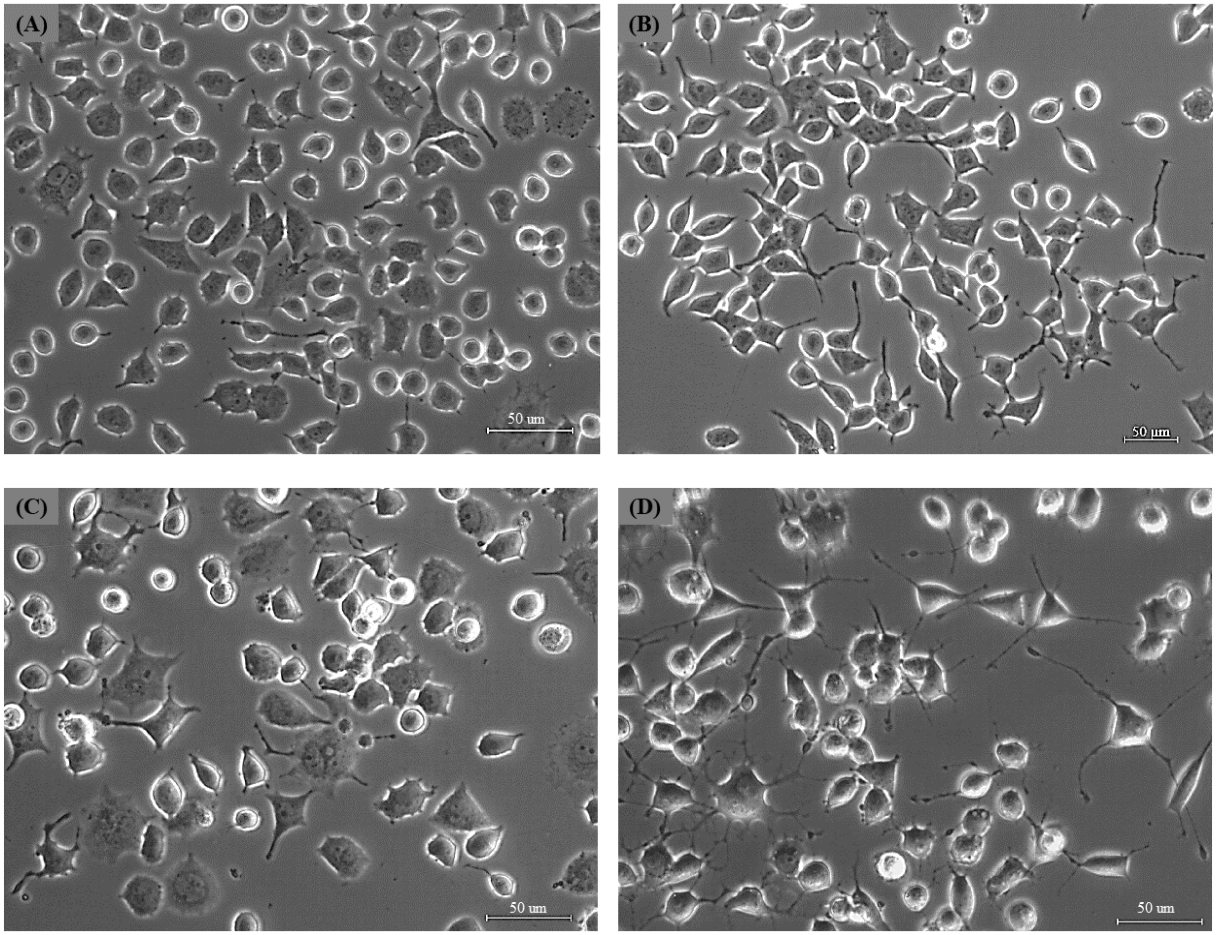
Figura 21. Efeito de diferentes concentrações do CAPE (1- 50 µM) contra a inibição da diferenciação celular induzida pela CIS (5 µM).



Legenda: O número de células diferenciadas foi analisado após 72 horas de exposição. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao grupo NGF 100 ng/mL; & Significativo em relação ao grupo CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL.

A Figura 22 mostra as mudanças morfológicas das células PC12 expostas aos diferentes tratamentos. As células sem tratamento (A) possuem, em sua maioria, corpo celular esférico e apresentam apenas alguns prolongamentos curtos, enquanto as células tratadas com NGF 100 ng/mL (B) apresentam corpo celular mais alongado com grande número de extensões neuríticas mais longas. As células expostas à CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (C), são, em sua maioria, esféricas e apresentam alguns neuritos curtos quando comparadas às células expostas ao NGF. A adição de CAPE 10 µM (D) minimizou o efeito inibitório da cisplatina sobre a diferenciação celular, sendo tal efeito evidenciado pelo aumento do número de células com neuritos longos em relação às células expostas apenas à CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL.

Figura 22. Imagens digitalizadas obtidas por microscopia de contraste de fase (400x) mostrando as mudanças morfológicas em células PC12 após 72h de incubação.



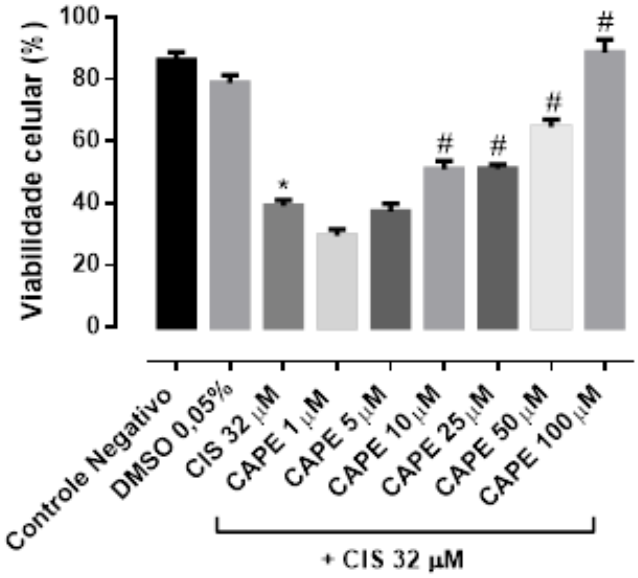
Legenda: Adições: **(A)** Células PC12 sem tratamento (controle negativo); **(B)** NGF 100 ng/mL; **(C)** CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL; **(D)** CAPE 10 µM + CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL

4.8 Proteção do CAPE contra a morte celular induzida pela IC_{50} da cisplatina

O efeito protetor do CAPE contra a morte celular induzida pela cisplatina foi avaliado na presença de CIS 32 µM (IC_{50} da cisplatina), uma vez que a concentração de trabalho da cisplatina (5 µM) não induz morte celular.

Como observado na Figura 23, a viabilidade das células incubadas com CIS 32 µM foi aproximadamente 50% menor (39,11 ± 1,94%) que a do controle negativo (86,39 ± 2,5%). Concentrações de CAPE de 10 a 100 µM (10 µM, 50,97 ± 2,81%; 25 µM, 51,24 ± 1,32%; 50 µM, 64,75 ± 2,19%; 100 µM, 88,78 ± 4,17%) protegeram contra a citotoxicidade induzida pela CIS 32 µM (39,11 ± 1,94%) de maneira concentração-dependente.

Figura 23. Efeito de diferentes concentrações de CAPE sobre a viabilidade das células PC12 expostas à CIS 32 µM (IC_{50}).



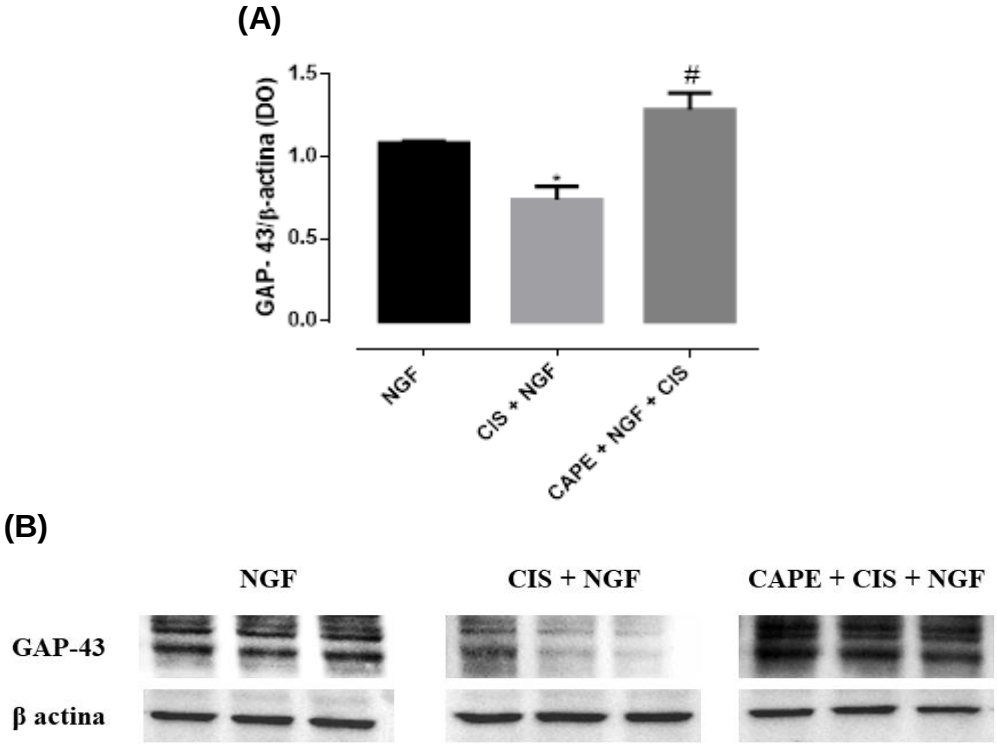
Legenda: Ensaio do MTT realizado em células tratadas com diferentes concentrações de CAPE (1 – 100 µM) + CIS 32 µM, após 24 horas de exposição. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao grupo CIS 32 µM.

Portanto, foi selecionada a concentração de 10 µM de CAPE, pois essa foi a menor concentração de CAPE que apresentou efeito protetor contra a inibição da diferenciação celular induzida pela CIS 5 µM (Figuras 21 e 22) e contra a diminuição da viabilidade celular induzida pela IC_{50} (32 µM) da cisplatina (Figura 23). Assim, os ensaios de neuroproteção foram realizados com CAPE 10 µM.

4.9 Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a expressão do GAP-43, sinapsina I e sinaptofisina

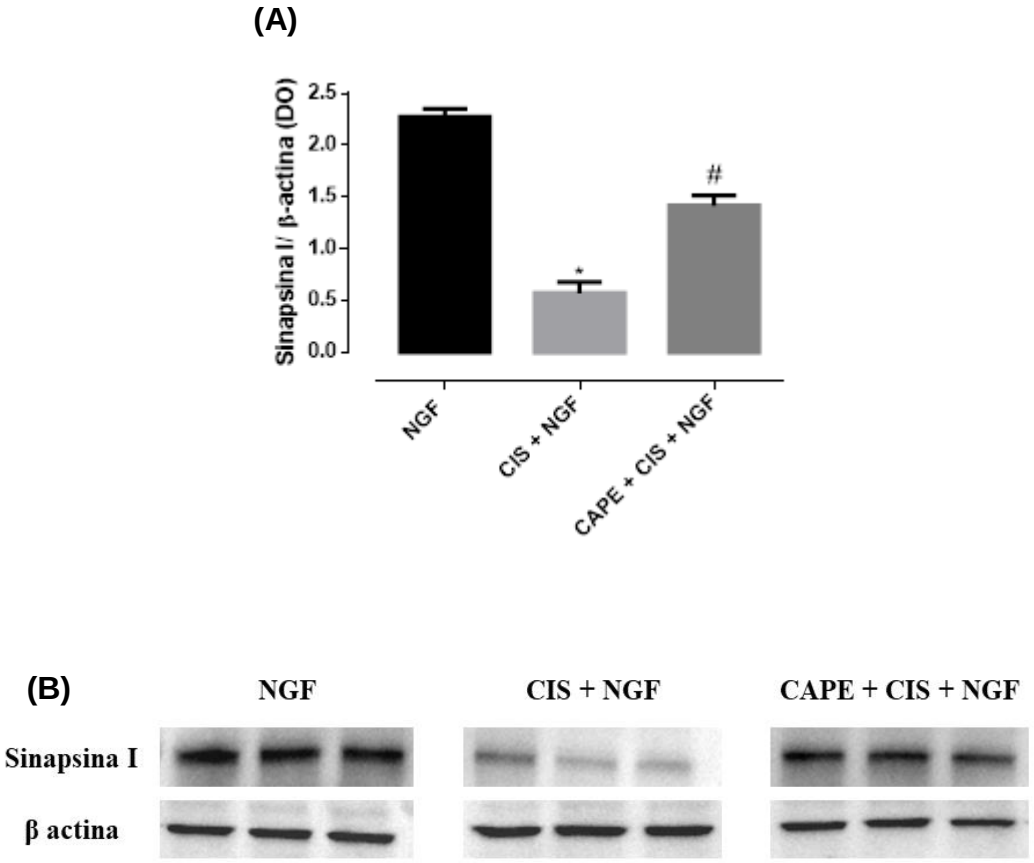
CIS 5 µM reduziu a expressão do GAP- 43 (0,73 ± 0,08), da sinapsina I (0,57 ± 0,10) e da sinaptofisina (0,82 ± 0,02) em relação ao controle (NGF 100 ng/mL; 1,08 ± 0,01; 2,27 ± 0,07; 1,72 ± 0,05, respectivamente). No entanto, a adição de CAPE 10 µM atenuou a regulação negativa das proteínas neuronais induzidas pela CIS 5 µM. A expressão do GAP – 43 (1,28 ± 0,10), da sinapsina I (1,42 ± 0,09) e da sinaptofisina (1,58 ± 0,10) foi estatisticamente maior nas células tratadas com CAPE 10 µM + CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL em comparação às células expostas somente à CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (0,54 ± 0,01; 0,94 ± 0,05; 0,71 ± 0,06, respectivamente). Os resultados são apresentados nas Figuras 24, 25 e 26.

Figura 24. Efeito da cisplatina e do CAPE na expressão do GAP – 43 em células PC12.



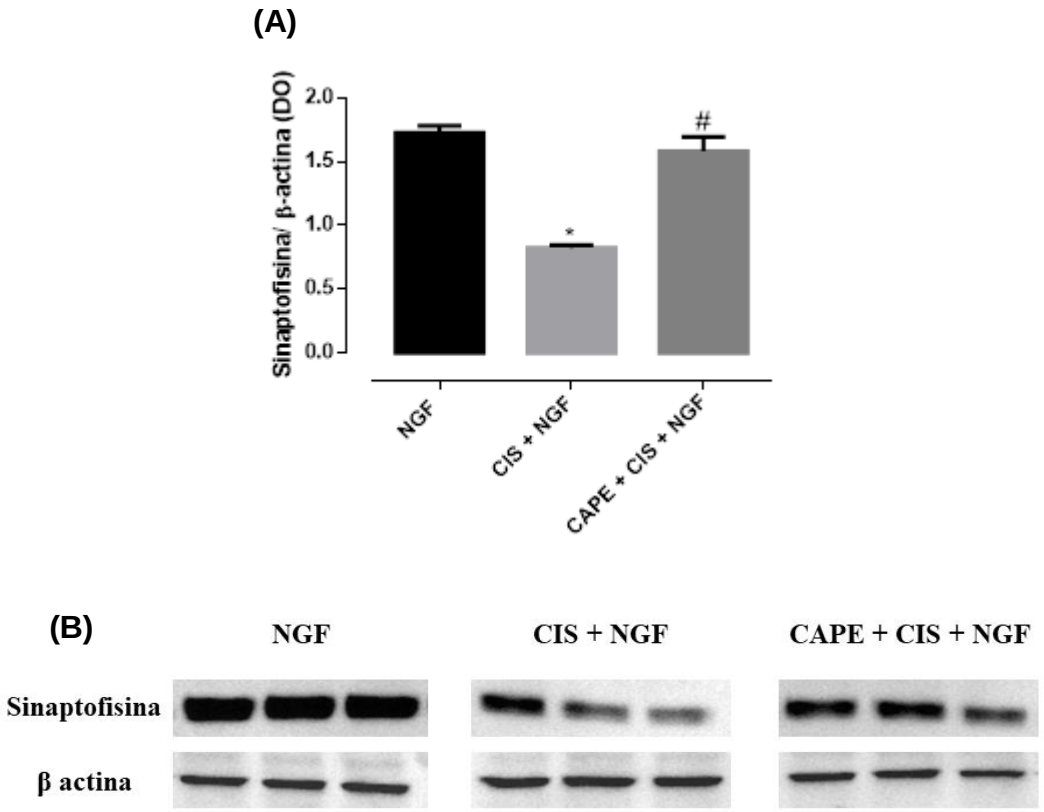
Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) do GAP – 43 normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas do GAP – 43 e da β actina. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$); # Significativo em relação à CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL.

Figura 25. Efeito da cisplatina e do CAPE na expressão da sinapsina I em células PC12.



Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) da sinapsina I normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas da sinapsina I e da β actina. Dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$); # Significativo em relação à CIS 5 μM + NGF 100 ng/mL.

Figura 26. Efeito da cisplatina e do CAPE na expressão da sinaptofisina em células PC12.

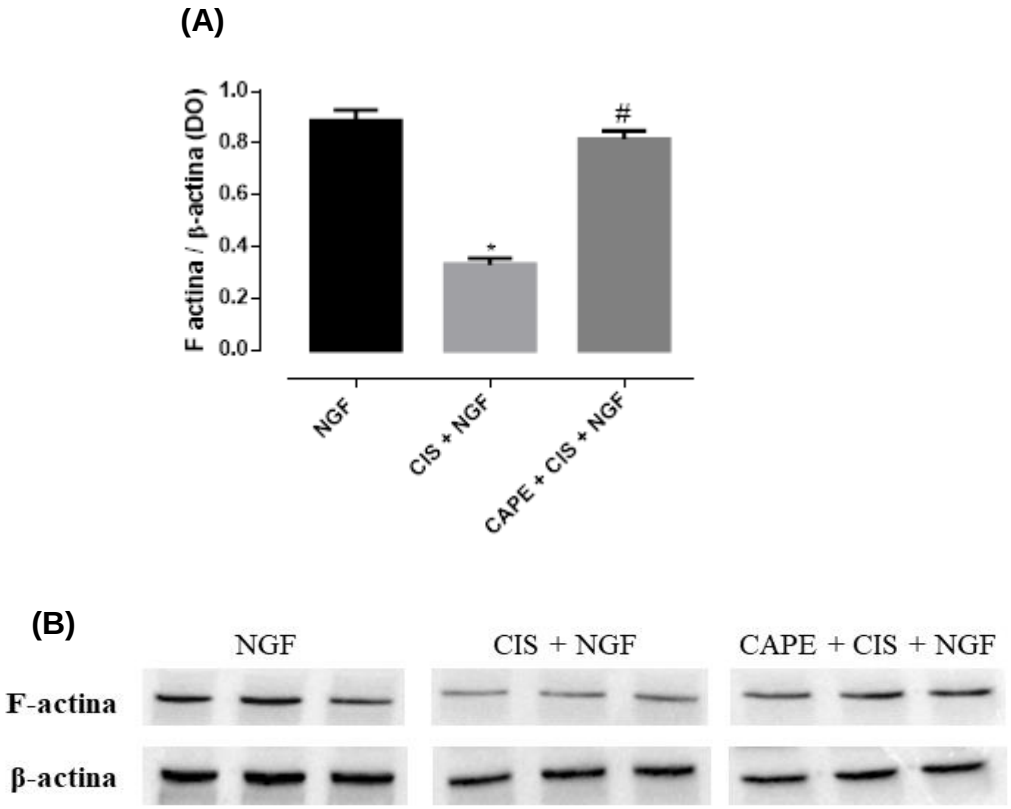


Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) da sinaptofisina normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas da sinaptofisina e da β actina. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$); # Significativo em relação à CIS 5 μM + NGF 100 ng/mL.

4.10 Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a expressão da F-actina e β-III tubulina

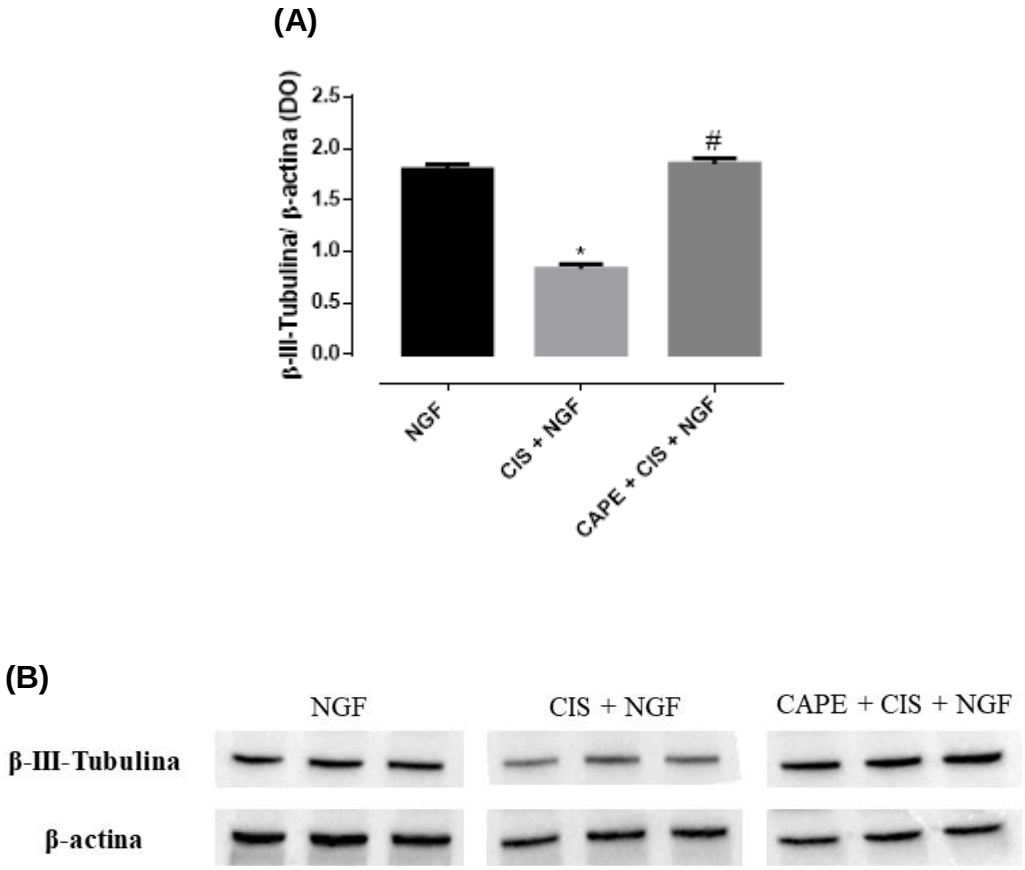
CIS 5 µM reduziu a expressão da F-actina (0,33 ± 0,02) e da β-III-Tubulina (0,83 ± 0,04) em relação ao controle (NGF 100 ng/mL; 0,88 ± 0,04; 1,80 ± 0,04, respectivamente). O CAPE 10 µM protegeu contra a regulação negativa induzida pela cisplatina, aumentando a expressão das proteínas F-actina (0,81 ± 0,03) e β-III-Tubulina (1,85 ± 0,05) em relação às células tratadas apenas com CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (F-actina; 0,33 ± 0,02; β-III-Tubulina; 0,83 ± 0,04). Os resultados são apresentados nas Figuras 27 e 28.

Figura 27. Expressão da F-actina nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE.



Legenda: (A) Gráfico representativo da densidade ótica (DO) da F-actina normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas da F-actina e da β actina. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. *Significativo em relação ao NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$); # Significativo em relação à CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL

Figura 28. Expressão da β-III-Tubulina nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE**.**

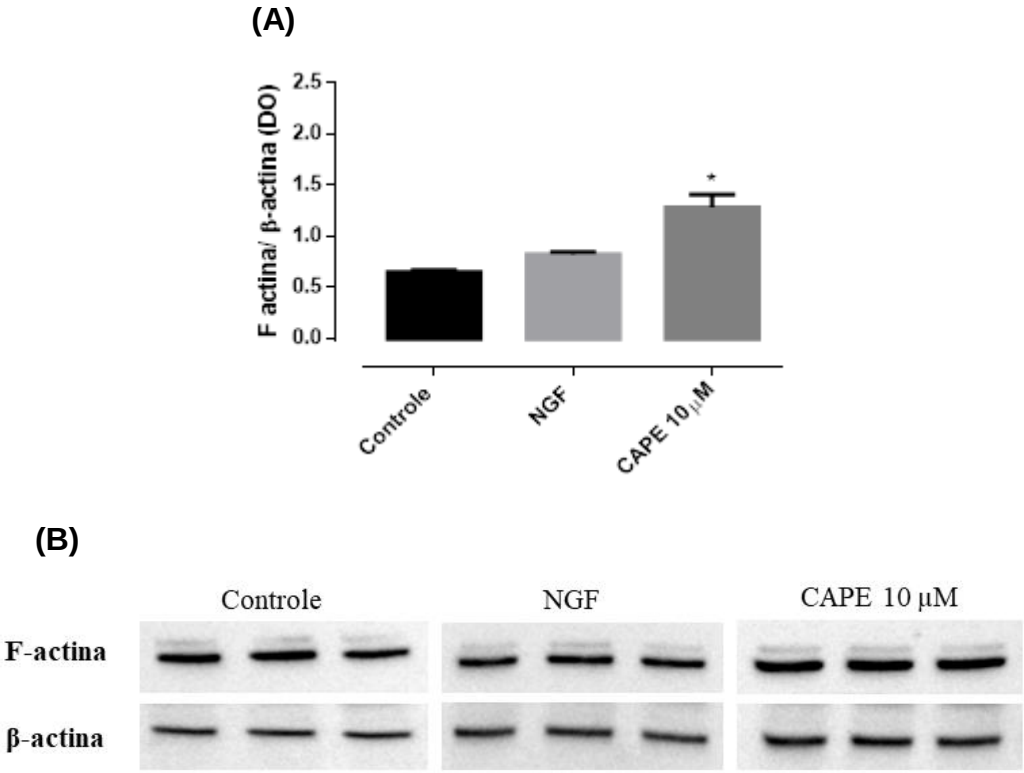


Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) da β-III-Tubulina normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas da β-III-Tubulina e da β actina. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$); # Significativo em relação à CIS 5 μM + NGF 100 ng/mL.

4.11 Efeito intrínseco do CAPE na expressão das proteínas do citoesqueleto

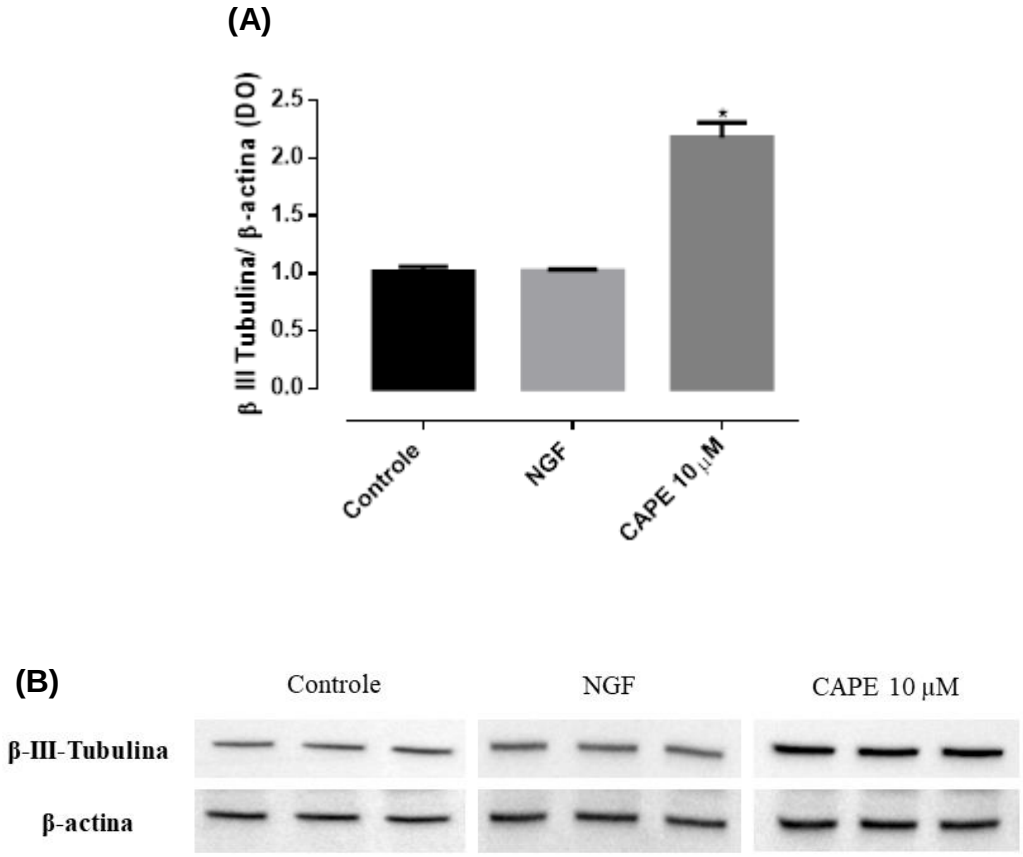
A expressão da F-actina aumentou significativamente nas células tratadas com CAPE 10 µM (1,29 ± 0,13) em relação às células sem tratamento (0,65 ± 0,01). Também houve aumento significativo na expressão da β-III-tubulina, nas células tratadas com CAPE 10 µM (2,17 ± 0,12) em relação às células sem tratamento (1,03 ± 0,04). Não houve diferença significativa entre os grupos NGF e controle para essas duas proteínas. Os resultados são apresentados nas Figuras 29 e 30.

Figura 29. Efeito intrínseco do CAPE na expressão da F-actina em células PC12.



Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) da F-actina normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas da F-actina e da β actina. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

Figura 30. Efeito intrínseco do CAPE na expressão da β-III-Tubulina em células PC12.



Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) da β-III-Tubulina normalizado pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas da β-III-Tubulina e da β actina. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média, obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

4.12 CAPE minimizou o efeito inibitório da CIS sobre o neurofilamento (NF-200)

A intensidade da fluorescência tanto no grupo NGF 100 ng/mL (4,6 x 10^6 ± 205.158) quanto no grupo CAPE 10 µM (6,111 x 10^6 ± 224.538) foi significativamente maior do que no controle (3,019 x 10^6 ± 155.992). Não houve diferença significativa entre os grupos CAPE 10 µM + NGF 100 ng/mL (6,125 x 10^6 ± 164.304) e CAPE 10 µM (6,111 x 10^6 ± 224.538). No grupo CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (3,563 x 10^6 ± 194.698), a intensidade de fluorescência foi significativamente menor do que no grupo NGF 100 ng/mL. No grupo CAPE 10 µM + CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (4,429 x 10^6 ± 155.066) foi observado aumento da intensidade da fluorescência em relação ao grupo CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (Figura 31 A e B).

Figura 31. Efeito da cisplatina e do CAPE sobre o neurofilamento-200 em células PC12.

(A)

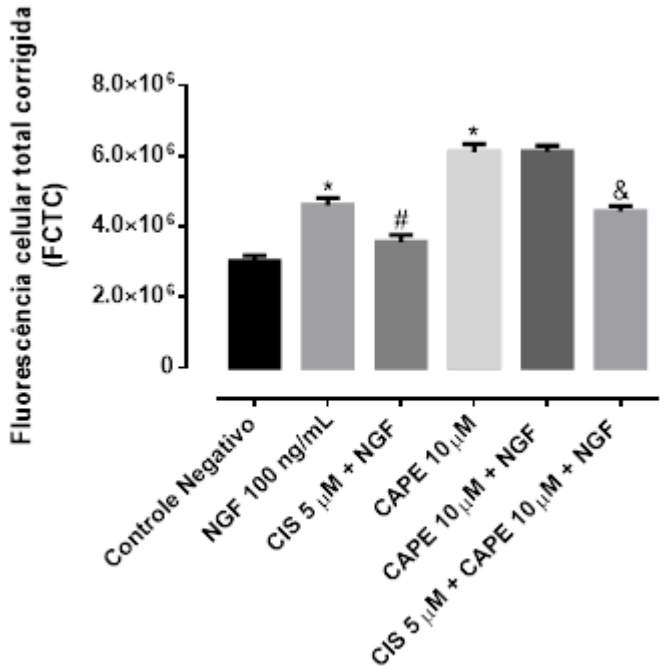
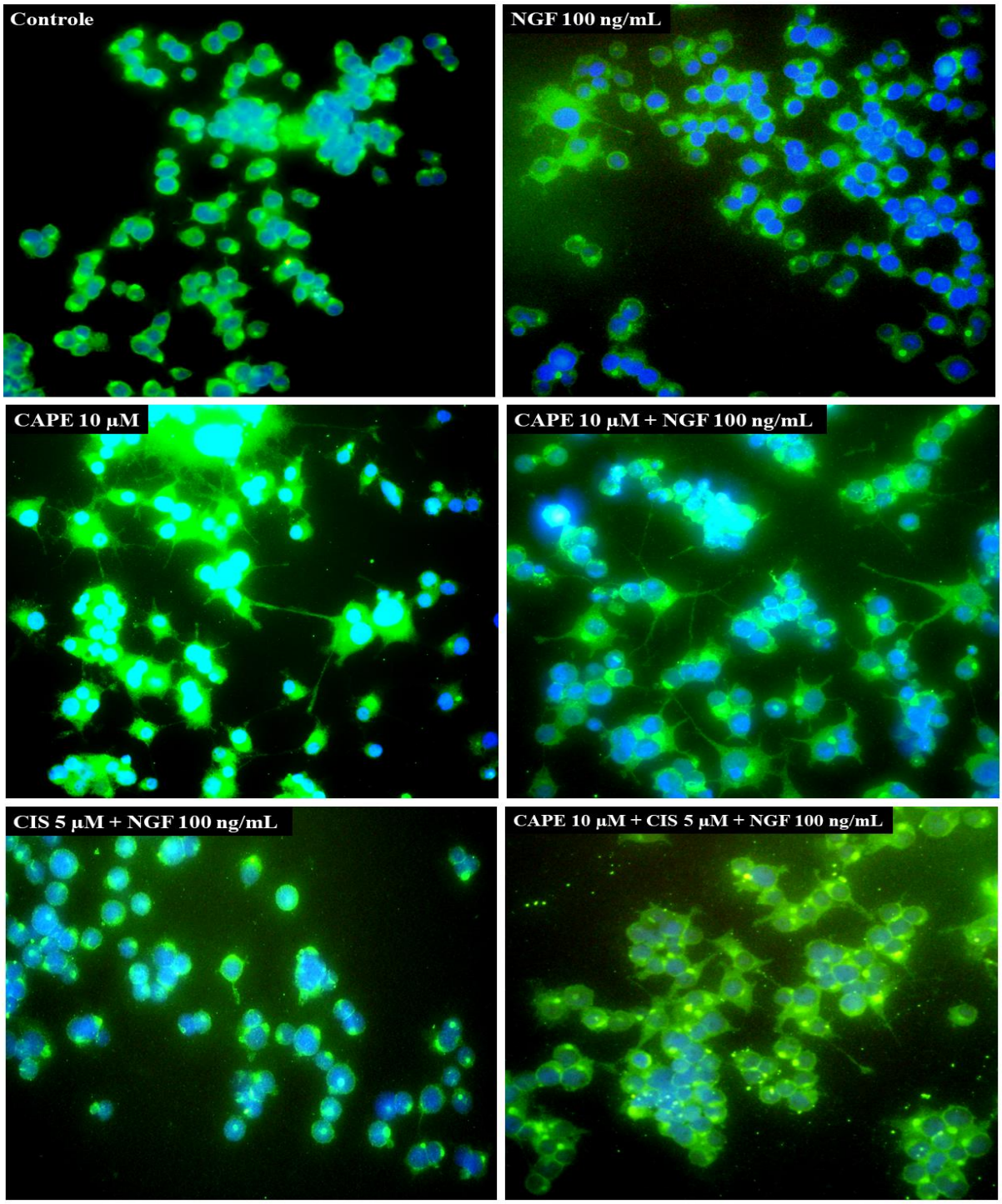


Figura 31. Continuação.

(B)

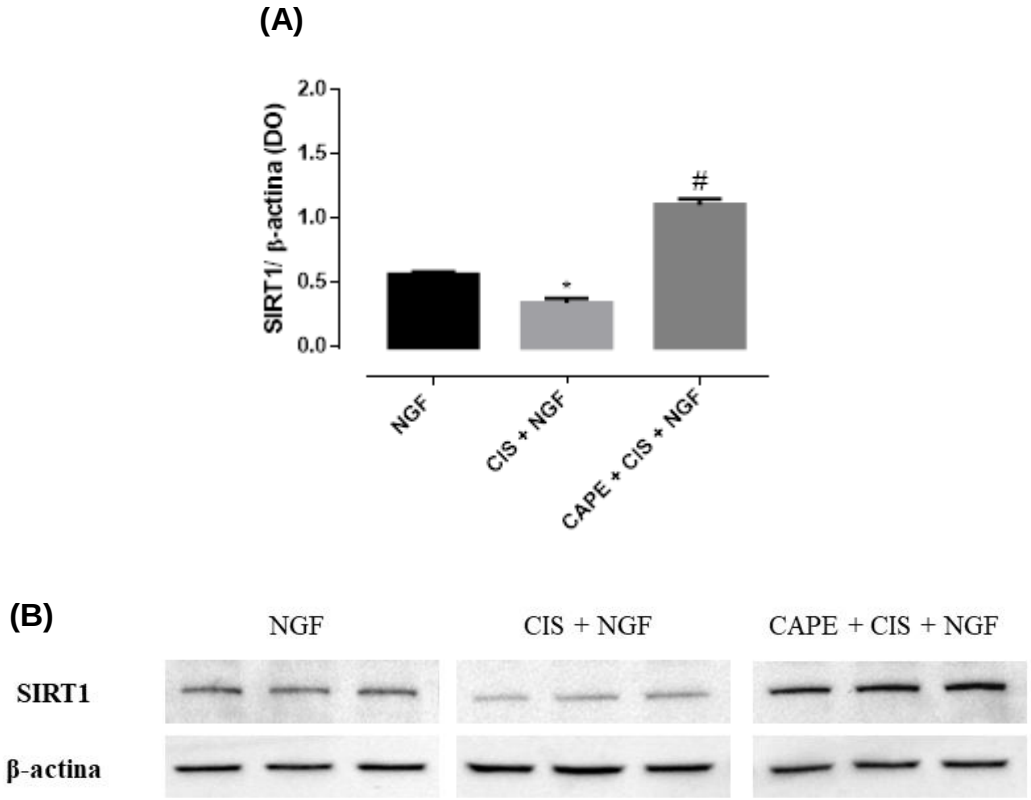


Legenda: **(A)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência quantificada com o emprego do software Image J. A intensidade de fluorescência foi expressa como fluorescência celular total corrigida (FCTC); **(B)** sobreposição das imagens digitalizadas mostrando os neurofilamentos marcados com anti-neurofilamento-200 kD marcado com FITC e núcleo corado com Hoechst 33342 (x40). Os neurofilamentos NF-200 estão marcados em verde e os núcleos estão marcados em azul. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao grupo NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$); & Significativo em relação ao grupo CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$).

4.13 Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a expressão de SIRT-1, AMPK α e FOSFO-AMPK α

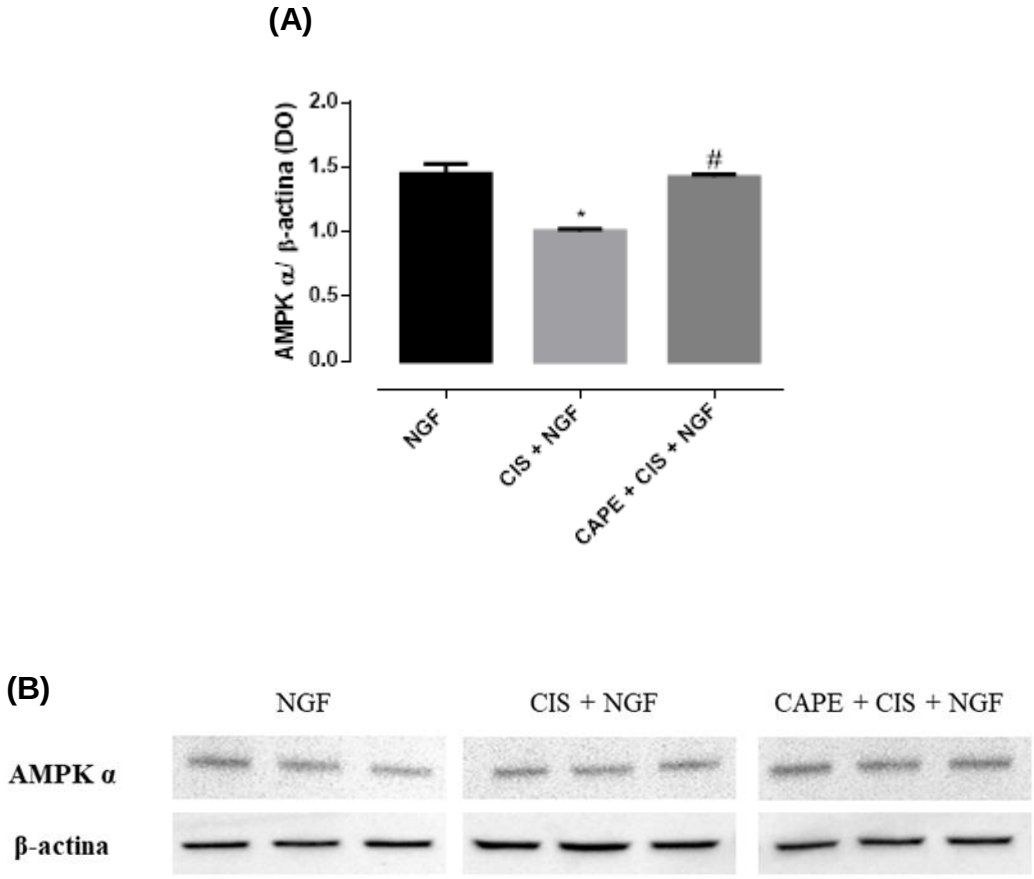
A expressão de SIRT-1, AMPK α e Fosfo-AMPK α foi estatisticamente menor no grupo tratado com CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (0,34 ± 0,03; 1,00 ± 0,01; 0,81 ± 0,05, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (NGF 100 ng/mL; 0,56 ± 0,02; 1,45 ± 0,07; 1,51 ± 0,11). A adição de CAPE 10 µM minimizou o efeito inibitório da CIS 5 µM sobre a expressão dessas proteínas. A expressão de SIRT-1 (1,10 ± 0,04), AMPK α (1,42 ± 0,02) e Fosfo-AMPK α (1,27 ± 0,04) foi estatisticamente maior nas células tratadas com CAPE 10 µM + CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL em relação às células expostas somente à CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL (0,34 ± 0,03; 1,00 ± 0,01; 0,81 ± 0,05, respectivamente) (Figuras 32, 33 e 34).

Figura 32. Expressão de SIRT-1 nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE.



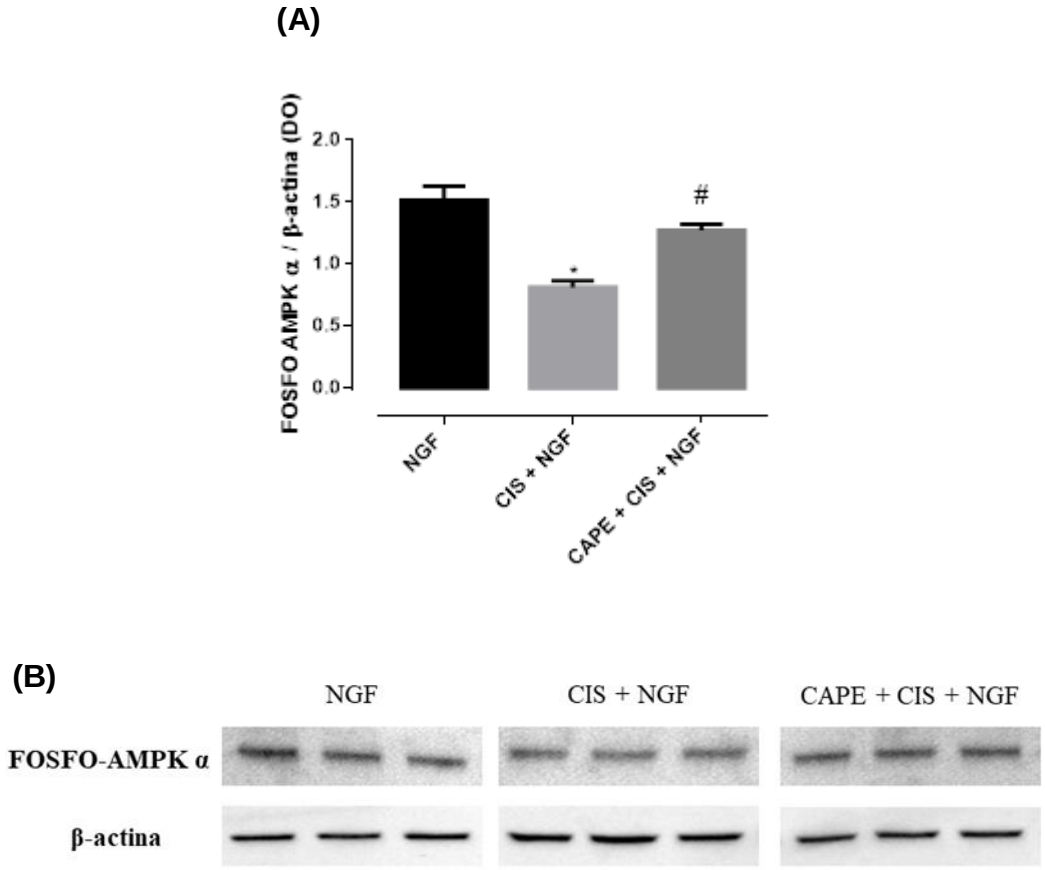
Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) de SIRT-1 normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas de SIRT-1 e da β actina. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$); # Significativo em relação à CIS 5 µM + NGF 100 ng/mL.

Figura 33. Expressão de AMPK α nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE.



Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) de AMPK α normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas de AMPK α e da β actina. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$); # Significativo em relação à CIS 5 μM + NGF 100 ng/mL.

Figura 34. Expressão de Fosfo-AMPK α nas células PC12 expostas à cisplatina e ao CAPE.



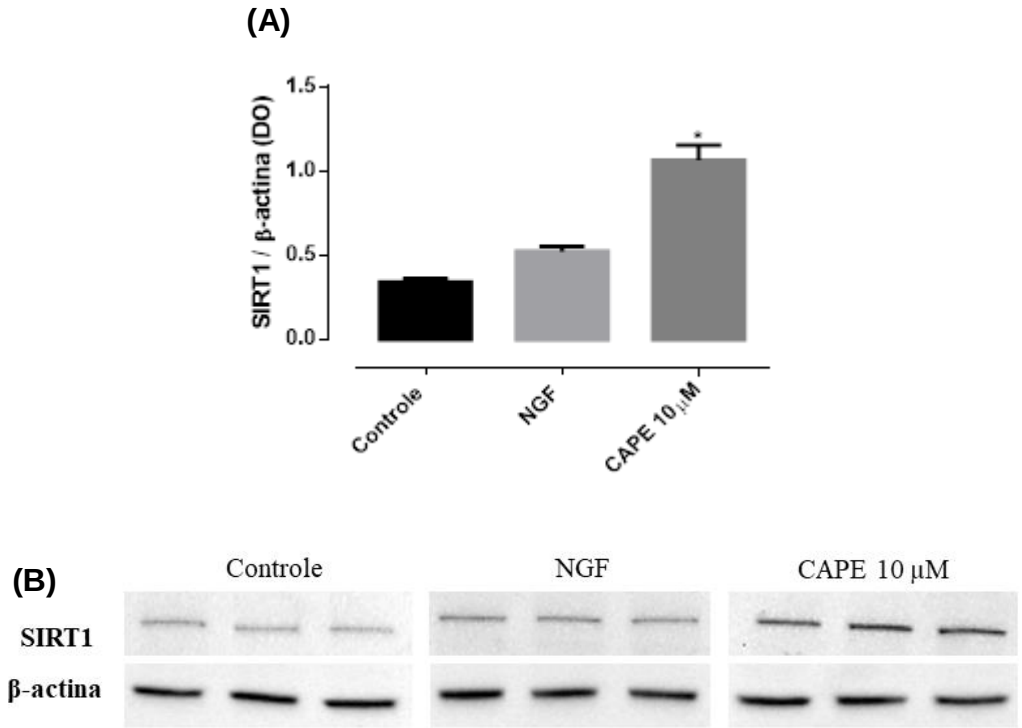
Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) da Fosfo-AMPK α normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas de Fosfo-AMPK α e da β actina. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao NGF 100 ng/mL ($p < 0,05$); # Significativo em relação à CIS 5 μM + NGF 100 ng/mL.

4.14 Efeito intrínseco do CAPE sobre a expressão de SIRT-1, AMPK α e Fosfo-AMPK α

Nenhuma diferença significativa foi observada na expressão de SIRT-1 nas células tratadas com NGF em relação ao controle. No entanto, houve aumento na expressão desta proteína nas células tratadas com CAPE 10 µM (1,067 ± 0,08) quando comparadas ao controle (0,34 ± 0,02) (Figura 35).

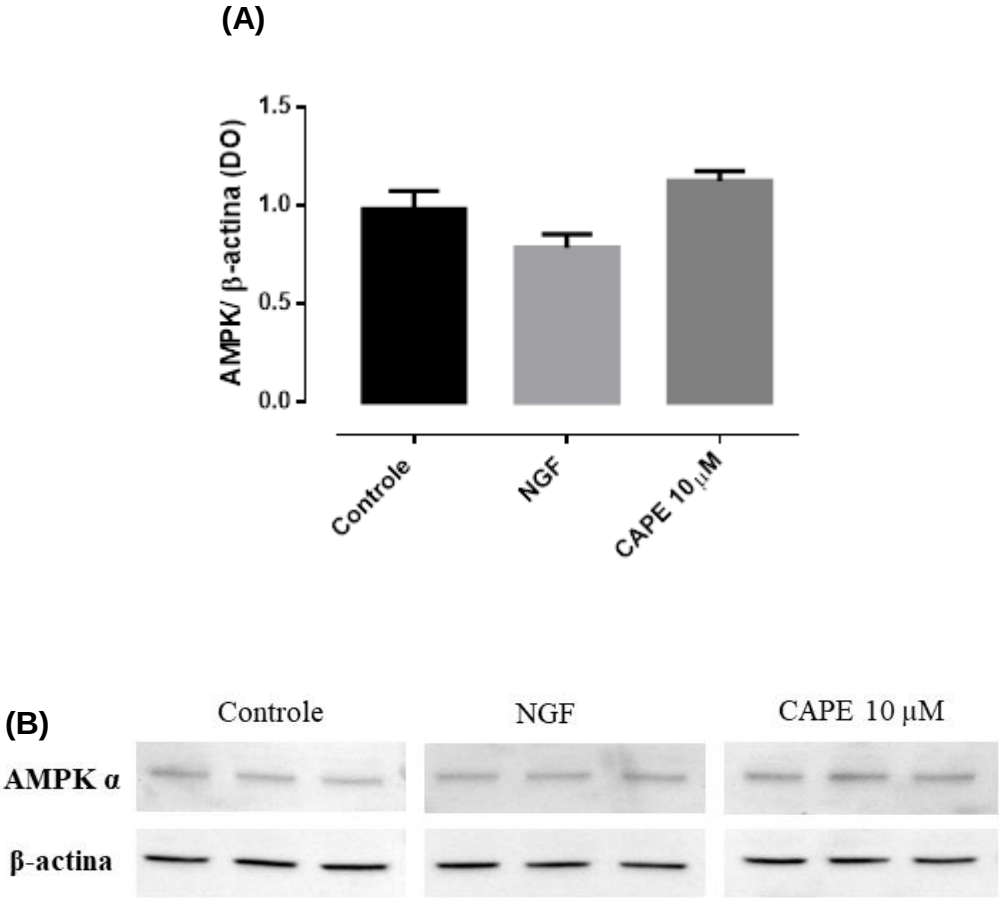
Não houve diferença significativa da expressão de AMPK α entre os grupos NGF e controle ou CAPE 10 µM e controle (Figura 36). Entretanto, a expressão da Fosfo-AMPK α (forma ativa da AMPK α), aumentou significativamente nas células tratadas com NGF (0,96 ± 0,05) ou CAPE 10 µM (1,33 ± 0,07) em relação ao controle (0,54 ± 0,07) (Figura 37).

Figura 35. Efeito do CAPE na expressão de SIRT-1 em células PC12.



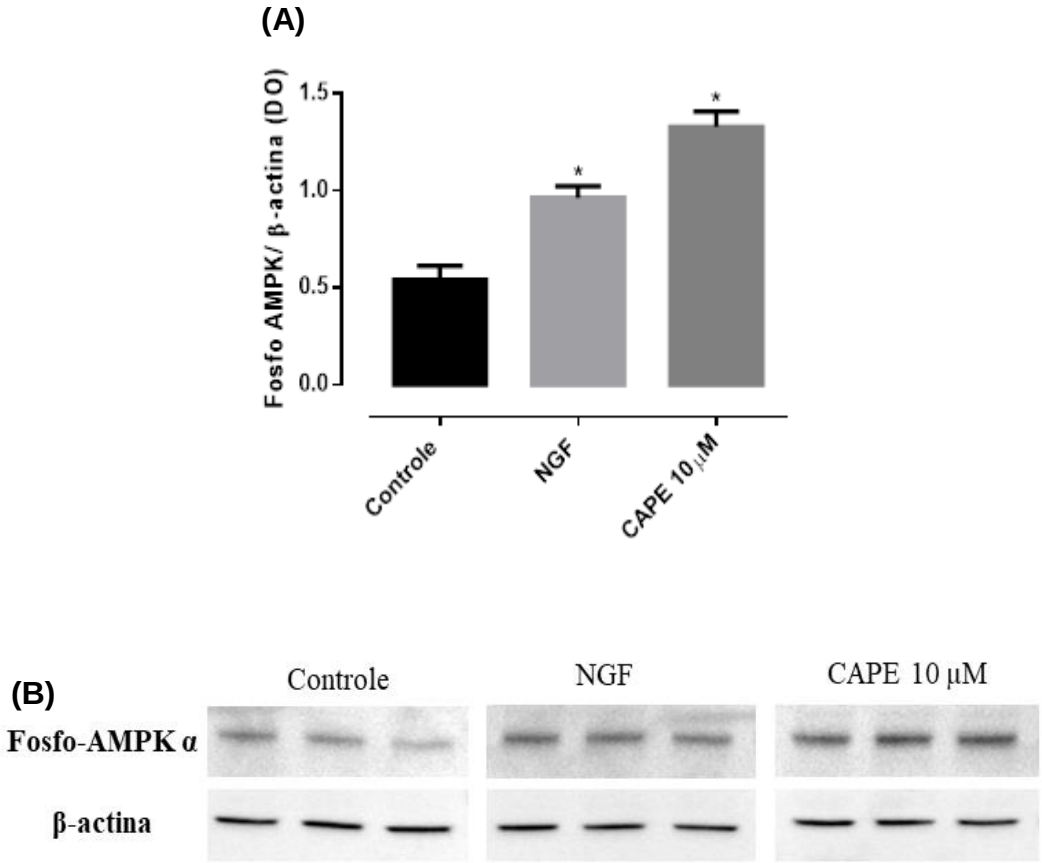
Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) de SIRT-1 normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas de SIRT-1 e da β actina. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

Figura 36. Efeito do CAPE na expressão de AMPK α em células PC12.



Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) de AMPK α normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas de AMPK α e da β actina. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

Figura 37. Efeito do CAPE na expressão de Fosfo-AMPK α em células PC12.

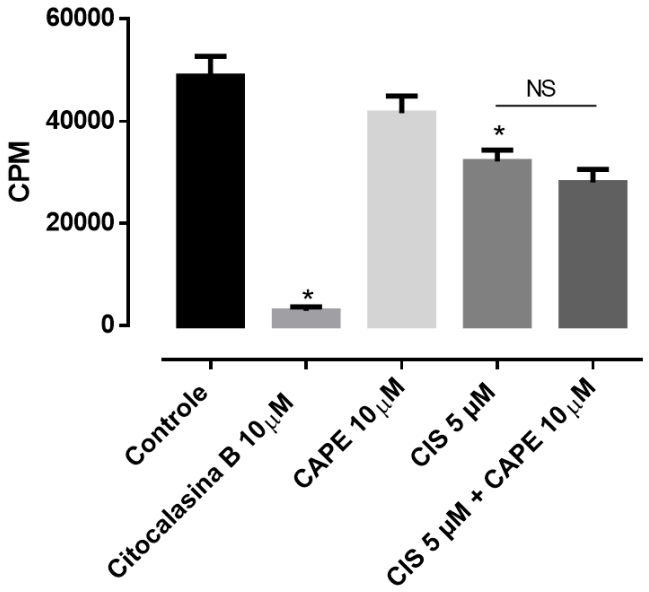


Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) de Fosfo-AMPK α normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas de Fosfo-AMPK α e da β actina. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

4.15 Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a captação de glicose

Como apresentado na Figura 38, houve redução significativa da captação de glicose nas células tratadas com o inibidor da captação de glicose citocalasina B 10 µM (3077 ± 1063 CPM) em relação às células do controle negativo (61208 ± 6692 CPM). Também houve redução significativa na captação de glicose das células tratadas com CIS 5 µM (36236 ± 5967 CPM) em relação ao controle negativo. O CAPE 10 µM não alterou significativamente a captação de glicose (41602 ± 3332 CPM) em relação ao controle negativo, nem apresentou efeito protetor contra a redução da captação de glicose induzida pela cisplatina, uma vez que não foi observada diferença significativa entre as células tratadas apenas com CIS 5 µM (36236 ± 5967 CPM) e as células tratadas com a associação de CIS 5 µM + CAPE 10 µM (31841 ± 5089 CPM).

Figura 38. Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a captação de glicose.



Legenda: As células foram tratadas com citocalasina B ou CIS 5µM e/ou CAPE 10 µM. Após 72h de incubação, o meio foi substituído por DMEM sem glicose e as células foram tratadas com concentrações equimolares de *Deoxi-D-glicose* marcada e não marcada com trício. A radioatividade foi medida em contador de cintilação líquida Microbeta 1450 LSC Luminescence Counter (PerkinElmer, Waltham, MA) e os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM). Os dados obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas foram expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$); NS, não significativo.

4.16 A diferenciação celular induzida pelo CAPE nas células PC12 foi inibida pelo K252a

A porcentagem de células diferenciadas foi estatisticamente maior no grupo NGF 100 ng/mL, assim como no grupo CAPE 10 µM, quando comparadas ao controle, durante todo o período de incubação (24 - 168 horas). O efeito inibitório do K252a foi observado a partir de 72 horas de incubação no grupo K252a 100 nM + NGF 100 ng/mL e, a partir de 96 horas no grupo K252a 100 nM + CAPE 10 µM, em relação aos respectivos controles (grupos NGF e CAPE). Nenhuma diferença significativa foi observada entre a porcentagem de diferenciação dos grupos K252a (100 nM) e controle sem tratamento, durante todo o período de incubação (Figura 39 A-H).

Figura 39. Efeito do CAPE 10 µM sobre a diferenciação de células PC12 pré-tratadas com K252a (inibidor do receptor trkA).

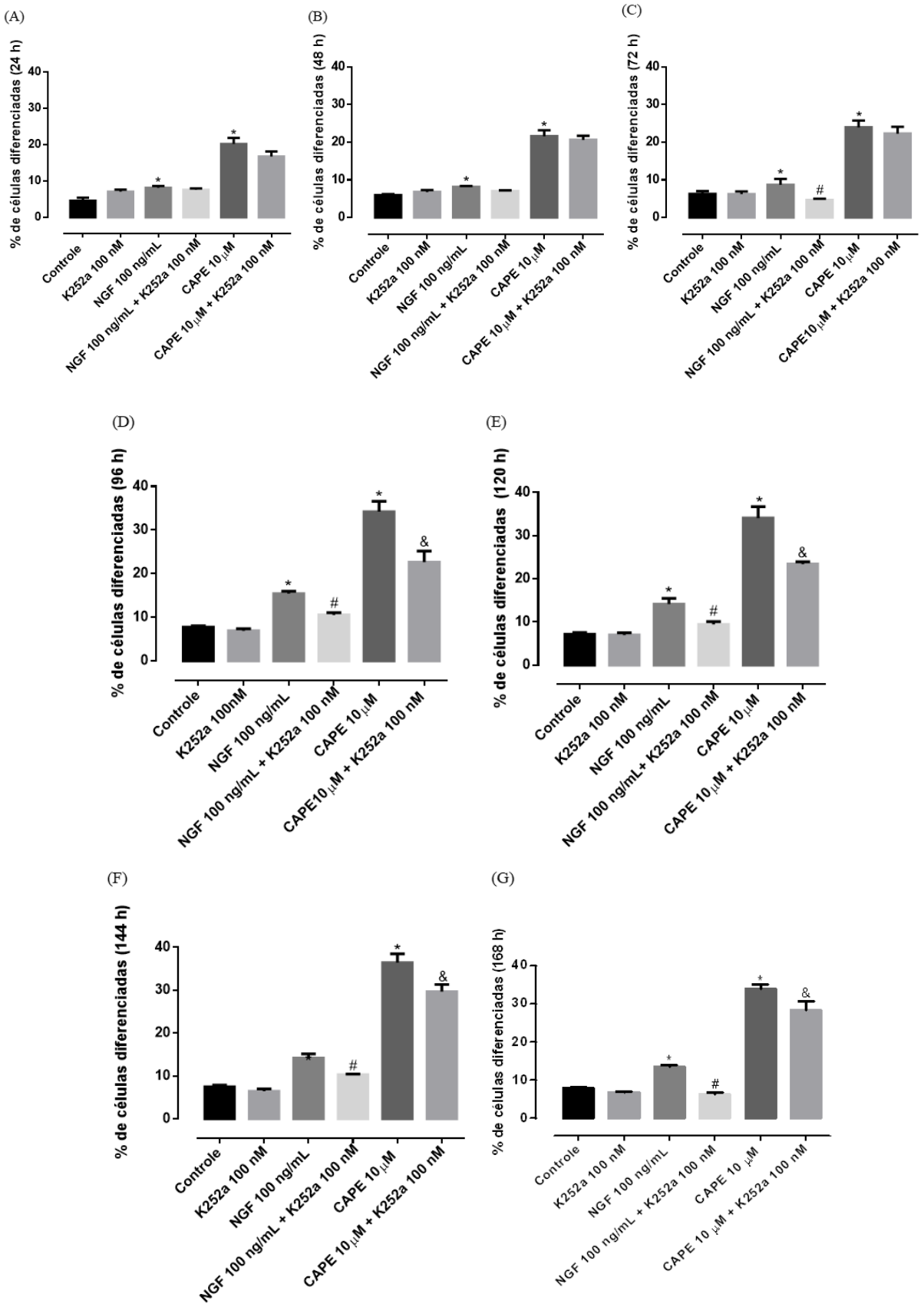
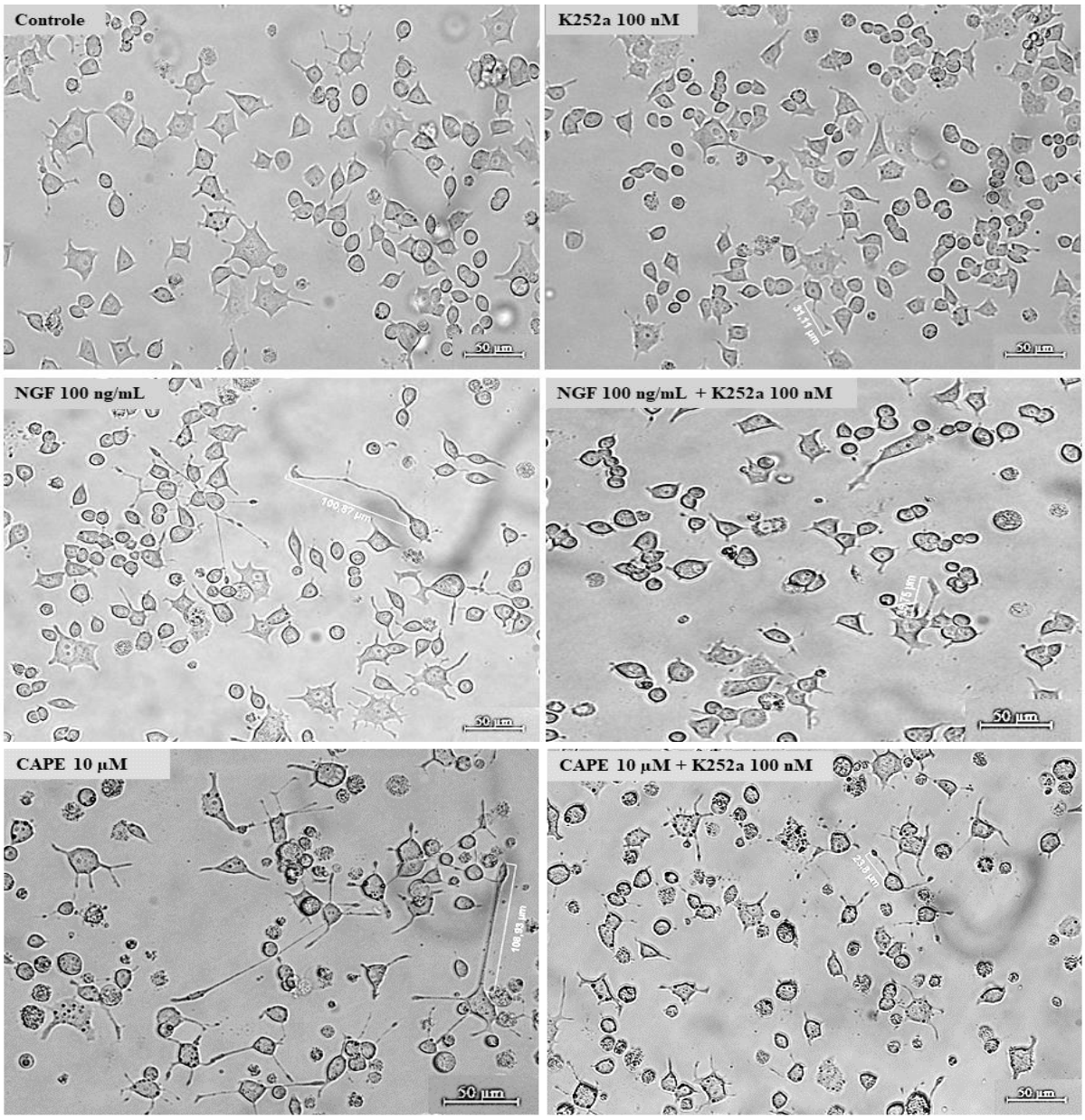


Figura 39. Continuação.

(H)



Legenda: As células foram analisadas após **(A)** 24 h, **(B)** 48 h, **(C)** 72 h, **(D)** 96 h, **(E)** 120 h, **(F)** 144 h, **(G)** 168 h de incuabção. Células com pelo menos um neurito igual ou maior ao diâmetro do corpo celular foram contadas e expressas como porcentagem do total de células no campo. **(H)** Imagens digitalizadas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as mudanças morfológicas em células PC12 após 168 h de incubação com os diferentes tratamentos. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$); # Significativo em relação a NGF 100 ng/mL; & Significativo em relação ao CAPE 10 µM.

4.17 Efeito do CAPE na diferenciação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

A porcentagem de células diferenciadas no grupo tratado com ácido retinóico 10 µM (44,99 ± 1,75%) foi estatisticamente maior em relação ao grupo sem tratamento (controle negativo, 5,21 ± 0,85%). CAPE 10 µM (5,64 ± 0,48) não aumentou a diferenciação nas células SH-SY5Y em relação ao controle (5,21 ± 0,85%). Nas células tratadas com o CAPE e ácido retinóico, houve redução da diferenciação celular (37,62 ± 1,52%) em relação às células tratadas apenas com ácido retinóico (44,99 ± 1,75%) (Figura 40).

Figura 40. Efeito do CAPE 10 µM sobre a diferenciação de células SH-SY5Y.

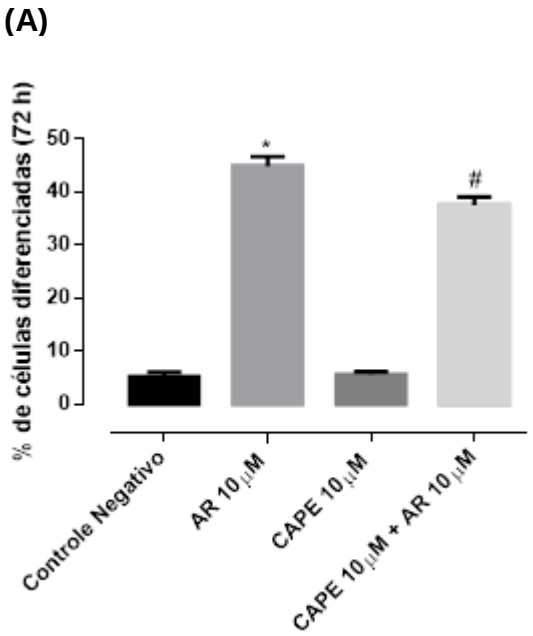
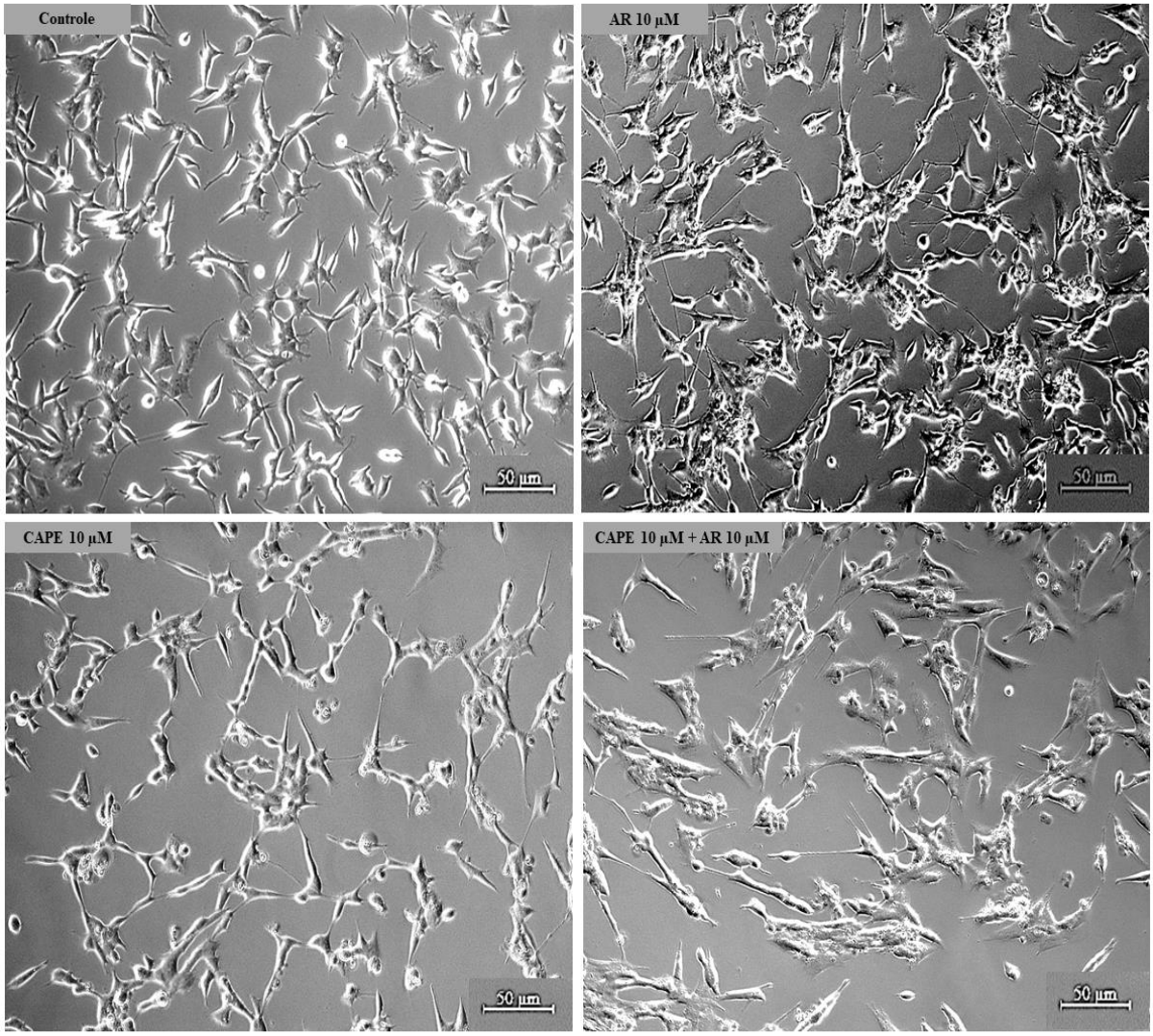


Figura 40. Continuação.

(B)



Legenda: **(A)** Gráficos de barras mostrando a porcentagem de células diferenciadas após 72 horas de incubação com AR 10 µM e/ou CAPE 10 µM. Células com pelo menos um neurito igual ou maior ao diâmetro do corpo celular foram contadas e expressas como porcentagem do total de células no campo. **(B)** Imagens digitalizadas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as mudanças morfológicas em células SH-SY5Y após 72 h de incubação. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao AR 10 µM

4.18 Inibidores específicos das vias de sinalização neurotrófica: PI3K/Akt (LY294002) e MAPK (U0126)

A porcentagem de células diferenciadas foi significativamente maior nos grupos NGF 100 ng/mL (13,59 ± 3,0%) e CAPE 10 µM (38,00 ± 5,7%) quando comparados ao controle negativo (7,85 ± 1,16%). Os grupos NGF + LY294002 (4,12 ± 1,02%) e CAPE + LY294002 (15,01 ± 2,99%) apresentaram porcentagem de diferenciação celular significativamente menor do que os grupos não tratados com o inibidor, isto é, NGF e CAPE, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem de diferenciação das células tratadas apenas com o inibidor da via PI3K/Akt (LY294002) (4,42 ± 0,39%) em relação ao controle (7,85 ± 1,16%). Os dados são apresentados na Figura 41 A e B.

Figura 41. Efeito do NGF e do CAPE 10 µM sobre a diferenciação de células PC12 pré- tratadas com LY294002 (inibidor da via PI3K/Akt).

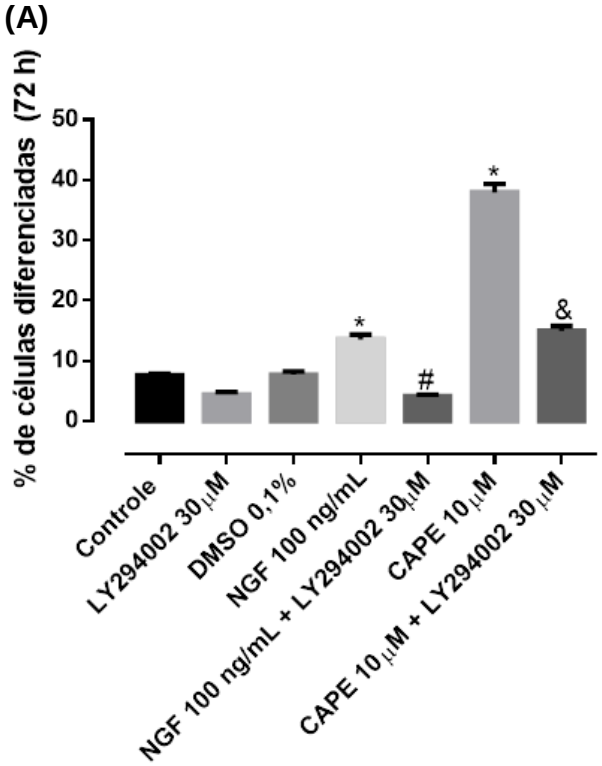
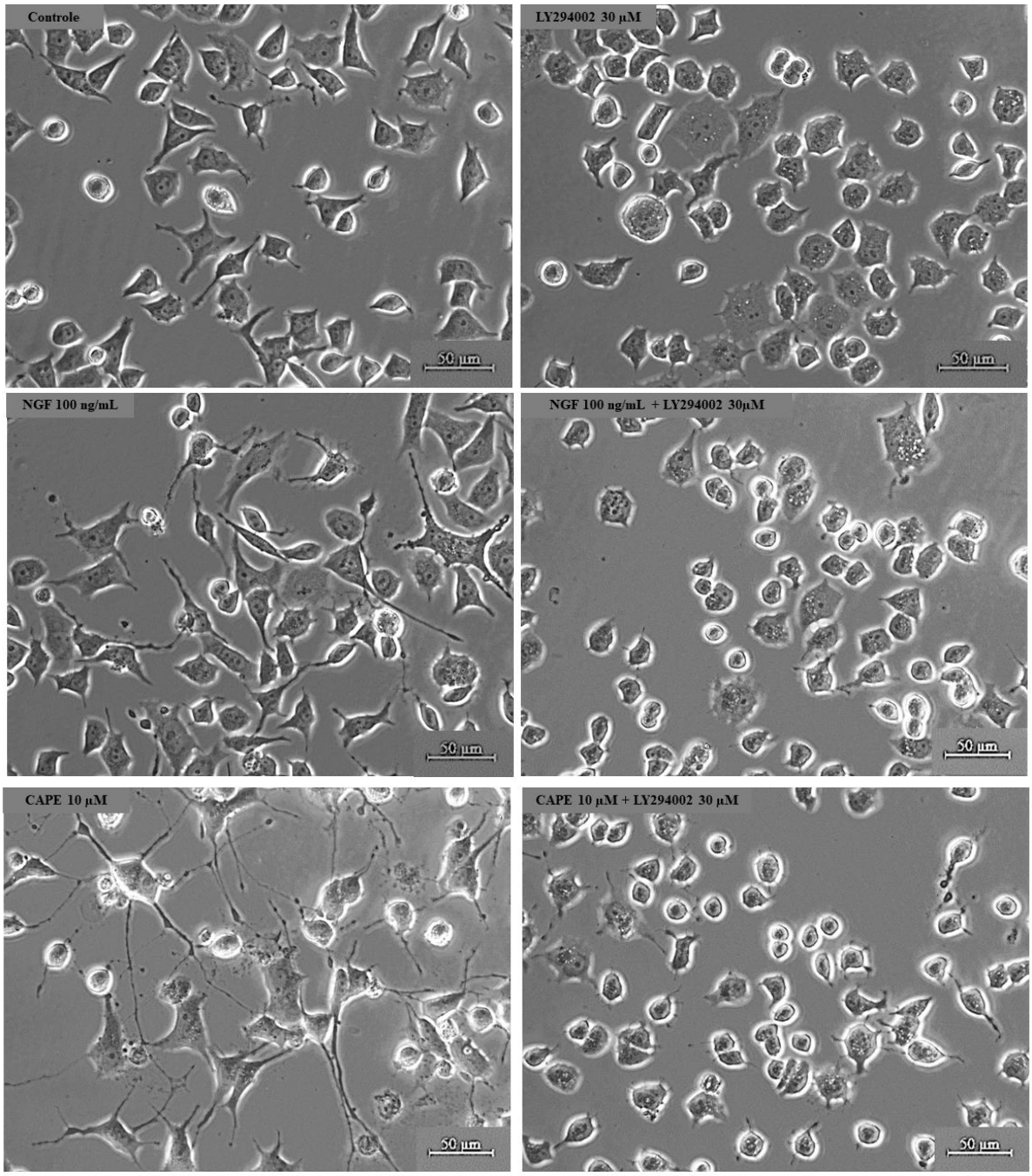


Figura 41. Continuação.

(B)



Legenda: **(A)** Representação Gráfica da Porcentagem de Diferenciação Celular. Células com pelo menos um neurito igual ou maior ao diâmetro do corpo celular foram contadas e expressas como porcentagem do total de células no campo. **(B)** Imagens digitalizadas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as mudanças morfológicas em células PC12 após 72 h de incubação. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média. .* Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao grupo NGF 100 ng/mL; & Significativo em relação ao grupo CAPE 10 µM.

A porcentagem de células diferenciadas foi significativamente maior nas células dos grupos NGF 100 ng/mL (12,39 ± 2,24 %) e CAPE 10 µM (39,35 ± 6,59 %) quando comparadas ao controle (3,45 ± 0,57 %). Após 72 horas de incubação, os grupos NGF + U0126 (1,71 ± 0,43 %) e CAPE + U0126 (7,6 ± 1,41 %) apresentaram porcentagem de diferenciação celular significativamente menor do que os grupos sem inibidor, ou seja, NGF e CAPE, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem de diferenciação das células tratadas apenas com o inibidor da via MEK1/2 (U0126) (1,18 ± 0,27 %) em relação ao controle (3,45 ± 0,57 %). Os dados são apresentados na Figura 42 A e B.

Figura 42. Efeito do NGF e do CAPE 10 µM na diferenciação de células PC12 pré-tratadas com U0126 (inibidor MEK1/2).

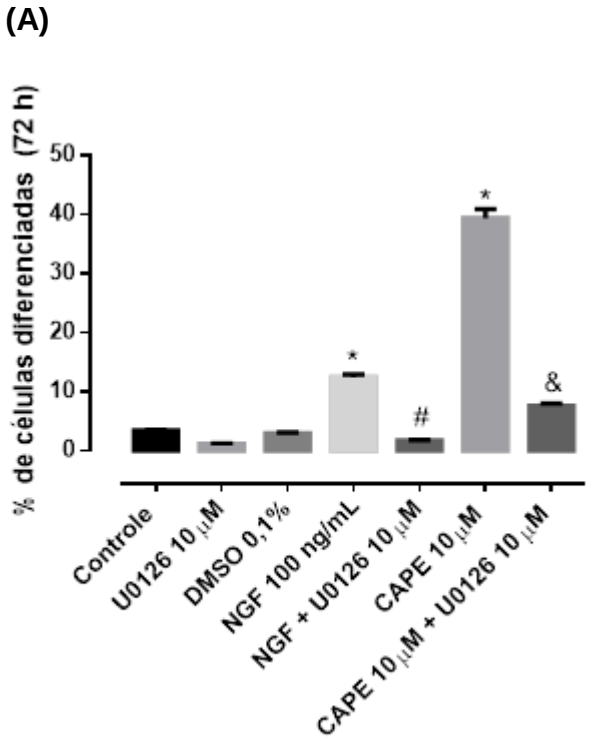
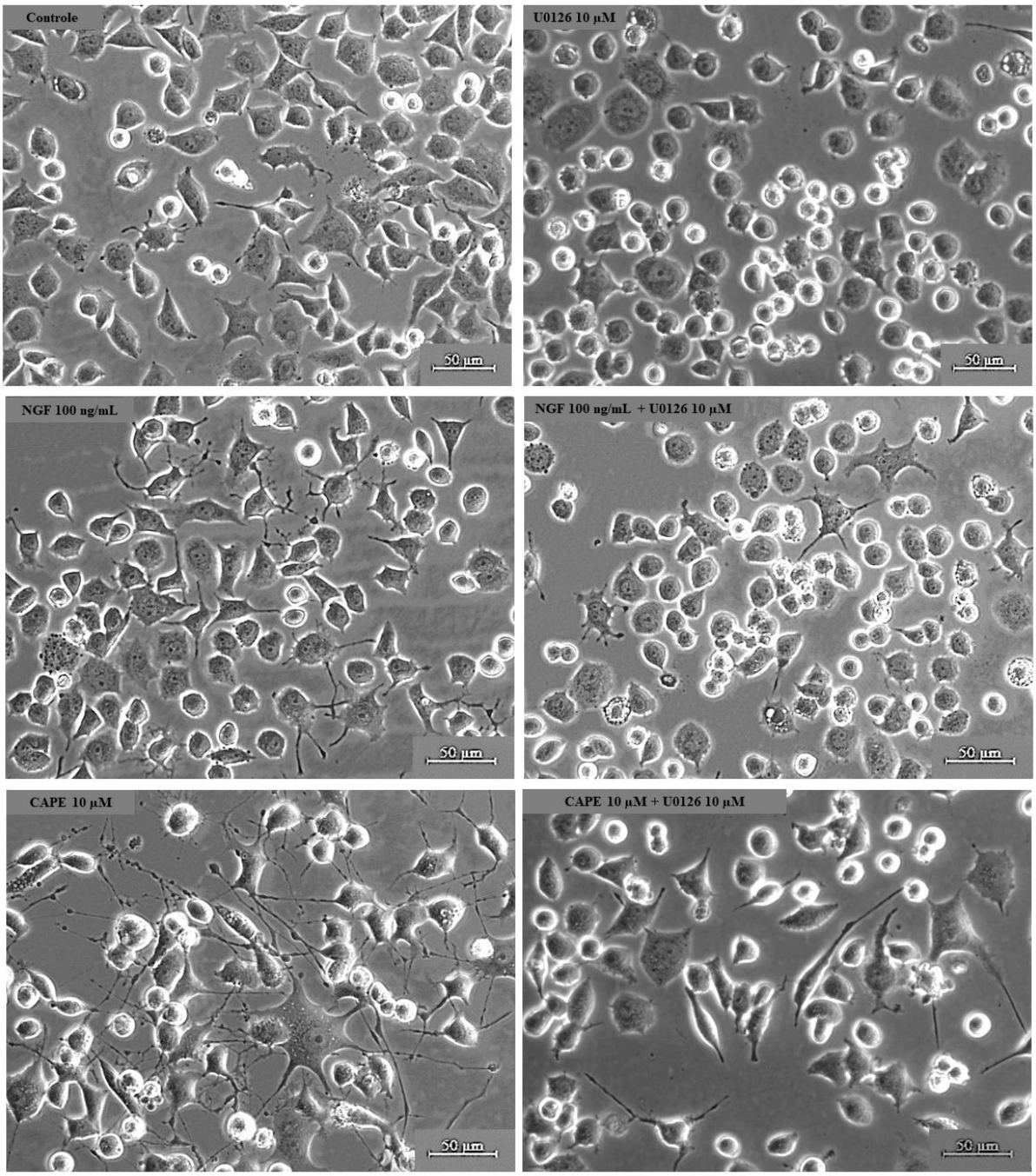


Figura 42. Continuação.

(B)



Legenda: **(A)** Representação Gráfica da Porcentagem de Diferenciação Celular. Células com pelo menos um neurito igual ou maior ao diâmetro do corpo celular foram contadas e expressas como porcentagem do total de células no campo. **(B)** Imagens digitalizadas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as mudanças morfológicas em células PC12 após 72 h de incubação. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao grupo NGF 100 ng/mL; & Significativo em relação ao grupo CAPE 10 µM.

4.19 O efeito neuritogênico do CAPE não é aditivo ao efeito do NGF

CAPE 10 µM induziu a diferenciação nas células PC12 tanto na ausência (13,21 ± 0,29%) como na presença de NGF (14,02 ± 0,52%) quando comparado ao controle (3,09 ± 0,09%). Nenhuma diferença significativa na porcentagem de diferenciação celular foi observada entre as células tratadas com CAPE 10 µM e CAPE 10 µM + NGF 100 ng/mL (Figura 43). Tal resultado sugere que o efeito do CAPE na diferenciação das células PC12 não é dependente e nem aditivo ao efeito do NGF.

Figura 43. Efeito do CAPE sobre a diferenciação celular em células PC12 na ausência e presença de NGF.

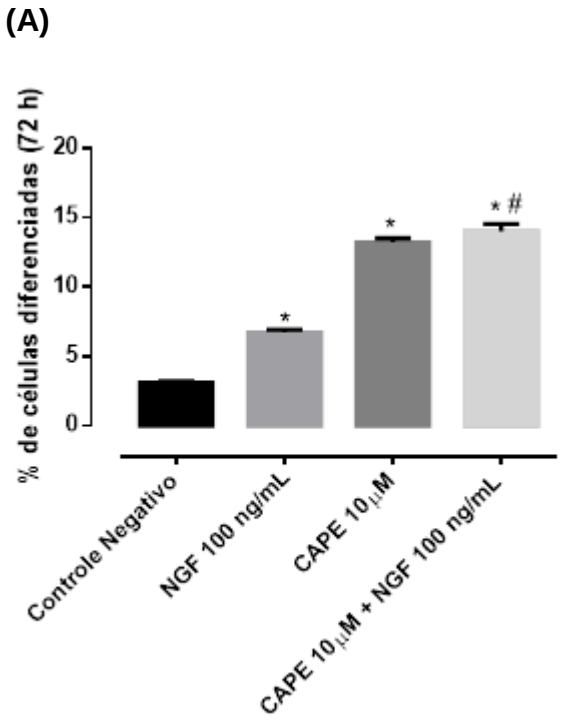
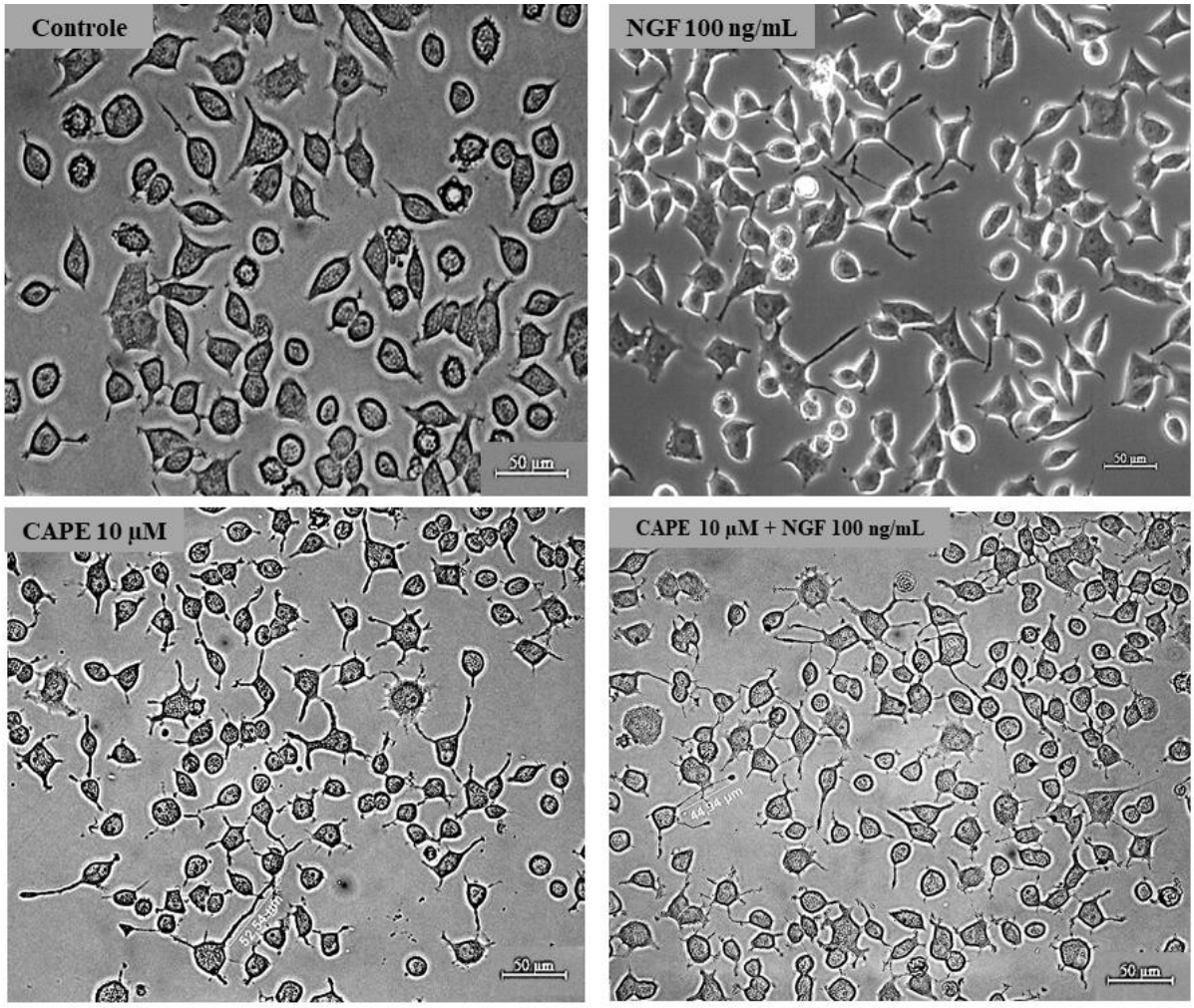


Figura 43. Continuação

(B)

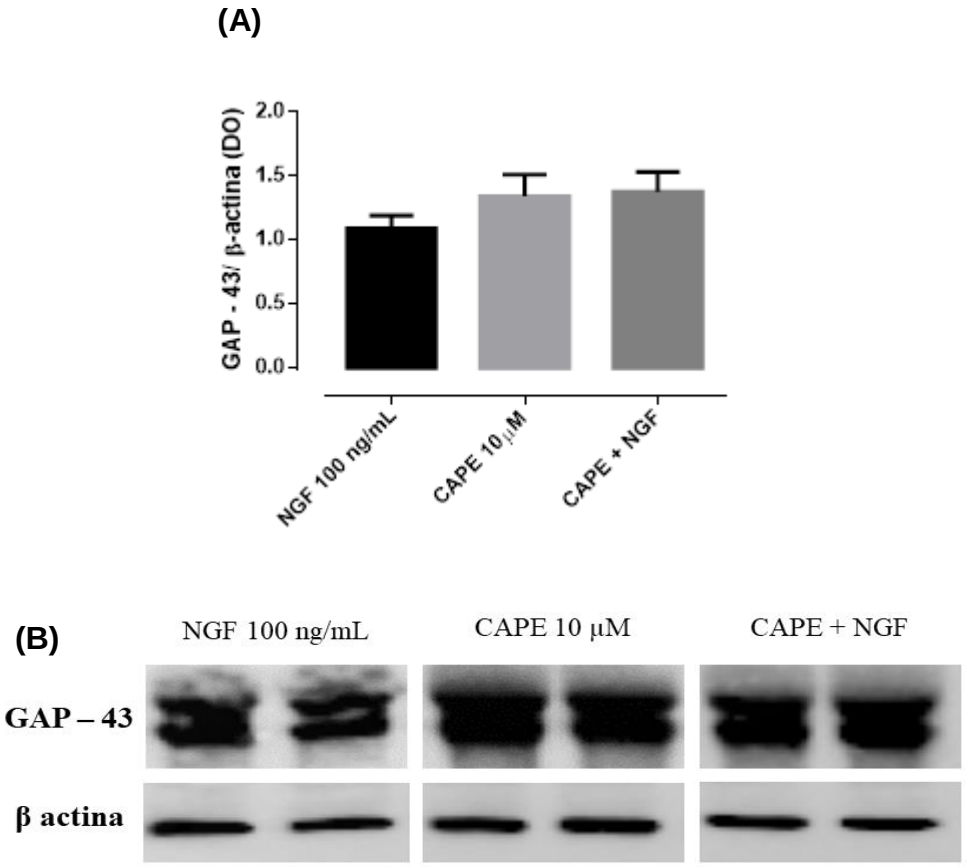


Legenda: **(A)** Gráfico de barras. Os neuritos foram contados após 72 horas incubação. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média. * Significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$); # Significativo em relação ao grupo NGF 100 ng/mL. **(B)** Imagens digitalizadas obtidas por microscopia de contraste de fase (aumento 400x) mostrando as mudanças morfológicas nas células PC12 após 72 horas de incubação.

4.20 Efeito do CAPE sobre a expressão das proteínas axonais em células PC12 na presença e na ausência de NGF

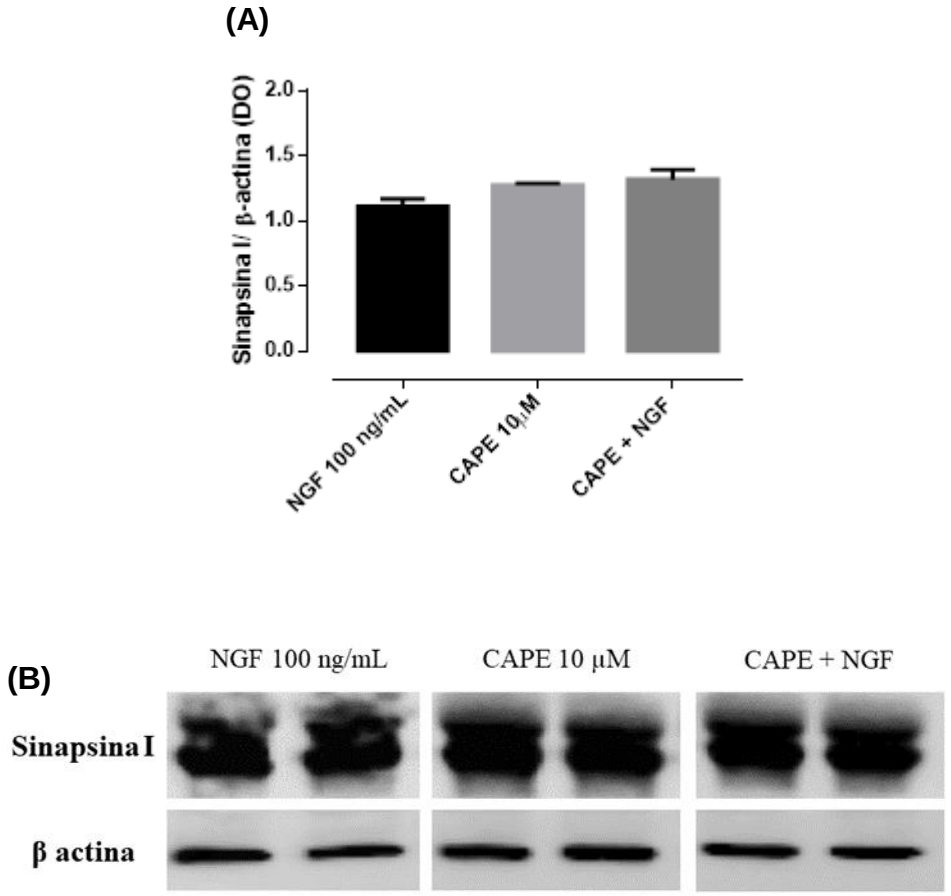
Nenhuma diferença significativa foi observada na expressão do GAP – 43, sinapsina I e sinaptofisina entre as células tratadas com CAPE 10 µM (1,34 ± 0,16; 1,27 ± 0,01 e 1,22 ± 0,10, respectivamente) ou CAPE 10 µM + NGF 100 ng/mL (1,37 ± 0,15; 1,31 ± 0,07 e 1,41 ± 0,05, respectivamente), indicando ausência de efeito somatório (Figuras 44, 45 e 46, respectivamente).

Figura 44. Efeito da associação de CAPE e NGF sobre a expressão do GAP – 43 em células PC12.



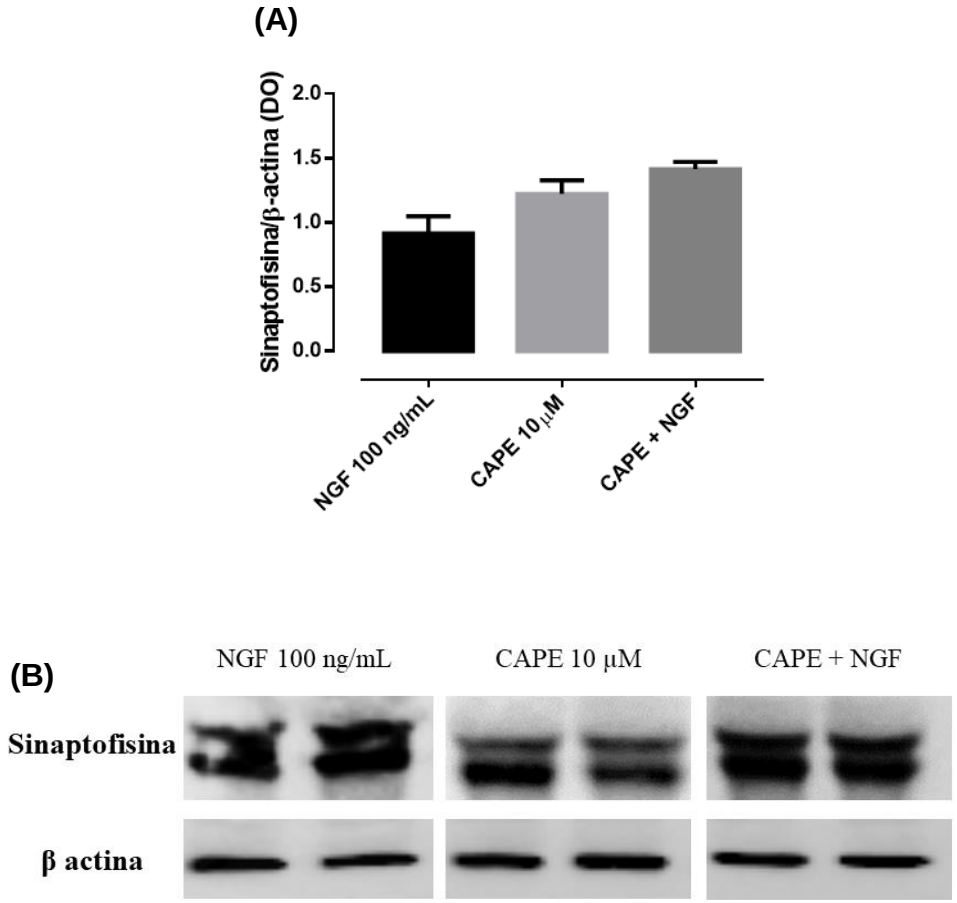
Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) do GAP – 43 normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas do GAP – 43 e da β actina. Os dados obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicatas, foram expressos como média ± desvio padrão da média.

Figura 45. Efeito da associação de CAPE e NGF sobre a expressão da sinapsina I em células PC12.



Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) da sinapsina I normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas da sinapsina I e da β actina. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média.

Figura 46. Efeito da associação de CAPE e NGF sobre a expressão da sinaptofisina em células PC12.

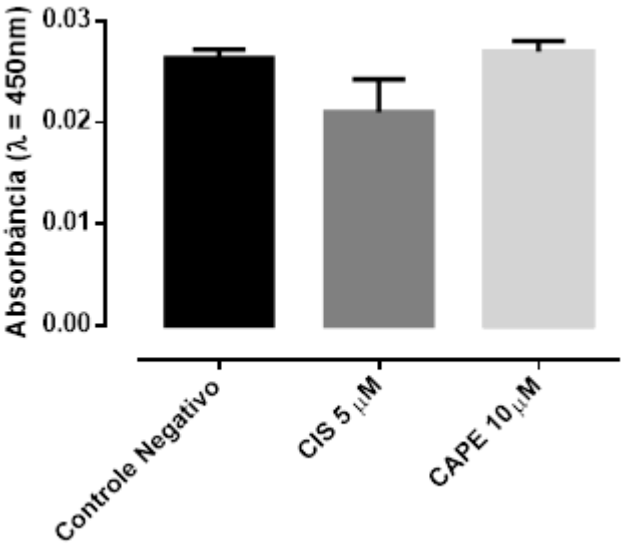


Legenda: **(A)** Gráfico representativo da densidade ótica (DO) da sinaptofisina normalizada pela DO da β actina. **(B)** Imagens representativas das bandas da sinaptofisina e da β actina. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicatas e foram expressos como média ± desvio padrão da média.

4.21 Efeitos da cisplatina e do CAPE sobre a expressão de NGF

O tratamento com a Cisplatina 5 µM (0,021 ± 0,0032) ou com o CAPE 10 µM (0,032 ± 0,0033) não alteraram os níveis de NGF em relação ao controle negativo (0,026 ± 0,0008) (Figura 47).

Figura 47. Efeito da cisplatina e do CAPE sobre a expressão de NGF em células PC12 após 72h de incubação.



Legenda: Os dados obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicatas, foram expressos como média ± desvio padrão da média. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

A cisplatina é um agente quimioterápico altamente eficaz, utilizado isoladamente ou em associação com outros agentes, no tratamento de vários tipos de câncer (ALOE et al., 2000; CAROZZI et al., 2015). No entanto, apesar da sua eficácia na terapia antineoplásica, seu uso clínico é fortemente limitado por ser o mais neurotóxico entre os compostos de platina (CAVALETTI et al., 2011). O principal alvo da ação tóxica da cisplatina é o gânglio da raiz dorsal (GRD) do sistema nervoso sensorial (GILL; WINDEBANK, 1998; MCDONALD; WINDEBANK, 2002), onde estes compostos se acumulam e induzem degeneração axonal. A degeneração axonal do tipo *Walleriana* está associada, entre outros eventos, com danos no crescimentos de neuritos, o que parece preceder a morte neuronal (QUASTHOFF; HARTUNG, 2002; HAUSHEER et al., 2006). Os axônios são extremamente susceptíveis ao dano no DNA mitocondrial induzido pela cisplatina (PODRATZ et al., 2011), sugerindo interferência da cisplatina na plasticidade axonal. Embora diferentes mecanismos tenha sido propostos para explicar a neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina, o mecanismo exato permanece incerto (KELLEY et al., 2014). Por esta razão, no presente estudo, os efeitos da cisplatina foram avaliados utilizando modelos neuronais *in vitro* a fim de caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na sua neurotoxicidade.

Primeiramente, a fim de selecionar a concentração de trabalho da cisplatina, foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações sobre a diferenciação celular e sobre a viabilidade de células PC12. A cisplatina 5 µM foi a menor concentração testada que reduziu significativamente a formação de neuritos sem induzir morte celular. Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo conduzido em células PC12, no qual 3,33 µM de cisplatina reduziu a porcentagem de células com neuritos, sem produzir citotoxicidade (KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007). A citotoxicidade da cisplatina foi monitorada através do ensaio do MTT, que avalia a função mitocondrial, e também através do ensaio de LDH, o qual avalia a integridade da membrana celular (LOBNER, 2000). De acordo com os resultados, observou-se que, a partir da concentração de 20 µM (IC_{50} = 32 µM), a cisplatina induziu dano mitocondrial e que, concentrações iguais ou maiores a 167 µM provocaram danos na membrana das células aumentando a liberação de LDH. Nenhum dano mitocondrial foi observado nas células tratadas com 5 µM de cisplatina. Adicionalmente, a concentração de 5 µM

de cisplatina também não aumentou a atividade da caspase-3, sugerindo que esta concentração não é capaz de induzir morte celular por apoptose. Embora estudos tenham demonstrado que a cisplatina induz morte celular de um modo dependente da concentração, em que exposições a baixas concentrações levam a morte celular apoptótica, enquanto exposições a altas concentrações, levam a morte necrótica (GONZALEZ et al., 2001), não foi observada morte celular apoptótica em células PC12 expostas a 5 µM de cisplatina. Este resultado está em linha com o resultado de citotoxicidade (MTT). Como não houve dano mitocondrial, não foi ativada a via intrínseca de ativação da cascata de caspases (BOTTONE et al., 2008).

A cisplatina 5 µM também não induziu aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que também está em linha com os resultados de caspase 3 e da função mitocondrial (MTT). O estresse oxidativo mitocondrial leva à oxidação de lipídeos e proteínas com consequente danos à membrana mitocondrial e liberação do citocromo c, evento que inicia a via intrínseca de ativação da cascata de caspases apoptóticas. Estudos apontam o estresse oxidativo no gânglio da raiz dorsal (GRD) como um importante mecanismo no desenvolvimento da neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina (STAROBOVA; VETTER, 2017), contudo, neste estudo foram avaliados os eventos precoces causados por uma concentração extremamente baixa de cisplatina (5 µM), que precedem o estresse oxidativo, os danos mitocondriais e a morte celular. Por outro lado, essa mesma concentração inibiu a neuritogênese induzida pelo NGF nas células PC12. Tais dados sugerem que o efeito inibitório da cisplatina sobre o processo de diferenciação celular ocorre em estágios inicias da neurotoxicidade, precedendo os demais eventos que levariam à morte celular. Em um estudo anterior realizado em nosso laboratório, efeito neurotóxico semelhante foi observado em um modelo *in vitro* relacionado à doença de Parkinson, no qual células PC12 foram tratadas com a neurotoxina dopaminérgica MPP^+ (DOS SANTOS et al., 2014).

Com o intuito de compreender melhor os mecanismos pelos quais a cisplatina afeta a neuritogênese, foi investigado o envolvimento da via NGF/trkA. Para tal, foi avaliado o efeito da cisplatina sobre a expressão de NGF em células PC12 e ainda, sobre o crescimento de neuritos em um segundo modelo neuronal (SH-SY5Y), com fenótipo distinto das células PC12 para receptores trk. As células PC12 expressam receptores de alta afinidade (trkA) para NGF; na presença de NGF, as células PC12 cessam a divisão celular, emitem neuritos e se diferenciam em células similares aos

neurônios simpáticos (HUANG; REICHARDT, 2001). Assim as células PC12 constituem um modelo útil para os estudos relacionados à ativação de receptores trkA (TSOULFAS et al., 1996). As células SH-SY5Y, por sua vez, apresentam baixa ou nenhuma expressão de receptores trkA e, portanto, não respondem ao estímulo neurotrófico do NGF. Nestas células, o tratamento com ácido retinóico induz a expressão de receptores trkB, que possui alta afinidade para as neurotrofinas BNDF, NT-3 e NT-4/5, induzindo diferenciação celular por si só ou associado a estas neurotrofinas (KAPLAN et al., 1993; EDSJO et al., 2001). A cisplatina (5 µM) reduziu a diferenciação das células SH-SY5Y quando incubada simultaneamente com ácido retinóico, e também quando foi realizado pré-tratamento (24 h) antes da adição do ácido retinóico, o que exclui a possibilidade de inativação do ácido retinóico pela cisplatina. Tais dados demonstram que a cisplatina inibe a diferenciação celular induzida pelo ácido retinóico nas células SH-SY5Y, sugerindo que os receptores trkA não são alvos essenciais da neurotoxicidade da cisplatina, uma vez que a cisplatina reduziu a neuritogênese também nas células SH-SY5Y que não expressam trkA, mas sim trkB. É possível, contudo, que a cisplatina atue como um antagonista de ambos receptores, trkA e trkB, ligando-se a sítios inespecíficos e impedindo a ligação específica das respectivas neurotrofinas.

Além disso, observou-se que a cisplatina não altera a expressão de NGF nas células PC12, sugerindo que os efeitos neurotóxicos precoces da cisplatina não são mediados pela via NGF/trkA, o que está em linha com os resultados encontrados nas células SH-SY5Y. Por outro lado, estudos tem demonstrado redução dos níveis de NGF circulantes tanto em modelos animais de neuropatia periférica, como também em pacientes sob quimioterapia que apresentam déficits neurológicos (DE SANTIS et al., 2000; CAVALETTI et al., 2002). Um estudo com ratos demonstrou que a cisplatina reduz os níveis de NGF em vários órgãos periféricos produtores de NGF e que, a administração exógena de NGF restaurou os déficits neurológicos induzidos pela cisplatina nesses animais (ALOE et al., 2000). Analisados em conjunto, os resultados de nosso estudo e os anteriores sugerem que a cisplatina afeta a síntese e a disponibilidade do NGF em estágios mais avançados do processo neurotóxico, quando os déficits neurológicos já estão em curso, mas não nos estágios iniciais. É possível que a diminuição do NGF resulte da ação da cisplatina no DNA (ALOE et al., 2000), evento que provavelmente ocorre após o dano axonal. Outra explicação é que os tecidos periféricos produtores de NGF sejam mais susceptíveis à ligação cisplatina-

DNA do que os neurônios (CAVALETTI et al., 2002) ou modelos neuronais, como as células PC12.

Embora a cisplatina não altere os níveis de NGF nas fases iniciais da neurotoxicidade, é possível que as proteínas relacionadas à neuroplasticidade sejam afetadas pela cisplatina, em um processo não mediado pelo NGF. Para investigar tal hipótese, avaliamos o efeito da cisplatina na expressão de três proteínas neuronais relacionadas ao crescimento axonal (GAP-43) e à comunicação sináptica (sinapsina I e sinapotofisina). A cisplatina reduziu a expressão das três proteínas. A proteína associada ao crescimento (GAP- 43) é o principal constituinte do cone de crescimento, que é responsável por orientar o crescimento dos axônios e modular a formação de novas conexões (BENOWITZ; ROUTTENBERG, 1997). A sinapsina I e sinaptofisina são proteínas localizadas na membrana pré-sináptica e utilizadas como marcadores moleculares de maturação do terminal nervoso e sinaptogênese, respectivamente (BERGMANN et al., 1991; DAS; FREUDENRICH; MUNDY, 2004). Pouco se sabe sobre a neuroplasticidade do sistema periférico (GEUNA et al., 2010; RAY, 2015) e sobre os efeitos da cisplatina nas proteínas axonais. Os resultados do presente estudo sugerem que o comprometimento da plasticidade axonal pela cisplatina pode ter implicações no desenvolvimento e progressão da neuropatia periférica.

As proteínas constituintes do citoesqueleto também desempenham papel importante na neuroplasticidade axonal. A organização estrutural e a remodelação dinâmica do citoesqueleto neuronal são fatores essenciais que contribuem para diversas modificações sofridas pelas células neuronais durante o desenvolvimento, como migração, formação de axônios e dendritos e estabelecimento de comunicações sinápticas (KAPITEIN; HOOGENRAAD, 2015). No presente estudo foi demonstrado o efeito da cisplatina na regulação negativa das seguintes proteínas do citoesqueleto: NF-200, β-III tubulina e F-actina. Existe uma relação direta entre o crescimento de neuritos e a densidade das proteínas dos neurofilamentos, como por exemplo, NF-200 (FLASKOS et al., 1999). No sistema nervoso, a rede de microtúbulos, formada por tubulinas, incluindo a β-III tubulina, é o principal componente estrutural e funcional do citoesqueleto axonal, constituindo a base para o transporte axonal anterógrado e retrógrado (MILLER; LASEK, 1985). Segundo Boekelheide, Arcila e Eveleth (1992), a cisplatina causa uma modificação direta nas tubulinas alterando a dinâmica de montagem da estrutura de microtúbulos axonais, anormalidade que pode contribuir para a neuropatia periférica induzida pela cisplatina (BOEKELHEIDE; ARCILA;

EVELETH, 1992), o que está em linha com os resultados do presente estudo. Ainda em linha com nossos achados, vários estudos demonstraram que baixas concentrações de cisplatina inibem principalmente a polimerização da actina, enquanto altas concentrações induzem alteração conformacional da F-actina, por meio da ligação ao enxofre da metionina (ZENG; LU; WANG, 1995; ZENG et al., 1996; ZENG; XU; WANG, 1997). A F-actina é um dos constituintes mais abundantes do citoesqueleto neuronal, estando envolvida na extensão e manutenção dos neuritos (CARLSON; EHRICH, 2001). Sendo assim, o efeito inibitório da cisplatina sobre a diferenciação celular parece estar associado, dentre outros eventos, aos efeitos sobre as proteínas do citoesqueleto, com reflexos na manutenção e extensão dos neuritos (precursores axonais), bem como no transporte axonal e, consequentemente, na comunicação sináptica.

Além de ser responsável pelas características estruturais dos neurônios, o citoesqueleto também dá suporte a vários processos funcionais, como por exemplo, o transporte axonal (PRIOR et al., 2017), o qual é essencial para a distribuição de vesículas, de organelas e de moléculas de sinalização ao longo dos axônios para controlar a polarização, o alongamento dos axônios e as funções sinápticas (CHIA; LI; SHEN, 2013; MAEDER; SHEN; HOOGENRAAD, 2014). O transporte ao longo do axônio é realizado por proteínas motoras dependentes de energia, as quais possuem um domínio motor altamente conservado que se associa ao citoesqueleto e se liga ao ATP, necessário para a geração de energia (KEVENAAR; HOOGENRAAD, 2015). Alterações no metabolismo energético podem levar à desregulação das proteínas motoras e reguladoras, com consequente disfunção e degeneração do citoesqueleto, (MELLI et al., 2008). A glicose é a principal fonte de energia celular e o sistema nervoso, em particular, requer um suprimento contínuo de glicose para suportar sua alta demanda energética e manter a homeostase metabólica (VERBERNE; SABETGHADAM; KORIM, 2014). No presente estudo foi demonstrado que a cisplatina diminui a captação de glicose das células PC12 após 72 horas de incubação, condição na qual a cisplatina também diminui a diferenciação celular. A interferência no metabolismo da glicose e no metabolismo energético celular tem sido apontados como mecanismos relevantes da toxicidade da cisplatina (MACCIO; MADEDDU, 2013), porém pouco se sabe a respeito deste mecanismo e, principalmente, como as alterações na captação da glicose afetam as funções neurológicas. As alterações induzidas pela cisplatina nos microtúbulos e nos

filamentos de actina do citoesqueleto talvez possam explicar a redução na captação da glicose observada após o tratamento com a cisplatina, uma vez que, a captação da glicose pelas proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) parecem ser dependentes dos filamentos de actina do citoesqueleto (BUNN; JENSEN; REED, 1999). Zhang e Ismail-Beigi (1998) demonstraram que a atividade dos transportadores de glicose 1 (GLUT1) são regulados pelos filamentos de actina do citoesqueleto (ZHANG; ISMAIL-BEIGI, 1998). Então, qualquer alteração na funcionalidade dos processos celulares que dependam da dinâmica dos filamentos de actina e dos microtúbulos, podem afetar a captação de glicose pelas células.

O desenvolvimento de resistência à cisplatina tem sido associado a expressão reduzida dos GLUT1 em células cancerígenas, as quais apresentaram redução na captação da glicose (LIANG et al., 2008). A redução na captação da glicose relatada por Egawa-Takata et al. (2010) ocorreu independentemente da alteração de outras funções celulares, como a integridade da membrana e função mitocondrial. Porém, foi relatado uma rápida modificação na distribuição do GLUT1 depois do tratamento com a cisplatina, sugerindo a ligação da cisplatina às tubulinas e a consequente inibição do transporte de GLUT1 para a membrana plasmática (EGAWA-TAKATA et al., 2010). Tais observações suportam os resultados do presente estudo, uma vez que, as alterações induzidas pela cisplatina (5 µM) sobre os elementos do citoesqueleto (filamentos de actina e β-III tubulina) podem ter contribuído para a redução na captação da glicose e, portanto, a captação da glicose pode ser afetada pela cisplatina antes da ligação ao DNA mitocondrial e nuclear e subsequentes dano mitocondrial e apoptose neuronal.

Fluxo de energia constante é um fator crucial para a sobrevivência de todas as células, particularmente para os neurônios, uma vez que possuem uma demanda metabólica alta e baixa capacidade de armazenamento de nutrientes, sendo, portanto, extremamente sensíveis às flutuações de energia (SPASIC; CALLAERTS; NORGA, 2009). A proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) detecta e mantém o equilíbrio energético nos tecidos periféricos. No cérebro, a AMPK está envolvida tanto nos processos fisiológicos (fornecimento), como nos processos patológicos (isquêmicos), sendo que neste último, a AMPK é altamente ativada para restaurar o equilíbrio energético neuronal. Quando a energia é deficiente, a ativação da AMPK leva à alterações do metabolismo celular e na expressão gênica a fim de

inibir os processos anabólicos, estimular o catabolismo e restaurar o ATP (RONNETT et al., 2009).

A regulação da homeostase da glicose por diversos compostos tem sido atribuída, principalmente, à ativação e fosforilação da AMPK (HWANG; KWON; YOON, 2009). Uma vez que a cisplatina reduziu a captação da glicose em células PC12, foi investigado se tal efeito poderia ser refletido na expressão das proteínas relacionadas ao estado energético celular. Após o tratamento das células com 5 µM de cisplatina, foi observada redução na expressão da AMPK α e também da fosfo-AMPK α, que representa a forma ativa da AMPK. Em concordância com estes resultados, outro estudo demonstrou a interferência da cisplatina em várias vias de sinalização celular, incluindo a p53, mTOR e a AMPK (WILMES et al., 2015).

Outras proteína também reconhecidas como reguladoras cruciais do metabolismo energético são as pertencentes à família das sirtuinas (LI, 2013). Entre as sete sirtuinas codificadas no genoma (FRYE, 2000), a SIRT1 é a mais evolutivamente conservada (LI, 2013). As SIRT1 são proteínas desacetilases dependentes de NAD^+, cujas funções são intrinsicamente associadas ao metabolismo celular, assim como à proteção das células contra o estresse metabólico. A versatilidade das funções da SIRT1 ocorre devido à sua localização celular diversa, permitindo que as células detectem as mudanças energéticas no núcleo, citoplasma e mitocôndrias (CHANG; GUARENTE, 2014).

Estudos tem demonstrado a contribuição da SIRT1 para a resistência à cisplatina em células cancerosas. A incubação das células sensíveis à cisplatina em um meio contendo baixa concentração de glicose, induziu a expressão de SIRT1 e aumentou a resistência celular à cisplatina. As células resistentes apresentaram redução na captação da glicose devido as alterações morfológicas e funcionais das mitocôndrias em comparação às células sensíveis (LIANG et al., 2008). Aumento da expressão de SIRT1 parece ser uma característica das células resistentes à cisplatina. Kim et al. (2011) demonstraram redução na expressão de SIRT1 induzida pela cisplatina no túbulo proximal de ratos. No presente estudo também foi observada redução na expressão de SIRT1 induzida pela cisplatina. Desta forma, tais resultados sugerem que as proteínas AMPK α, fosfo-AMPK α e SIRT1 são alvos da cisplatina, sendo que a regulação negativa destas proteínas poderia estar associada ao desenvolvimento da neurotoxicidade.

O envolvimento da excitotoxicidade do glutamato em várias patologias neurológicas crônicas e agudas tem sido abordado em diversos estudos. Sabe-se que o excesso de glutamato frequentemente está associado com à neurotoxicidade, com a lesão e morte neuronal, tanto no SNC como no SNP e, consequentemente, também está implicado em uma série de desordens neurológicas, incluindo as neuropatias periféricas (WATKINS, 2000; CAROZZI et al., 2010). O excesso de glutamato liberado, as disfunções nos receptores e os prejuízos na captação mediado pelas alterações na função ou na expressão dos transportadores, estão entre os principais mecanismos envolvidos nas disfunções neurológicas a nível do SNC, no entanto, há uma escassez de informações a respeito das funções glutamatérgicas no sistema nervoso periférico (CAROZZI et al., 2008).

No âmbito da neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina, pouco se sabe a respeito do envolvimento do glutamato no mecanismo de neurotoxicidade. Achados na literatura demonstraram que a cisplatina promove alteração na expressão das moléculas relacionadas à sinalização do glutamato, como exemplo, a redução na concentração de magnésio, o qual foi atribuído ao aumento dos sintomas nociceptivos reportados pelos pacientes. A redução da concentração de magnésio levou a uma diminuição da ligação ao receptor NMDA (receptor ionotrópico do glutamato) e consequentemente, aumentou a taxa de ligação do glutamato ao seu receptor, alterando a resposta glutamatérgica (AUTHIER et al., 2003a). Adicionalmente, foi demonstrado que a inibição farmacológica da enzima glutamato carboxipeptidase II (GCPII) representa uma medida de neuroproteção contra a neurotoxicidade periférica induzida pela cisplatina (CAROZZI et al., 2010), porém, não se tem informações a respeito da ação da cisplatina sobre os transportadores de glutamato.

Sendo assim, para investigar o possível efeito da cisplatina sobre os transportadores de glutamato, inicialmente, foi realizada a transfecção dos transportadores em células COS-7. Um dos objetivos da transfecção consiste no estudo do efeito de drogas sob uma proteína específica, a qual é transfectada nas células, que por sua vez, passam a expressá-las em altas quantidades. No entanto, em nossos estudos, verificamos que a transfecção do tipo transiente não é a mais adequada para avaliar o efeito de longas exposições, uma vez que, neste tipo de transfecção, a expressão máxima do DNA transfectado geralmente ocorre por volta de 48 horas após a transfecção, e a presença da cisplatina interferiu nesse processo. Dessa forma, o efeito da cisplatina sobre os transportadores de glutamato foi avaliado

em células com transfecção estável (HEK) e em astrócitos, os quais expressam os transportadores endógenos.

Os transportadores aminoácidos excitatórios presentes na membrana plasmática são responsáveis por regular e modular a neurotransmissão do glutamato sendo, portanto, transportadores essenciais para manter a baixa concentração extracelular do glutamato e prevenir a neurotoxicidade (DANBOLT, 2001). Já foram clonados e caracterizados 5 subtipos de transportadores de glutamato sódio-dependentes (AMARA; FONTANA, 2002). No SNC, o EAAT2 é o subtipo de transportador de glutamato predominante (FONTANA, 2015) e é principalmente expresso em células astrogliais (LEHRE et al., 1995). Em relação ao sistema nervoso periférico, foi demonstrado que os transportadores EAAT1/GLAST, EAAT2/GLT1 e EAAT3/EAAC1, bem como a enzima GCPII estão presentes nos gânglios da raiz dorsal (GRD) e no nervo ciático. No GRD, foi observado que as células satélites possuem os transportadores EAAT2, enquanto os neurônios sensoriais, possuem os EAAT3. EAAT1 foi localizado tanto nos neurônios como nas células satélites (CAROZZI et al., 2008).

Os ensaios realizados nas células HEK e nos astrócitos revelaram que a cisplatina inibiu a captação do glutamato via EAAT2, porém, de maneira não específica e somente em concentrações muito superiores à concentração que inibe a diferenciação nas células PC12 (5 µM) e também superiores à IC_{50} (32 µM) para citotoxicidade, considerando-se o mesmo tempo de exposição (72 horas). Sendo assim, tais resultados sugerem que somente a inibição via EAAT2 não é suficiente para explicar os efeitos da cisplatina sobre a captação do glutamato, sugerindo a participação de outros processos na inibição da captação. Ainda, a excitotoxicidade não está envolvida nos mecanismos precoces da neurotoxicidade da cisplatina associados ao dano axonal.

Estudos tem demonstrado o efeito protetor do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) contra a toxicidade induzida por diferentes compostos, inclusive contra a nefrotoxicidade e a ototoxicidade induzida pela cisplatina (KIZILAY et al., 2004; OZEN et al., 2004), porém, todos eles são atribuídos às suas propriedades antioxidantes. Em contrapartida, existem poucos estudos que avaliam o potencial neurotrófico do CAPE como um possível mecanismo de neuroproteção. Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram que a atividade neurotrófica do CAPE está envolvida na neuroproteção observada em modelos *in vivo* e *in vitro* expostos a neurotoxinas

dopaminérgicas associadas ao Parkinson (SILVA et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Sendo assim, o presente estudo foi projetado para avaliar o potencial efeito neuroprotetor do CAPE contra a neurotoxicidade induzida pela cisplatina. Para tal propósito, foi avaliado o efeito protetor do CAPE sobre a diferenciação celular, a expressão de proteínas relacionadas à neuroplasticidade axonal, citoesqueleto e bioenergética celular, além da captação da glicose em células PC12 tratadas com cisplatina 5 µM. Adicionalmente, foi investigado o envolvimento do NGF e das vias de sinalização neurotrófica, NGF/trkA, MAPK/Erk e PI3K/Akt, no mecanismo de neuroproteção do CAPE. Para investigar o envolvimento de outros receptores neurotóficos além do trkA, foi avaliado o efeito do CAPE sobre a diferenciação celular utilizando um outro modelo neuronal, as células SH-SY5Y, que, diferentemente das células PC12, expressa receptores neurotróficos trkB.

Com o intuito de selecionar uma concentração eficaz de CAPE contra os efeitos tóxicos induzidos pela cisplatina, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de CAPE (1 – 50 µM) sobre a diferenciação celular e viabilidade das células PC12 expostas à cisplatina. A concentração de cisplatina utilizada nos ensaios de diferenciação foi de 5 µM. Todas as concentrações de CAPE testadas eficientemente aumentaram a diferenciação das células PC12, no entanto, CAPE 10 µM foi a menor concentração que mostrou habilidade em minimizar a inibição da diferenciação celular induzida pela cisplatina. Uma vez que a concentração de trabalho da cisplatina (5 µM) não induziu morte celular, foi utilizado a IC_{50} da cisplatina (32 µM) para investigar o papel protetor do CAPE contra a morte celular induzida pela cisplatina. Nas concentrações de 1 e 5 µM, CAPE não foi eficaz em proteger as células PC12, no entanto, a partir de 10 µM, CAPE preveniu a morte celular induzida pela cisplatina. Em outro estudo de nosso laboratório foi demonstrado que a mesma concentração de CAPE protegeu contra a inibição da neuritogênese induzida pelo MPP^+, uma neurotoxina dopaminérgica que induz Parkinsonismo *in vivo* (SANTOS et al., 2014). Em conjunto, esses resultados demonstram que o CAPE 10 µM possui efeito protetor contra os efeitos tóxicos induzidos pela cisplatina e, portanto, esta concentração foi utilizada nos ensaios de neuroproteção.

Como o CAPE minimizou o efeito inibitório da cisplatina sobre a diferenciação celular, investigou-se o envolvimento das proteínas relacionadas à neuroplasticidade axonal nesse mecanismo. Foi avaliado o efeito do CAPE sobre as proteínas associadas ao crescimento axonal (GAP-43) e à comunicação sináptica (sinapsina I e

sinaptofisina) em células PC12 expostas à 5 µM de cisplatina. O efeito protetor do CAPE 10 µM foi confirmado, uma vez que, ele minimizou a regulação negativa induzida pela cisplatina na expressão destas proteínas. Achados anteriores de nosso laboratório demonstraram que o CAPE é capaz de induzir neuritogênese e aumentar a expressão de proteínas axonais em células PC12 não estimuladas pelo NGF (SANTOS et al., 2014).

Foram também avaliados os efeitos do CAPE sobre a expressão das proteínas relacionadas ao citoesqueleto. Os neurofilamentos (NF-200) são os principais componentes do citoesqueleto das células neuronais e fornecem suporte específico para o desenvolvimento dos neuritos (MURPHY et al., 1993; SCHIMMELPFENG; WEIBEZAHN; DERTINGER, 2004). O CAPE minimizou a redução na densidade do neurofilamento NF-200 induzida pela cisplatina. Além disso, o CAPE 10 µM aumentou a densidade de NF-200 em células PC-12 não estimuladas pelo NGF. Em relação à expressão da β-III tubulina e da F-actina, o efeito protetor do CAPE mais uma vez foi observado, visto que ele minimizou a regulação negativa induzida pela cisplatina nestes elementos do citoesqueleto. Adicionalmente, a análise do efeito intrínseco revelou que o CAPE quase dobrou a expressão de ambas proteínas em relação ao controle, porém não foi observado efeito do NGF sobre a expressão destas proteínas em relação ao controle após exposição por 72 horas. É possível que o efeito do NGF somente ocorra após período mais longo de incubação, como o reportado em outro estudo, no qual o NGF aumenta a expressão da F-actina e da β-III-tubulina em células PC-12 após 7 dias de incubação (MENG et al., 2013).

Em conjunto, estes resultados sugerem que o CAPE não apenas induz a formação e extensão dos neuritos via regulação positiva das proteínas GAP-43 e F-actina, como também induz formação das vesículas sinápticas e tem efeito benéfico sobre o transporte axonal via regulação positiva das proteínas sinapsina I, sinaptofisina e β-III tubulina.

Nossos resultados sugerem que a cisplatina não exerce seu efeito neurotóxico interferindo na via de sinalização neurotrófica ativada pelo NGF/trkA, contudo é possível que o CAPE exerça seu efeito neurotrófico mimetizando a ação do NGF sobre essa via de sinalização. Então, foi investigada a ativação dos receptores trkA pelo CAPE, expondo as células PC-12 ao K252a, um antagonista destes receptores de alta afinidade pelo NGF (PHAN et al., 2014). O NGF inicia sua atividade biológica após a ligação aos receptores trkA (HUANG; REICHARDT, 2003) e as células PC12

constituem um modelo bem estabelecido para o estudo da função destes receptores (TSOULFAS et al., 1996), uma vez que os expressam naturalmente e respondem à estimulação do NGF, paralisando a divisão, estendendo neuritos e se diferenciando (HUANG; REICHARDT, 2001; VAUDRY et al., 2002; CALABRESE, 2008). O K252a reduziu o efeito neuritogênico do NGF após 72 horas de incubação e do CAPE somente após 96 horas de incubação, sugerindo que embora o CAPE mimetize o efeito do NGF sobre estes receptores, existem diferenças na afinidade de ambos, isto é, talvez a afinidade do CAPE seja maior do que a do NGF e o seu deslocamento pelo antagonista K-252a demore mais para ocorrer. No entanto, tal resultado não exclui a possibilidade de envolvimento de outros receptores. Para investigar tal hipótese, foram utilizadas as células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, que expressam receptores neurotróficos de alta afinidade para o BDNF, os receptores trkB. De acordo com os resultados, o CAPE não induziu diferenciação nestas células. A diferença de fenótipos entre as células PC12 e as células SH-SY5Y pode ter contribuído para os diferentes efeitos do CAPE em ambas linhagens celulares. As células SH-SY5Y apresentam baixa ou nenhuma expressão dos receptores trkA (EDSJO et al., 2001), no entanto, o tratamento com ácido retinóico induz a expressão dos receptores trkB (KAPLAN et al., 1993). Além de não induzir a diferenciação celular, o CAPE reduziu a neuritogênese induzida pelo ácido retinóico, sugerindo inibição da atividade do ácido retinóico sobre os receptores trkB. Em concordância com nossos resultados, outro estudo demonstrou que o CAPE reduziu a expressão da proteína GAP-43 e inibiu o crescimento de neuritos em células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico (KIM; YOO, 2016). Por outro lado, outro estudo relatou o efeito protetor do CAPE contra a morte dos neurônios dopaminérgicos em modelos de Parkinson, através do aumento da expressão de BDNF (KURAUCHI et al., 2012), neurotrofina ligante dos receptores trkB. Porém, o BDNF também pode se ligar aos receptores $p75^{NTR}$, os quais são conhecidos por provocar a morte celular, mas também promovem a sobrevivência celular. A ligação da neurotrofina ao receptor $p75^{NTR}$ promove a sobrevivência neuronal através da via de sinalização ativada pelo fator nuclear-κB (NF-KB) (DECHANT; BARDE, 2002; LONGO; MASSA, 2013). Então, a proteção observada neste modelo pode não estar associada à ação neurotrófica do BDNF sobre os receptores trkB, mas à sua ação sobre os receptores $p75^{NTR}$.

A ativação dos receptores tirosina quinases (trk) pelas neurotrofinas promove a dimerização dos receptores (AREVALO et al., 2000). Consequentemente, a

autofosforilação dos receptores trk em múltiplos resíduos de tirosina induz o recrutamento de diversos componentes de sinalização intracelular e a ativação das vias subsequentes (HUANG; REICHARDT, 2003; REICHARDT, 2006). A multiplicidade de locais de fosforilação nos receptores trk cria diferentes oportunidades de padrão de fosforilação, resultando a ativação de diferentes vias de sinalização intracelular (LONGO; MASSA, 2013). Por exemplo, em relação ao trkA, a fosforilação do Tyr490 está associada com a ativação das vias MAPK/Erk e PI3K/Akt (HUANG; REICHARDT, 2003; REICHARDT, 2006). A ativação da cascata de sinalização MAPK-Erk é essencial para a indução da diferenciação dos neurônios e das células PC-12 (HUANG; REICHARDT, 2003). A ativação da MAPK/Erk mediada pelo NGF induz a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), aumentando ainda mais a atividade de genes codificadores ou de microRNAs associados à diferenciação neuronal, formação de sinapses, plasticidade sináptica e memória ao longo prazo (MARSHALL, 1995; BOSS et al., 2001; WAYMAN et al., 2008). Além da via MAPK/Erk, a ativação do CREB induz também a ativação de outras cascatas de sinalização, incluindo a proteína quinase A dependente de AMPc (PKA), proteína quinase C (PKC), proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/Akt) (MIYAMOTO, 2006).

A via de sinalização PI3K/Akt é a principal via reguladora de sobrevivência neuronal (KAPLAN; MILLER, 2000). PI3K estimula a atividade de várias proteínas de sinalização, dentre elas, a serina/treonina quinase Akt. Akt não é apenas responsável por mediar a sobrevivência celular regulada por fatores de crescimento, mas também a sobrevivência neuronal promovida pela despolarização (BLAIR et al., 1999; CROWDER; FREEMAN, 1999; KAPLAN; MILLER, 2000). O papel da via PI3K/Akt na regulação da sobrevivência celular foi demonstrado por diversos estudos, os quais comprovaram que a inibição da atividade da quinase PI3K induziu apoptose em células PC-12 e em neurônios simpáticos na presença de NGF. Além disso, foi relatado que a superexpressão de Akt em culturas primárias de neurônios cerebelares ou de neurônios simpáticos fornece proteção contra a morte celular induzida pela privação de soro ou pela inibição da quinase PI3K, enquanto que a expressão de mutantes negativos dominantes de Akt bloqueiam a sobrevivência neuronal mediada pelo NGF (YAO; COOPER, 1995; DUDEK et al., 1997; CROWDER; FREEMAN, 1998; SOFRONIEW; HOWE; MOBLEY, 2001).

Então, devido ao papel fundamental das vias MAPK/Erk e PI3K/Akt no efeito neurotrófico e na sobrevivência neuronal, o seu envolvimento no mecanismo de neuroproteção do CAPE também foi investigado neste estudo. Para tal, as células foram previamente tratadas, por 1 hora, com um dos inibidores específicos das referidas vias de sinalização, seguido pelo tratamento com CAPE e NGF. O primeiro deles, o LY294002, é um inibidor específico do Akt, o qual é amplamente utilizado para o estudo das vias PI3K/Akt. O segundo inibidor, U0126, é seletivo para MAPK quinase (PHAN et al., 2014). Ambos inibidores reduziram a neuritogênese induzida pelo CAPE e pelo NGF. Tais resultados claramente sugerem o envolvimento das vias MAPK/ Erk e PI3K/Akt no mecanismo neurotrófico e neuroprotetor do CAPE.

Uma vez constatado o envolvimento da via de sinalização neurotrófica trkA, MAPK/Erk e PI3K/Akt no mecanismo de neuroproteção do CAPE, tornou-se necessário investigar a participação do próprio NGF nesse mecanismo. Para tal propósito, avaliou-se o efeito da associação de CAPE + NGF na diferenciação celular e na expressão de proteínas axonais (GAP-43, sinapsina e sinaptofisina) das células PC12. A associação de CAPE + NGF não induziu aumento significativo na porcentagem de células diferenciadas e nem na expressão das proteínas axonais em relação ao efeito do CAPE sozinho. Tais resultados sugerem que o efeito neuritogênico do CAPE não é aditivo ao efeito do NGF.

Nossos resultados indicam que o efeito neurotrófico do CAPE envolve ativação dos receptores trkA, o que poderia ocorrer por efeito direto do CAPE sobre o receptor ou indiretamente através do aumento da expressão do NGF. Contudo, a análise da concentração intracelular de NGF por ELISA demonstrou que o CAPE não altera os níveis de NGF. Sendo assim, tais resultados sugerem o CAPE seja capaz de ativar por si só a mesma via de sinalização neurotrófica que o NGF, e que esse efeito independe do NGF.

Recentemente, foi demonstrada a participação das vias de sinalização MAPK/ Erk e PI3K/Akt no mecanismo de proteção exercido pelo CAPE contra a degeneração neuronal no hipocampo de ratos neonatais expostos ao sevoflurano, um anestésico volátil de uso pediátrico (WANG; TANG; HAN, 2016). O CAPE também foi capaz de atenuar as respostas pró-inflamatórias induzidas por lipopolisacarídeo (LPS) nos fibroblastos gengivais humanos via NF-kB e PI3K/Akt (LI et al., 2017). Adicionalmente, Lee et al. (2007) demonstraram que o CAPE estimula a captação da glicose em

células musculares esqueléticas através da ativação da via PI3K/Akt e da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (LEE et al., 2007).

No presente estudo também foi investigado o efeito do CAPE na expressão das proteínas relacionadas ao estado celular energético, AMPK α e de sua forma ativa, fosfo-AMPK α. Foi observado aumento na expressão da forma ativa após o tratamento com o CAPE. Além disso, o CAPE também atenuou a regulação negativa induzida pela cisplatina em ambas proteínas. Em concordância com tais resultados, foi demonstrado que o CAPE aumenta a fosforilação da AMPK α, exercendo efeitos protetores e anti-inflamatórios nas células microgliais (TSAI et al., 2015). AMPK é um sensor energético intracelular que desempenha um papel central na regulação do metabolismo da glicose (HARDIE; CARLING, 1997). Embora em nosso estudo, o CAPE tenha promovido a ativação da AMPK α nas células PC12, ele não induziu aumento da captação da glicose, nem protegeu contra a redução na captação de glicose induzida pela cisplatina.

Uma vez que a distribuição dos transportadores de glicose (GLUT) na superfície celular tem um grande impacto na captação da glicose (HEATHER WEST GREENLEE et al., 2003), a incapacidade do CAPE em aumentar a captação da glicose nas células PC12 pode estar relacionada às diferenças nos subtipos dos transportadores nos diferentes modelos celulares. A captação de glicose neuronal se faz através do GLUT3 (HEATHER WEST GREENLEE et al., 2003). Tanto nas células neuronais, como nas células PC12, a isoforma GLUT3 está presente em pequenas vesículas, as quais possuem muitas proteínas vesiculares em comum com as vesículas sinápticas (THOIDIS et al., 1999). Foi demonstrado que as células PC12 diferenciadas na presença do NGF apresentaram aumento drástico nos níveis de transportadores de glicose, especificamente o GLUT3 e GLUT1 (DWYER et al., 1998). A resposta neuronal ao NGF é acompanhada por um aumento rápido na utilização da glicose, o qual é um requisito essencial para sustentar a proliferação de neuritos (ANGELETTI et al., 1964). Como citado anteriormente, já foi relatado que o CAPE estimula a captação de glicose em células esqueléticas através da ativação da AMPK (LEE et al., 2007). Porém, nas células musculares esqueléticas, a captação de glicose é regulada pela AMPK através da ativação da translocação do GLUT4 dos agrupamentos intracelulares para a membrana plasmática (DEFRONZO; TRIPATHY, 2009). Outro estudo também demonstrou que o extrato de própolis promoveu a translocação do GLUT4 e captação da glicose nas células musculares esqueléticas

através da ativação tanto da via PI3K, como também da AMPK (UEDA; HAYASHIBARA; ASHIDA, 2013). Adicionalmente, outros dois derivados do ácido cafeico, o éster metil (CAME) e o éster etil (CAEE) do ácido cafeico, apresentaram mecanismo semelhante de translocação do GLUT4 e aumento da captação de glicose (EID et al., 2017). Sendo assim, talvez uma explicação para o fato do CAPE não ter aumentado a captação de glicose no nosso modelo seja a ausência de expressão dos transportadores GLUT4 nas células PC12.

Em relação à SIRT1, outra proteína associada ao estado energético celular, foram observados efeitos mais pronunciados do CAPE sobre sua expressão em células PC12. O CAPE aumentou aproximadamente 3 vezes, a expressão da SIRT1 em relação às células sem tratamento. Adicionalmente o CAPE também foi eficaz em atenuar a regulação negativa induzida pela cisplatina sobre a expressão da SIRT1. O aumento da expressão da SIRT1 induzido pelo CAPE também foi demonstrado em outros estudos. Vanella et al. (2016) demonstraram que o aumento na expressão de SIRT1 após o tratamento com o CAPE pode estar associado com a melhora da resistência à insulina e da tolerância à glicose, sugerindo que a administração de CAPE pode restaurar a função do adipócito após inflamação induzida pelo LPS (VANELLA et al., 2016). Adicionalmente, outro estudo sugeriu que o CAPE-oNO_2, um derivado do CAPE contendo o grupo nitro adicionado na posição orto, exerce efeito cardioprotetor contra a geração de ERO induzida pela isquemia/reperfusão miocárdica através da regulação da via SIRT1 e NF-kB, tanto *in vivo*, como *in vitro* (LI et al., 2018). Assim, diante destes resultados pode-se sugerir que a regulação positiva sobre a expressão da fosfo-AMPK α e da SIRT1 induzidas pelo CAPE podem estar envolvidas no seu mecanismo de neuroproteção.

6. CONCLUSÃO

Os efeitos neurotóxicos da cisplatina foram induzidos por uma concentração não citotóxica (5 µM), a qual foi capaz de inibir o crescimento de neuritos e reduzir a expressão das proteínas neuronais (GAP-43, sinapsina I e sinaptofisina) e do citoesqueleto (NF-200, β-III-tubulina e F-actina) em células PC12 sem induzir dano mitocondrial, apoptose e estresse oxidativo. Neste estágio, a neurotoxicidade da cisplatina não foi mediada pelo NGF e nem pelos receptores trkA, uma vez que a cisplatina não afetou a expressão de NGF nas células PC12, porém, reduziu o crescimento de neuritos nas células SH-SY5Y, sugerindo um mecanismo independente da via NGF/trkA. Sendo assim, a cisplatina pode afetar a plasticidade axonal antes do dano ao DNA, da regulação negativa da via NFG/trkA, do dano mitocondrial ou da apoptose neuronal. A diminuição da captação da glicose induzida pela cisplatina, pode estar associada à redução na expressão das proteínas relacionadas ao estado energético, sugerindo que a regulação negativa da AMPK α, da fosfo-AMPK α e da SIRT1 podem estar envolvidas no mecanismo de neurotoxicidade da cisplatina. A cisplatina também inibiu a captação do glutamato via EAAT2 de uma maneira não específica, ressaltando a necessidade de estudos mais detalhados, uma vez que outros processos podem ser modulados e participarem desta inibição.

O CAPE atenuou os efeitos inibitórios da cisplatina sobre a diferenciação celular, sobre os marcadores de neuroplasticidade axonal (GAP-43, sinapsina I e sinaptofisina), sobre as proteínas do citoesqueleto (NF-200, β-III-tubulina e F-actina) e também sobre os marcadores do perfil energético (AMPK α, da fosfo-AMPK α e da SIRT1). Adicionalmente, o CAPE aumentou a viabilidade das células PC12 expostas à IC_{50} da cisplatina. O mecanismo neuroprotetor do CAPE é independente e não aditivo ao efeito do NGF, pode envolver a ativação dos receptores trkA, bem como das vias de sinalização neurotrófica MAPK/Erk e PI3K/Akt. Tais resultados sugerem a contribuição da neuroplasticidade no mecanismo de neuroproteção do CAPE contra a neurotoxicidade induzida pela cisplatina, particularmente durante a fase inicial do processo, na qual ocorre o dano axonal. Portanto, o CAPE é um agente neuroprotetor promissor e a sua eficácia terapêutica na neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina deveria ser objeto de futuros estudos *in vivo* e ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

ABDUL MUNEER, P. M. et al. Ethanol impairs glucose uptake by human astrocytes and neurons: protective effects of acetyl-L-carnitine. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol,** v. 3, n. 1, p. 48-56, 2011.

ALBERS, J. W. et al. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD005228, 2014.

ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. Artmed 2010.

ALI, B. H.; AL MOUNDHRI, M. S. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. **Food Chem Toxicol,** v. 44, n. 8, p. 1173-83, Aug 2006.

ALLEN, S. J.; DAWBARN, D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. **Clin Sci (Lond),** v. 110, n. 2, p. 175-91, Feb 2006.

ALOE, L. et al. Evidence that nerve growth factor promotes the recovery of peripheral neuropathy induced in mice by cisplatin: behavioral, structural and biochemical analysis. **Auton Neurosci,** v. 86, n. 1-2, p. 84-93, Dec 28 2000.

ALOE, L. et al. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. **J Transl Med,** v. 10, p. 239, Nov 29 2012.

AMABLE, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. **Pharmacol Res,** v. 106, p. 27-36, Apr 2016.

AMARA, S. G.; FONTANA, A. C. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochem Int,** v. 41, n. 5, p. 313-8, Nov 2002.

AMPTOULACH, S.; TSAVARIS, N. Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. **Chemother Res Pract,** v. 2011, p. 843019, 2011.

ANGELETTI, P. U. et al. Effect of a Nerve Growth Factor on Glucose Metabolism by Sympathetic and Sensory Nerve Cells. **Biochim Biophys Acta,** v. 90, p. 445-50, Sep 4 1964.

ANJANEYULU, M.; BERENT-SPILLSON, A.; RUSSELL, J. W. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and diabetic neuropathy. **Curr Drug Targets,** v. 9, n. 1, p. 85-93, Jan 2008.

AREVALO, J. C. et al. TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. **Mol Cell Biol,** v. 20, n. 16, p. 5908-16, Aug 2000.

ARGYRIOU, A. A. et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. **Crit Rev Oncol Hematol,** v. 82, n. 1, p. 51-77, Apr 2012.

ARRIETA, O. et al. Retinoic acid increases tissue and plasma contents of nerve growth factor and prevents neuropathy in diabetic mice. **Eur J Clin Invest,** v. 35, n. 3, p. 201-7, Mar 2005.

AUTHIER, N. et al. An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. **Exp Neurol,** v. 182, n. 1, p. 12-20, Jul 2003a.

_____. A new animal model of vincristine-induced nociceptive peripheral neuropathy. **Neurotoxicology,** v. 24, n. 6, p. 797-805, Dec 2003b.

AVAN, A. et al. Platinum-induced neurotoxicity and preventive strategies: past, present, and future. **Oncologist,** v. 20, n. 4, p. 411-32, Apr 2015.

BEART, P. M.; O'SHEA, R. D. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. **Br J Pharmacol,** v. 150, n. 1, p. 5-17, Jan 2007.

BENOWITZ, L. I.; ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. **Trends Neurosci,** v. 20, n. 2, p. 84-91, Feb 1997.

BERGLES, D. E. et al. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. **Nature,** v. 405, n. 6783, p. 187-91, May 11 2000.

BERGMANN, M. et al. Expression of synaptophysin during the prenatal development of the rat spinal cord: correlation with basic differentiation processes of neurons. **Neuroscience,** v. 42, n. 2, p. 569-82, 1991.

BERNHARDSON, B. M.; TISHELMAN, C.; RUTQVIST, L. E. Chemosensory changes experienced by patients undergoing cancer chemotherapy: a qualitative interview study. **J Pain Symptom Manage,** v. 34, n. 4, p. 403-12, Oct 2007.

BINKS, S. P.; DOBROTA, M. Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. **Biochem Pharmacol,** v. 40, n. 6, p. 1329-36, Sep 15 1990.

BLAIR, L. A. et al. Akt-dependent potentiation of L channels by insulin-like growth factor-1 is required for neuronal survival. **J Neurosci,** v. 19, n. 6, p. 1940-51, Mar 15 1999.

BOEKELHEIDE, K.; ARCILA, M. E.; EVELETH, J. cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) alters microtubule assembly dynamics. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 116, n. 1, p. 146-51, Sep 1992.

BOSS, V. et al. Nerve growth factor, but not epidermal growth factor, increases Fra-2 expression and alters Fra-2/JunD binding to AP-1 and CREB binding elements in pheochromocytoma (PC12) cells. **J Neurosci,** v. 21, n. 1, p. 18-26, Jan 1 2001.

BOTTONE, M. G. et al. Cell proliferation, apoptosis and mitochondrial damage in rat B50 neuronal cells after cisplatin treatment. **Cell Prolif,** v. 41, n. 3, p. 506-20, Jun 2008.

BRADKE, F.; DOTTI, C. G. Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. **Neuron,** v. 19, n. 6, p. 1175-86, Dec 1997.

BROUWERS, E. E. et al. Persistent neuropathy after treatment with cisplatin and oxaliplatin. **Acta Oncol,** v. 48, n. 6, p. 832-41, 2009.

BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BUNN, R. C.; JENSEN, M. A.; REED, B. C. Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton. **Mol Biol Cell,** v. 10, n. 4, p. 819-32, Apr 1999.

BURSTYN, J. N. et al. Formation of cis-diamminedichloroplatinum(II) 1,2-intrastrand cross-links on DNA is flanking-sequence independent. **Nucleic Acids Res,** v. 28, n. 21, p. 4237-43, Nov 1 2000.

CALABRESE, E. J. Enhancing and regulating neurite outgrowth. **Crit Rev Toxicol,** v. 38, n. 4, p. 391-418, 2008.

CAMINITI, S. P. et al. Axonal damage and loss of connectivity in nigrostriatal and mesolimbic dopamine pathways in early Parkinson's disease. **Neuroimage Clin,** v. 14, p. 734-740, 2017.

CANTA, A.; POZZI, E.; CAROZZI, V. A. Mitochondrial Dysfunction in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). **Toxics,** v. 3, n. 2, p. 198-223, Jun 5 2015.

CARLSON, K.; EHRICH, M. Organophosphorus compounds alter intracellular F-actin content in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Neurotoxicology,** v. 22, n. 6, p. 819-27, Dec 2001.

CAROZZI, V.; MARMIROLI, P.; CAVALETTI, G. Focus on the role of Glutamate in the pathology of the peripheral nervous system. **CNS Neurol Disord Drug Targets,** v. 7, n. 4, p. 348-60, Oct 2008.

CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neurosci Lett,** v. 596, p. 90-107, Jun 2 2015.

CAROZZI, V. A. et al. Expression and distribution of 'high affinity' glutamate transporters GLT1, GLAST, EAAC1 and of GCPII in the rat peripheral nervous system. **J Anat,** v. 213, n. 5, p. 539-46, Nov 2008.

CAROZZI, V. A.; CERESA, C. The role of glutamate in diabetic and in chemotherapy induced peripheral neuropathies and its regulation by glutamate carboxypeptidase II. **Curr Med Chem,** v. 19, n. 9, p. 1261-8, 2012.

CAROZZI, V. A. et al. Glutamate carboxypeptidase inhibition reduces the severity of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in rat. **Neurotox Res,** v. 17, n. 4, p. 380-91, May 2010.

CAROZZI, V. A. et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in immune-deficient mice: new useful ready-to-use animal models. **Exp Neurol,** v. 264, p. 92-102, Feb 2015.

CAROZZI, V. A.; MARMIROLI, P.; CAVALETTI, G. The role of oxidative stress and anti-oxidant treatment in platinum-induced peripheral neurotoxicity. **Curr Cancer Drug Targets,** v. 10, n. 7, p. 670-82, Nov 2010.

CASCINU, S. et al. Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Clin Oncol,** v. 20, n. 16, p. 3478-83, Aug 15 2002.

CASSON, R. J. et al. Translational neuroprotection research in glaucoma: a review of definitions and principles. **Clin Exp Ophthalmol,** v. 40, n. 4, p. 350-7, May-Jun 2012.

CAVALETTI, G. et al. Chemotherapy-induced neuropathy. **Curr Treat Options Neurol,** v. 13, n. 2, p. 180-90, Apr 2011.

CAVALETTI, G. et al. Early predictors of peripheral neurotoxicity in cisplatin and paclitaxel combination chemotherapy. **Ann Oncol,** v. 15, n. 9, p. 1439-42, Sep 2004.

CAVALETTI, G. et al. Cisplatin-induced peripheral neurotoxicity in rats reduces the circulating levels of nerve growth factor. **Neurosci Lett,** v. 322, n. 2, p. 103-6, Apr 5 2002.

CEPEDA, V. et al. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anticancer Agents Med Chem,** v. 7, n. 1, p. 3-18, Jan 2007.

CERSOSIMO, R. J. Cisplatin neurotoxicity. **Cancer Treat Rev,** v. 16, n. 4, p. 195-211, Dec 1989.

CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. E. Reed, Cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. In: B.A. CHABNER, D. L. L. E. (Ed.). **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice**. 4th edition, Lippincott, Williams & Wilkins. Philadelphia, 2006. p.332-343.

CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. E. Reed, Platinum analogues. In: B.A. CHABNER, D. L. L. E. (Ed.). **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice**. 5 th eddition, Lippincott, Williams and Wilkins. Philadelphia, 2011. p.310-322.

CHANG, H. C.; GUARENTE, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. **Trends Endocrinol Metab,** v. 25, n. 3, p. 138-45, Mar 2014.

CHAO, M. V.; RAJAGOPAL, R.; LEE, F. S. Neurotrophin signalling in health and disease. **Clin Sci (Lond),** v. 110, n. 2, p. 167-73, Feb 2006.

CHIA, P. H.; LI, P.; SHEN, K. Cell biology in neuroscience: cellular and molecular mechanisms underlying presynapse formation. **J Cell Biol,** v. 203, n. 1, p. 11-22, Oct 14 2013.

CHIORAZZI, A.; SEMPERBONI, S.; MARMIROLI, P. Current View in Platinum Drug Mechanisms of Peripheral Neurotoxicity. **Toxics,** v. 3, n. 3, p. 304-321, Aug 7 2015.

CHO, T.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Neurofilament 200 as an indicator of differences between mipafox and paraoxon sensitivity in Sy5Y neuroblastoma cells. **J Toxicol Environ Health A,** v. 67, n. 13, p. 987-1000, Jul 9 2004.

CONDE, C.; CACERES, A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. **Nat Rev Neurosci,** v. 10, n. 5, p. 319-32, May 2009.

COWAN, W. M.; JESSELL, T. M.; ZIPURSKY, S. L. Molecular and celluar approaches to neural development. **New York: Oxford University Press**, 1997.

CROWDER, R. J.; FREEMAN, R. S. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. **J Neurosci,** v. 18, n. 8, p. 2933-43, Apr 15 1998.

_____. The survival of sympathetic neurons promoted by potassium depolarization, but not by cyclic AMP, requires phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. **J Neurochem,** v. 73, n. 2, p. 466-75, Aug 1999.

DA SILVA, J. S.; DOTTI, C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. **Nat Rev Neurosci,** v. 3, n. 9, p. 694-704, Sep 2002.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol,** v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001.

DANI, J. W.; ARMSTRONG, D. M.; BENOWITZ, L. I. Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. **Neuroscience,** v. 40, n. 1, p. 277-87, 1991.

DAS, K. P.; FREUDENRICH, T. M.; MUNDY, W. R. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. **Neurotoxicol Teratol,** v. 26, n. 3, p. 397-406, May-Jun 2004.

DE SANTIS, S. et al. Patients treated with antitumor drugs displaying neurological deficits are characterized by a low circulating level of nerve growth factor. **Clin Cancer Res,** v. 6, n. 1, p. 90-5, Jan 2000.

DECHANT, G.; BARDE, Y. A. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. **Nat Neurosci,** v. 5, n. 11, p. 1131-6, Nov 2002.

DEDOV, V. N.; ARMATI, P. J.; ROUFOGALIS, B. D. Three-dimensional organisation of mitochondrial clusters in regenerating dorsal root ganglion (DRG) neurons from neonatal rats: evidence for mobile mitochondrial pools. **Journal of the Peripheral Nervous System,** v. 5, n. 1, p. 3-10, Mar 2000.

DEFRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes Care,** v. 32 Suppl 2, p. S157-63, Nov 2009.

DIENEL, G. A. Fueling and imaging brain activation. **ASN Neuro,** v. 4, n. 5, Jul 20 2012.

DOS SANTOS, N. A. et al. Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats. **Chem Biol Interact,** v. 170, n. 3, p. 177-86, Dec 15 2007.

DOS SANTOS, N. A. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects PC12 cells from MPP+ toxicity by inducing the expression of neuron-typical proteins. **Neurotoxicology,** v. 45, p. 131-8, Dec 2014.

DUDEK, H. et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. **Science,** v. 275, n. 5300, p. 661-5, Jan 31 1997.

DWYER, D. S. et al. Attachment of PC12 cells to adhesion substratum induces the accumulation of glucose transporters (GLUTs) and stimulates glucose metabolism. **Neurochem Res,** v. 23, n. 8, p. 1107-16, Aug 1998.

DZAGNIDZE, A. et al. Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. **J Neurosci,** v. 27, n. 35, p. 9451-7, Aug 29 2007.

EASTMAN, A.; SCHULTE, N. Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). **Biochemistry,** v. 27, n. 13, p. 4730-4, Jun 28 1988.

EDSJO, A. et al. Differences in early and late responses between neurotrophin-stimulated trkA- and trkC-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Cell Growth Differ,** v. 12, n. 1, p. 39-50, Jan 2001.

EDSON, K.; WEISSHAAR, B.; MATUS, A. Actin depolymerisation induces process formation on MAP2-transfected non-neuronal cells. **Development,** v. 117, n. 2, p. 689-700, Feb 1993.

EGAWA-TAKATA, T. et al. Early reduction of glucose uptake after cisplatin treatment is a marker of cisplatin sensitivity in ovarian cancer. **Cancer Sci,** v. 101, n. 10, p. 2171-8, Oct 2010.

EHRHART-BORNSTEIN, M. et al. Parallel expression of synaptophysin and evoked neurotransmitter release during development of cultured neurons. **Int J Dev Neurosci,** v. 9, n. 5, p. 463-71, 1991.

EID, H. M. et al. Caffeic acid methyl and ethyl esters exert potential antidiabetic effects on glucose and lipid metabolism in cultured murine insulin-sensitive cells through mechanisms implicating activation of AMPK. **Pharm Biol,** v. 55, n. 1, p. 2026-2034, Dec 2017.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. **Front Biosci (Elite Ed),** v. 4, p. 779-93, 2012.

FERREIRA, A.; RAPOPORT, M. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. **Cell Mol Life Sci,** v. 59, n. 4, p. 589-95, Apr 2002.

FERRY, K. V.; HAMILTON, T. C.; JOHNSON, S. W. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. **Biochem Pharmacol,** v. 60, n. 9, p. 1305-13, Nov 1 2000.

FILBIN, M. T. Axon regeneration: Vaccinating against spinal cord injury. **Curr Biol,** v. 10, n. 3, p. R100-3, Feb 10 2000.

FLASKOS, J. et al. The effects of carbaryl and trichlorphon on differentiating mouse N2a neuroblastoma cells. **Toxicol Lett,** v. 110, n. 1-2, p. 79-84, Oct 29 1999.

FLETCHER, T. L. et al. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. **J Neurosci,** v. 11, n. 6, p. 1617-26, Jun 1991.

FONTANA, A. C. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. **J Neurochem,** v. 134, n. 6, p. 982-1007, Sep 2015.

FRANKER, M. A.; HOOGENRAAD, C. C. Microtubule-based transport - basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. **J Cell Sci,** v. 126, n. Pt 11, p. 2319-29, Jun 1 2013.

FRYE, R. A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 273, n. 2, p. 793-8, Jul 5 2000.

FUJITA, K.; LAZAROVICI, P.; GUROFF, G. Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. **Environ Health Perspect,** v. 80, p. 127-42, Mar 1989.

GATELY, D. P.; HOWELL, S. B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. **Br J Cancer,** v. 67, n. 6, p. 1171-6, Jun 1993.

GEUNA, S. et al. Plasticity and regeneration in the peripheral nervous system. **Ital J Anat Embryol,** v. 115, n. 1-2, p. 91-4, 2010.

GILL, J. S.; WINDEBANK, A. J. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. **J Clin Invest,** v. 101, n. 12, p. 2842-50, Jun 15 1998.

GONZALEZ, V. M. et al. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Mol Pharmacol,** v. 59, n. 4, p. 657-63, Apr 2001.

GORDON, T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. **Neurosurg Focus,** v. 26, n. 2, p. E3, Feb 2009.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 73, n. 7, p. 2424-8, Jul 1976.

GREGG, R. W. et al. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. **J Clin Oncol,** v. 10, n. 5, p. 795-803, May 1992.

GRISOLD, W.; CAVALETTI, G.; WINDEBANK, A. J. Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention. **Neuro Oncol,** v. 14 Suppl 4, p. iv45-54, Sep 2012.

GRUNBERG, S. M. et al. Progressive paresthesias after cessation of therapy with very high-dose cisplatin. **Cancer Chemother Pharmacol,** v. 25, n. 1, p. 62-4, 1989.

GUO, Z. H.; MATTSON, M. P. In vivo 2-deoxyglucose administration preserves glucose and glutamate transport and mitochondrial function in cortical synaptic terminals after exposure to amyloid beta-peptide and iron: evidence for a stress response. **Exp Neurol,** v. 166, n. 1, p. 173-9, Nov 2000.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J Immunol Methods,** v. 119, n. 2, p. 203-10, May 12 1989.

HARDIE, D. G.; ALESSI, D. R. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. **BMC Biol,** v. 11, p. 36, Apr 15 2013.

HARDIE, D. G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? **Eur J Biochem,** v. 246, n. 2, p. 259-73, Jun 1 1997.

HARDIE, D. G. et al. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. **FEBS Lett,** v. 546, n. 1, p. 113-20, Jul 3 2003.

HARRILL, J. A.; MUNDY, W. R. Quantitative assessment of neurite outgrowth in PC12 cells. **Methods Mol Biol,** v. 758, p. 331-48, 2011.

HARRILL, J. A.; ROBINETTE, B. L.; MUNDY, W. R. Use of high content image analysis to detect chemical-induced changes in synaptogenesis in vitro. **Toxicol In Vitro,** v. 25, n. 1, p. 368-87, Feb 2011.

HAUPT, S. et al. Apoptosis - the p53 network. **J Cell Sci,** v. 116, n. Pt 20, p. 4077-85, Oct 15 2003.

HAUSHEER, F. H. et al. Diagnosis, management, and evaluation of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Semin Oncol,** v. 33, n. 1, p. 15-49, Feb 2006.

HEATHER WEST GREENLEE, M. et al. Glucose uptake in PC12 cells: GLUT3 vesicle trafficking and fusion as revealed with a novel GLUT3-GFP fusion protein. **J Neurosci Res,** v. 73, n. 4, p. 518-25, Aug 15 2003.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer,** v. 13, n. 10, p. 714-26, Oct 2013.

HORVATH, P. et al. Changes in tracheo-bronchial sensory neuropeptide receptor gene expression pattern in rats with cisplatin-induced sensory neuropathy. **Neuropeptides,** v. 40, n. 1, p. 77-83, Feb 2006.

HOTULAINEN, P.; HOOGENRAAD, C. C. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. **J Cell Biol,** v. 189, n. 4, p. 619-29, May 17 2010.

HROMAS, R. A.; NORTH, J. A.; BURNS, C. P. Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. **Cancer Lett,** v. 36, n. 2, p. 197-201, Aug 1987.

HU, X. et al. Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. **J Neurosci,** v. 28, n. 49, p. 13094-105, Dec 3 2008.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci,** v. 24, p. 677-736, 2001.

_____. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Annu Rev Biochem,** v. 72, p. 609-42, 2003.

HWANG, J. T.; KWON, D. Y.; YOON, S. H. AMP-activated protein kinase: a potential target for the diseases prevention by natural occurring polyphenols. **N Biotechnol,** v. 26, n. 1-2, p. 17-22, Oct 1 2009.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. **Chem Rev,** v. 99, n. 9, p. 2467-98, Sep 8 1999.

JAWORSKI, J. et al. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. **Neuron,** v. 61, n. 1, p. 85-100, Jan 15 2009.

JOHNSON, E. M. et al. Adenosine 3',5-monophosphate-dependent phosphorylation of a specific protein in synaptic membrane fractions from rat cerebrum. **J Biol Chem,** v. 247, n. 17, p. 5650-2, Sep 10 1972.

JOHNSTON, G. A. R. Glutamate: Transmitter in the Central Nervous System. In: WILEY (Ed.). Chichester, UK, 1981. p.77.

JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. Third row transition metals for the treatment of cancer. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci,** v. 373, n. 2037, Mar 13 2015.

KANAAN, N. M. et al. Axonal degeneration in Alzheimer's disease: when signaling abnormalities meet the axonal transport system. **Exp Neurol,** v. 246, p. 44-53, Aug 2013.

KANAT, O. et al. Protective effect of amifostine against toxicity of paclitaxel and carboplatin in non-small cell lung cancer: a single center randomized study. **Med Oncol,** v. 20, n. 3, p. 237-45, 2003.

KAO, S. et al. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. **J Biol Chem,** v. 276, n. 21, p. 18169-77, May 25 2001.

KAPITEIN, L. C.; HOOGENRAAD, C. C. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. **Neuron,** v. 87, n. 3, p. 492-506, Aug 5 2015.

KAPLAN, D. R. et al. Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. Eukaryotic Signal Transduction Group. **Neuron,** v. 11, n. 2, p. 321-31, Aug 1993.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol,** v. 10, n. 3, p. 381-91, Jun 2000.

KAPLAN, D. R.; STEPHENS, R. M. Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. **J Neurobiol,** v. 25, n. 11, p. 1404-17, Nov 1994.

KEDAR, A.; COHEN, M. E.; FREEMAN, A. I. Peripheral neuropathy as a complication of cis-dichlorodiammineplatinum(II) treatment: a case report. **Cancer Treat Rep,** v. 62, n. 5, p. 819-21, May 1978.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nat Rev Cancer,** v. 7, n. 8, p. 573-84, Aug 2007.

KELLEY, M. R. et al. Role of the DNA base excision repair protein, APE1 in cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin induced sensory neuropathy. **PLoS One,** v. 9, n. 9, p. e106485, 2014.

KESSELS, M. M. et al. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis. **Eur J Cell Biol,** v. 90, n. 11, p. 926-33, Nov 2011.

KEVENAAR, J. T.; HOOGENRAAD, C. C. The axonal cytoskeleton: from organization to function. **Front Mol Neurosci,** v. 8, p. 44, 2015.

KIM, D. H. et al. SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 301, n. 2, p. F427-35, Aug 2011.

KIM, H. B.; YOO, B. S. Propolis Inhibits Neurite Outgrowth in Differentiating SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. **Toxicol Res,** v. 32, n. 3, p. 239-43, Jul 2016.

KIM, Y. C. Neuroprotective phenolics in medicinal plants. **Arch Pharm Res,** v. 33, n. 10, p. 1611-32, Oct 2010.

KIRYUSHKO, D.; BEREZIN, V.; BOCK, E. Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1014, p. 140-54, Apr 2004.

KIZILAY, A. et al. Caffeic acid phenethyl ester ameliorated ototoxicity induced by cisplatin in rats. **J Chemother,** v. 16, n. 4, p. 381-7, Aug 2004.

KLEIN, R.; BROWN, D.; TURNLEY, A. M. Phenoxodiol protects against Cisplatin induced neurite toxicity in a PC-12 cell model. **BMC Neurosci,** v. 8, p. 61, 2007.

KOSTANDY, B. B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. **Neurol Sci,** v. 33, n. 2, p. 223-37, Apr 2012.

KRARUP-HANSEN, A. et al. Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. **Brain,** v. 130, n. Pt 4, p. 1076-88, Apr 2007.

KURAUCHI, Y. et al. Caffeic acid phenethyl ester protects nigral dopaminergic neurons via dual mechanisms involving haem oxygenase-1 and brain-derived neurotrophic factor. **Br J Pharmacol,** v. 166, n. 3, p. 1151-68, Jun 2012.

L'EPISCOPO, F. et al. A Wnt1 regulated Frizzled-1/beta-Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutical relevance for neuron survival and neuroprotection. **Mol Neurodegener,** v. 6, p. 49, 2011.

LEE, E. S. et al. CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 361, n. 4, p. 854-8, Oct 5 2007.

LEE, R. H. et al. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. **Biochem Pharmacol,** v. 62, n. 8, p. 1013-23, Oct 15 2001.

LEHRE, K. P. et al. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. **J Neurosci,** v. 15, n. 3 Pt 1, p. 1835-53, Mar 1995.

LEVY, Y. S. et al. Therapeutic potential of neurotrophic factors in neurodegenerative diseases. **BioDrugs,** v. 19, n. 2, p. 97-127, 2005.

LEWIS, T. L., JR.; COURCHET, J.; POLLEUX, F. Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. **J Cell Biol,** v. 202, n. 6, p. 837-48, Sep 16 2013.

LI, D. et al. Cardioprotection of CAPE-oNO2 against myocardial ischemia/reperfusion induced ROS generation via regulating the SIRT1/eNOS/NF-κB pathway in vivo and in vitro. **Redox Biology,** v. 15, p. 62-73, 2018.

LI, L. et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses in human gingival fibroblasts via NF-kappaB and PI3K/Akt signaling pathway. **Eur J Pharmacol,** v. 794, p. 61-68, Jan 5 2017.

LI, X. SIRT1 and energy metabolism. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),** v. 45, n. 1, p. 51-60, Jan 2013.

LIANG, X. J. et al. SIRT1 contributes in part to cisplatin resistance in cancer cells by altering mitochondrial metabolism. **Mol Cancer Res,** v. 6, n. 9, p. 1499-506, Sep 2008.

LIN, C. W. et al. Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. **J Agric Food Chem,** v. 58, n. 7, p. 4477-86, Apr 14 2010.

LIN, P. C. et al. N-acetylcysteine has neuroprotective effects against oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colon cancer patients: preliminary data. **Support Care Cancer,** v. 14, n. 5, p. 484-7, May 2006.

LIPPARD, S. J. Chemistry and molecular biology of cisplatinum anticancer drugs. **Pure Appl. Chem,** v. 59, p. 731-42, 1987.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **J Neurosci Methods,** v. 96, n. 2, p. 147-52, Mar 15 2000.

LONGO, F. M.; MASSA, S. M. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. **Nat Rev Drug Discov,** v. 12, n. 7, p. 507-25, Jul 2013.

LU, M. et al. Neuronal Sirt1 Deficiency Increases Insulin Sensitivity in Both Brain and Peripheral Tissues. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 288, n. 15, p. 10722-10735, 03/01
12/10/received
02/26/revised 2013.

LU, Z. et al. The expression of glutamate transporters in chest compression-induced audiogenic epilepsy: a comparative study. **Neurol Res,** v. 30, n. 9, p. 915-9, Nov 2008.

MACCIO, A.; MADEDDU, C. Cisplatin : an old drug with a newfound efficacy -- from mechanisms of action to cytotoxicity. **Expert Opin Pharmacother,** v. 14, n. 13, p. 1839-57, Sep 2013.

MAEDER, C. I.; SHEN, K.; HOOGENRAAD, C. C. Axon and dendritic trafficking. **Curr Opin Neurobiol,** v. 27, p. 165-70, Aug 2014.

MAINARDI, M.; FUSCO, S.; GRASSI, C. Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. **Neural Plast,** v. 2015, p. 657928, 2015.

MALLOLAS, J. et al. A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. **J Exp Med,** v. 203, n. 3, p. 711-7, Mar 20 2006.

MANN, S. C.; ANDREWS, P. A.; HOWELL, S. B. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. **Int J Cancer,** v. 48, n. 6, p. 866-72, Jul 30 1991.

MANNI, L. et al. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. **Growth Factors,** v. 31, n. 4, p. 115-22, Aug 2013.

MARSHALL, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. **Cell,** v. 80, n. 2, p. 179-85, Jan 27 1995.

MARTINO, G. et al. Brain regeneration in physiology and pathology: the immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. **Physiol Rev,** v. 91, n. 4, p. 1281-304, Oct 2011.

MATTSON, M. P.; LIU, D. Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. **Neuromolecular Med,** v. 2, n. 2, p. 215-31, 2002.

MATTSON, M. P.; PARTIN, J. Evidence for mitochondrial control of neuronal polarity. **Journal of Neuroscience Research,** v. 56, n. 1, p. 8-20, Apr 1 1999.

MATTSON, M. P.; ZHANG, Y.; BOSE, S. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. **Exp Neurol,** v. 121, n. 1, p. 1-13, May 1993.

MAWRIN, C. et al. Changes of retinal glutamate transporter GLT-1 mRNA levels following optic nerve damage. **Mol Vis,** v. 9, p. 10-3, Jan 13 2003.

MCDONALD, E. S.; WINDEBANK, A. J. Cisplatin-induced apoptosis of DRG neurons involves bax redistribution and cytochrome c release but not fas receptor signaling. **Neurobiol Dis,** v. 9, n. 2, p. 220-33, Mar 2002.

MCGUIRE, C. B.; SNIPES, G. J.; NORDEN, J. J. Light-microscopic immunolocalization of the growth- and plasticity-associated protein GAP-43 in the developing rat brain. **Brain Res,** v. 469, n. 1-2, p. 277-91, Jun 1 1988.

MEHTA, A. et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **Eur J Pharmacol,** v. 698, n. 1-3, p. 6-18, Jan 5 2013.

MELLI, G. et al. Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. **Exp Neurol,** v. 214, n. 2, p. 276-84, Dec 2008.

MENG, L. et al. Carbon Nanotubes: Short Multiwall Carbon Nanotubes Promote Neuronal Differentiation of PC12 Cells via Up-Regulation of the Neurotrophin Signaling Pathway (Small 9–10/2013). **Small,** v. 9, n. 9-10, p. 1413-1413, 2013.

MILLER, R. H.; LASEK, R. J. Cross-bridges mediate anterograde and retrograde vesicle transport along microtubules in squid axoplasm. **J Cell Biol,** v. 101, n. 6, p. 2181-93, Dec 1985.

MILTENBURG, N. C.; BOOGERD, W. Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. **Cancer Treat Rev,** v. 40, n. 7, p. 872-82, Aug 2014.

MIN, S.-W. et al. Sirtuins in neurodegenerative diseases: an update on potential mechanisms. **Frontiers in Aging Neuroscience,** v. 5, p. 53, 09/25
07/17/received
09/02/accepted 2013.

MIYAMOTO, E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. **J Pharmacol Sci,** v. 100, n. 5, p. 433-42, 2006.

MONNET-TSCHUDI, F. et al. Microglial responsiveness as a sensitive marker for trimethyltin (TMT) neurotoxicity. **Brain Res,** v. 690, n. 1, p. 8-14, Aug 28 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods,** v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MURPHY, A. et al. Neurofilament expression in human T lymphocytes. **Immunology,** v. 79, n. 1, p. 167-70, May 1993.

MURTAZA, G. et al. Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. **Biomed Res Int,** v. 2014, p. 145342, 2014.

NICOLINI, G.; MONFRINI, M.; SCUTERI, A. Axonal Transport Impairment in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Toxics,** v. 3, n. 3, p. 322-341, Aug 7 2015.

O'CALLAGHAN, J. P.; MILLER, D. B. Assessment of chemically-induced alterations in brain development using assays of neuron- and glia-localized proteins. **Neurotoxicology,** v. 10, n. 3, p. 393-406, Fall 1989.

OHMICHI, M.; ZHU, G.; SALTIEL, A. R. Nerve growth factor activates calcium-insensitive protein kinase C-epsilon in PC-12 rat pheochromocytoma cells. **Biochem J,** v. 295 (Pt 3), p. 767-72, Nov 1 1993.

OZEN, S. et al. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J Appl Toxicol,** v. 24, n. 1, p. 27-35, Jan-Feb 2004.

PACE, A. et al. Vitamin E neuroprotection for cisplatin neuropathy: a randomized, placebo-controlled trial. **Neurology,** v. 74, n. 9, p. 762-6, Mar 2 2010.

PACE, A. et al. Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. **J Clin Oncol,** v. 21, n. 5, p. 927-31, Mar 1 2003.

PARK, S. B. et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: a critical analysis. **CA Cancer J Clin,** v. 63, n. 6, p. 419-37, Nov-Dec 2013.

PARK, S. B. et al. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. **Curr Med Chem,** v. 15, n. 29, p. 3081-94, 2008.

PARRAN, D. K.; BARONE, S., JR.; MUNDY, W. R. Methylmercury decreases NGF-induced TrkA autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. **Brain Res Dev Brain Res,** v. 141, n. 1-2, p. 71-81, Mar 14 2003.

PENG, S. et al. Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. **Mol Biol Rep,** v. 38, n. 1, p. 453-60, Jan 2011.

PHAN, C. W. et al. Hericium erinaceus (Bull.: Fr) Pers. cultivated under tropical conditions: isolation of hericenones and demonstration of NGF-mediated neurite outgrowth in PC12 cells via MEK/ERK and PI3K-Akt signaling pathways. **Food Funct,** v. 5, n. 12, p. 3160-9, Dec 2014.

PODRATZ, J. L. et al. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. **Neurobiol Dis,** v. 41, n. 3, p. 661-8, Mar 2011.

POLLARD, T. D.; COOPER, J. A. Actin, a central player in cell shape and movement. **Science,** v. 326, n. 5957, p. 1208-12, Nov 27 2009.

PRIOR, R. et al. Defective axonal transport: A common pathological mechanism in inherited and acquired peripheral neuropathies. **Neurobiol Dis,** v. 105, p. 300-320, Sep 2017.

PRZYBORSKI, S. A.; CAMBRAY-DEAKIN, M. A. Developmental changes in GAP-43 expression in primary cultures of rat cerebellar granule cells. **Brain Res Mol Brain Res,** v. 25, n. 3-4, p. 273-85, Sep 1994.

QUASTHOFF, S.; HARTUNG, H. P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **J Neurol,** v. 249, n. 1, p. 9-17, Jan 2002.

RASBAND, W. S. **ImageJ, U. S. National Institutes of Health**. Bethesda, Maryland, USA http://imagej.nih.gov/ij/ 1997-2014.

RAY, A. L. Neuroplasticity, Sensitization,and Pain In: DEER, T. R.;LEONG, M. S. e RAY, A. L. (Ed.). **Treatment of Chronic Pain by Integrative Approaches**, 2015. cap. 2, p.15-24.

REBILLARD, A.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; DIMANCHE-BOITREL, M. T. Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. **Curr Med Chem,** v. 15, n. 26, p. 2656-63, 2008.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,** v. 361, n. 1473, p. 1545-64, Sep 29 2006.

RICHON, V. M.; SCHULTE, N.; EASTMAN, A. Multiple mechanisms of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in murine leukemia L1210 cells. **Cancer Res,** v. 47, n. 8, p. 2056-61, Apr 15 1987.

RONNETT, G. V. et al. AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. **J Neurochem,** v. 109 Suppl 1, p. 17-23, May 2009.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature,** v. 205, p. 698-9, Feb 13 1965.

ROSENBERG, B. et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature,** v. 222, n. 5191, p. 385-6, Apr 26 1969.

RUSSELL, J. W. et al. Effect of cisplatin and ACTH4-9 on neural transport in cisplatin induced neurotoxicity. **Brain Res,** v. 676, n. 2, p. 258-67, Apr 10 1995.

SANTOS, N. A. et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Arch Toxicol,** v. 81, n. 7, p. 495-504, Jul 2007.

SANTOS, N. A. G. D. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects PC12 cells from MPP+ toxicity by inducing the expression of neurontypical proteins. **Neurotoxicology,** v. 45, p. 131-138, 2014.

SCHIMMELPFENG, J.; WEIBEZAHN, K. F.; DERTINGER, H. Quantification of NGF-dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth. **J Neurosci Methods,** v. 139, n. 2, p. 299-306, Oct 30 2004.

SCOTT, H. L. et al. Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. **J Neurosci,** v. 22, n. 3, p. RC206, Feb 1 2002.

SIEGAL, T.; HAIM, N. Cisplatin-induced peripheral neuropathy. Frequent off-therapy deterioration, demyelinating syndromes, and muscle cramps. **Cancer,** v. 66, n. 6, p. 1117-23, Sep 15 1990.

SILVA, R. B. et al. Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Neuroscience,** v. 233, p. 86-94, 2013.

SKENE, J. H. Axonal growth-associated proteins. **Annu Rev Neurosci,** v. 12, p. 127-56, 1989.

SOFRONIEW, M. V.; HOWE, C. L.; MOBLEY, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annu Rev Neurosci,** v. 24, p. 1217-81, 2001.

SORENSON, C. M.; EASTMAN, A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. **Cancer Res,** v. 48, n. 16, p. 4484-8, Aug 15 1988.

SPASIC, M. R.; CALLAERTS, P.; NORGA, K. K. AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular crossroad for metabolic control and survival of neurons. **Neuroscientist,** v. 15, n. 4, p. 309-16, Aug 2009.

SRIVASTAVA, A. N. et al. Cisplatin combination chemotherapy induces oxidative stress in advance non small cell lung cancer patients. **Asian Pac J Cancer Prev,** v. 11, n. 2, p. 465-71, 2010.

STAROBOVA, H.; VETTER, I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Front Mol Neurosci,** v. 10, p. 174, 2017.

SUNG, B.; LIM, G.; MAO, J. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. **J Neurosci,** v. 23, n. 7, p. 2899-910, Apr 1 2003.

TAPLEY, P.; LAMBALLE, F.; BARBACID, M. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. **Oncogene,** v. 7, n. 2, p. 371-81, Feb 1992.

THEIL, G. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins for synaptic vesicle. **Brain Pathol,** v. 3, p. 87-95, 1993.

THOIDIS, G. et al. Glucose transporter Glut3 is targeted to secretory vesicles in neurons and PC12 cells. **J Biol Chem,** v. 274, n. 20, p. 14062-6, May 14 1999.

TOLBA, M. F. et al. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. **IUBMB Life,** v. 65, n. 8, p. 699-709, Aug 2013.

TSAI, C. F. et al. Regulatory effects of caffeic acid phenethyl ester on neuroinflammation in microglial cells. **Int J Mol Sci,** v. 16, n. 3, p. 5572-89, Mar 11 2015.

TSOULFAS, P. et al. TrkC isoforms with inserts in the kinase domain show impaired signaling responses. **J Biol Chem,** v. 271, n. 10, p. 5691-7, Mar 8 1996.

UEDA, M.; HAYASHIBARA, K.; ASHIDA, H. Propolis extract promotes translocation of glucose transporter 4 and glucose uptake through both PI3K- and AMPK-dependent pathways in skeletal muscle. **Biofactors,** v. 39, n. 4, p. 457-66, Jul-Aug 2013.

UEDA, T.; GREENGARD, P. Adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein system of neuronal membranes. I. Solubilization, purification, and some properties of an endogenous phosphoprotein. **J Biol Chem,** v. 252, n. 14, p. 5155-63, Jul 25 1977.

VAN DEN BOSCH, L. et al. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. **Biochim Biophys Acta,** v. 1762, n. 11-12, p. 1068-82, Nov-Dec 2006.

VAN DER HOOP, R. G. et al. Prevention of cisplatin neurotoxicity with an ACTH(4-9) analogue in patients with ovarian cancer. **N Engl J Med,** v. 322, n. 2, p. 89-94, Jan 11 1990.

VANELLA, L. et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Regulates PPAR's Levels in Stem Cells-Derived Adipocytes. **PPAR Res,** v. 2016, p. 7359521, 2016.

VAUDRY, D. et al. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. **Science,** v. 296, n. 5573, p. 1648-9, May 31 2002.

VERBERNE, A. J.; SABETGHADAM, A.; KORIM, W. S. Neural pathways that control the glucose counterregulatory response. **Front Neurosci,** v. 8, p. 38, 2014.

WALKER, K. et al. mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurones mediate inflammatory hyperalgesia. **Neuropharmacology,** v. 40, n. 1, p. 10-9, 2001.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov,** v. 4, n. 4, p. 307-20, Apr 2005.

WANG, J. et al. Resveratrol protects against Cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. **Cancer Biother Radiopharm,** v. 24, n. 6, p. 675-80, Dec 2009.

WANG, L. Y.; TANG, Z. J.; HAN, Y. Z. Neuroprotective effects of caffeic acid phenethyl ester against sevofluraneinduced neuronal degeneration in the hippocampus of neonatal rats involve MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. **Mol Med Rep,** v. 14, n. 4, p. 3403-12, Oct 2016.

WANG, X. et al. Cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and catechol ring-fluorinated CAPE derivatives against menadione-induced oxidative stress in human endothelial cells. **Bioorg Med Chem,** v. 14, n. 14, p. 4879-87, Jul 15 2006.

WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis,** v. 15, n. 11, p. 1382-402, Nov 2010.

WATKINS, J. C. l-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. **Biochem Soc Trans,** v. 28, n. 4, p. 297-309, 2000.

WAYMAN, G. A. et al. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 105, n. 26, p. 9093-8, Jul 1 2008.

WIENDL, H. et al. Gaps Between Aims and Achievements in Therapeutic Modification of Neuronal Damage ("Neuroprotection"). **Neurotherapeutics,** v. 12, n. 2, p. 449-54, Apr 2015.

WILLIAMS, D. S. et al. Disruption of microfilament organization and deregulation of disk membrane morphogenesis by cytochalasin D in rod and cone photoreceptors. **J Comp Neurol,** v. 272, n. 2, p. 161-76, Jun 8 1988.

WILLIAMS, T. M. et al. Lead enhances NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells by potentiating ERK/MAPK activation. **Neurotoxicology,** v. 21, n. 6, p. 1081-9, Dec 2000.

WILMES, A. et al. Mechanism of cisplatin proximal tubule toxicity revealed by integrating transcriptomics, proteomics, metabolomics and biokinetics. **Toxicol In Vitro,** v. 30, n. 1 Pt A, p. 117-27, Dec 25 2015.

WILSON, J. M. et al. Decrease in glial glutamate transporter variants and excitatory amino acid receptor down-regulation in a murine model of ALS-PDC. **Neuromolecular Med,** v. 3, n. 2, p. 105-18, 2003.

WINDEBANK, A. J.; GRISOLD, W. Chemotherapy-induced neuropathy. **J Peripher Nerv Syst,** v. 13, n. 1, p. 27-46, Mar 2008.

WOLTJER, R. L. et al. Aberrant detergent-insoluble excitatory amino acid transporter 2 accumulates in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol,** v. 69, n. 7, p. 667-76, Jul 2010.

WU, G. et al. Induction of axon-like and dendrite-like processes in neuroblastoma cells. **J Neurocytol,** v. 27, n. 1, p. 1-14, Jan 1998.

XU, L.; ASH, J. D. The Role of AMPK Pathway in Neuroprotection. **Adv Exp Med Biol,** v. 854, p. 425-30, 2016.

YAO, R.; COOPER, G. M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. **Science,** v. 267, n. 5206, p. 2003-6, Mar 31 1995.

YI, J. H.; HAZELL, A. S. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. **Neurochem Int,** v. 48, n. 5, p. 394-403, Apr 2006.

ZENG, H. H.; LU, J. F.; WANG, K. The effect of cisplatin and transplatin on the conformation and association of F-actin. **Cell Biol Int,** v. 19, n. 6, p. 491-7, Jun 1995.

ZENG, H. H. et al. Studies on the thermokinetic characterisation of actin polymerization and the effect of cisplatin. **Int J Biol Macromol,** v. 18, n. 3, p. 161-6, Apr 1996.

ZENG, H. H.; XU, Z. H.; WANG, K. FT-Raman studies on the transformation of G-actin to F-actin, the binding of cisplatin and transplatin to F-actin and the effects of the conformation of F-actin. **Int J Biol Macromol,** v. 20, n. 2, p. 107-13, Apr 1997.

ZHANG, J. Z.; ISMAIL-BEIGI, F. Activation of Glut1 glucose transporter in human erythrocytes. **Arch Biochem Biophys,** v. 356, n. 1, p. 86-92, Aug 1 1998.