



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

FILIPPE KATSUHIKO KATASHO

EFEITOS DA CICLOSPORINA A EM CÉLULAS NEURAIS DE GÂNGLIOS
DA RAIZ DORSAL DE EMBRIÕES DE GALINHA

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

BELÉM-PARÁ

2017

FILIFE KATSUHIKO KATASHO

EFEITOS DA CICLOSPORINA A EM CÉLULAS NEURAIS DE GÂNGLIOS
DA RAIZ DORSAL DE EMBRIÕES DE GALINHA

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

BELÉM-PARÁ

2017

FILIFE KATSUHIKO KATASHO

EFEITOS DA CICLOSPORINA A EM CÉLULAS NEURAIIS DE GÂNGLIOS
DA RAIZ DORSAL DE EMBRIÕES DE GALINHA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina,
aprovado com o conceito:

Belém (PA), 14 de Março de 2017.

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena – ICB - UFPA

Prof. Dr. Paulo Eduardo Santos Ávila - UNAMA

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

*"Irmãos, o que fazemos na vida ecoa na
eternidade."*

*General Maximus Decimus Meridius,
Gladiador*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que me capacitou, me deu forças e ânimo para concluir esta etapa em minha vida. À Ele seja toda honra e glória.

Agradeço aos meus pais, que de todas as formas sempre me incentivaram e fizeram o possível para que eu me tornasse alguém melhor. Nunca mediram esforços para proporcionar a mim um ensino de qualidade, e com grande sabedoria me ensinaram valores que sempre levarei e jamais abandonarei.

Também agradeço à minha irmã, por sempre me proporcionar gargalhadas que por muitas vezes aliviaram o cansaço do dia a dia.

Ao professor José Luiz Martins, por ter me dado a oportunidade de aprender coisas valiosas em seu laboratório. Agradeço por ter se disposto a me orientar, pela sua paciência e sabedoria. Jamais esquecerei de seus ensinamentos.

À professora Barbarella Macchi e a todos os membros do Laboratório de Neuroquímica Celular e Molecular por sempre me ajudarem durante o dia a dia no laboratório. Agradeço por cada dúvida respondida, auxílio durante experimentos, técnicas ensinadas e até mesmo pelos deliciosos cafezinhos oferecidos.

À cada um dos professores que fizeram parte da minha graduação, me ensinaram e avaliaram, para que eu pudesse me tornar um profissional de excelência. Também não poderia deixar de agradecer à cada um dos professores da banca que separaram uma parte de seu precioso tempo para ler e avaliar meu trabalho.

À minha melhor amiga, parceira e namorada, Giuliana Modesto, que sempre me apoiou em meus estudos, cuidou de mim, me acalmou e me alegrou tanto em momentos tempestuosos. Que sempre fez o papel de “chata” lembrando-me de datas e prazos, mesmo enquanto eu estava à meio mundo de distância. Meu amor por você apenas cresce e torna-se forte a cada dia que passa.

Aos meus amigos de faculdade que sempre me ajudaram em nossas inúmeras tarefas e me proporcionaram momentos memoráveis durante os anos em que estivemos juntos na graduação. Juliany Gemaque, Marcella Montenegro, Natacha Port's, Eliany Reis, Eliene Putira, Aline Nunes, Ruhan Brito. Sem vocês eu estaria perdido no mundo novo chamado universidade. A cada um de vocês, muito obrigado.

RESUMO

A Ciclosporina A é um potente imunossupressor químico inicialmente introduzido para uso em transplantes de órgãos sólidos. É classificada como inibidor da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T e seu principal efeito é o bloqueio do fator nuclear de células T ativadas (NFAT). Isto ocorre devido a Ciclosporina A ligar-se a Ciclofilina, criando um complexo que se liga e inibe a ação da Calcineurina, um segundo mensageiro importante da via de transdução de sinal do Fator de Crescimento do Nervo (NGF), causando hiperfosforilação de NFAT e regulação negativa de NGF e seu receptor de alta afinidade, TrkA, e outros fatores que participam da via. NFAT possui até o presente momento 5 isoformas (NFAT1-NFAT5). As isoformas NFAT1-NFAT4 são Calcineurina dependentes enquanto que NFAT5 é independente. Neste trabalho buscamos avaliar os efeitos do tratamento com o imunossupressor Ciclosporina A na via de transdução de sinal do Fator de Crescimento de Nervo (NGF) em modelo *In vitro* de células neurais de gânglio da raiz dorsal de embriões de galinha. As culturas foram preparadas a partir de Gânglios da Raiz Dorsal (GRD) E10 suplementado com Meio Condicionado de Retina (MCR) de E9, tratados com Ciclosporina A por 48 horas. O acúmulo de NGF intracelular foi avaliado por imunofluorescência. O teste de viabilidade em culturas, na presença ou ausência de Ciclosporina A em concentrações de 1-40 μ M, foi realizado através do método de MTT. Os resultados mostraram um aumento da expressão de NGF induzido por Ciclosporina A. Devido NGF ser de grande importância na manutenção e desenvolvimento do SNP, o uso de Ciclosporina A pode tornar-se alvo de estudos para novas terapias.

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

ABSTRACT

Cyclosporin A is a potent chemical immunosuppressant originally introduced in the 1970s for use in solid organ transplants. It is classified as a transcription inhibitor of the first signal for T lymphocyte activation and its main effect is blocking activated nuclear T-cell factor (NFAT). This is due to Cyclosporin A binding to Cyclophilin, creating a complex that binds and inhibits the action of Calcineurin, an important second messenger of the Nerve Growth Factor (NGF) signal transduction pathway, causing NFAT hyperphosphorylation and negative regulation of NGF and its high affinity receptor, TrkA, and other factors that participate in the pathway. NFAT has until the present moment 5 isoforms (NFAT1-NFAT5). NFAT1-NFAT4 isoforms are Calcineurin dependent whereas NFAT5 is independent. In this work we aim to evaluate the effects of treatment with the immunosuppressant Cyclosporin A on NGF pathway *in vivo* and *in vitro* model of dorsal root ganglion neural cells of chicken embryos. Cultures were prepared from Dorsal Root Ganglia (DRG) E10 supplemented with E9 retinal conditioned medium (RCM), treated with Cyclosporin A for 48 hours. Accumulation of intracellular NGF was assessed by immunofluorescence. The viability test in cultures, in the presence or absence of Cyclosporin A at concentrations of 1-40 μ M, was performed using the MTT method. The results showed an increased expression of NGF induced by Cyclosporin A. Due to NGF have great importance in the maintenance and development of PNS, the use of Cyclosporin A may become the target of studies for new therapies.

Keywords: Cyclosporin A, NGF, NFAT, Dorsal root ganglia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CICLOSPORINA A (CSA)	3
1.2. FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO (NGF).....	4
1.3. FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS (NFAT)	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. METODOLOGIA	9
3.1. ANIMAIS	9
3.2. PLACAS DE CULTURA.....	9
3.3. PREPARAÇÃO DA CICLOSPORINA A	9
3.4. MEIO CONDICIONADO OBTIDO ATRAVÉS DE CULTURA DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA	10
3.5. OBTENÇÃO E CULTURA DE NEURÔNIOS PERIFÉRICOS.....	11
3.6. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE MTT .	12
3.7. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA NGF EM CÉLULAS NEURAIS	13
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. VIABILIDADE DE CÉLULAS NEURAIS E DA GLIA DE SCHWANN APÓS TRATAMENTO COM CICLOSPORINA A.....	15
5. DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso periférico (SNP) é responsável por levar e trazer informações do sistema nervoso central (SNC). As informações sensoriais são encaminhadas através de neurônios aferentes (sensoriais) que respondem a diferentes estímulos oriundos dos receptores sensoriais presentes ao longo do corpo e monitora continuamente as condições dos meios externo e interno (SILVERTHORN, 2010).

Lesões nos nervos periféricos são frequentes e provocam diferentes tipos de sintomas como dor, perda de tato, parestesias, e se o dano é irreversível, levam a sequelas que muitas vezes esses danos diminuem a qualidade de vida das pessoas acometidas. Lesões completas raramente apresentam recuperação sem intervenção cirúrgica (SEBBEN *et al.*, 2011)

Estudos mostram que a capacidade regenerativa do SNP é promovida por fatores neurotróficos, também conhecidos como fatores de crescimento. Essas proteínas atuam diretamente na proliferação e diferenciação de diferentes tipos celulares, sendo capazes de promover reparo tecidual e recuperação funcional (TERENGGHI, 1999; GORDON, 2009).

Fatores neurotróficos são estudados extensivamente por seus papéis no suporte a sobrevivência, proliferação e maturação em certos tipos de neurônios. Eles têm mostrado um aumento na regeneração neural, principalmente em doenças neurodegenerativas (XIAO e LE, 2016).

O primeiro fator neurotrófico identificado foi o Fator de Crescimento do Nervo (NGF). A ele foi associada a função de melhorar o crescimento de neurônios sensoriais e simpáticos em embriões de galinha. Descoberto há mais de 60 anos, tornou-se a mais pesquisada neurotrofina (COHEN; LEVI-MONTALCINI, 1956; SEBBEN, 2011; XIAO; LE, 2016).

O NGF é amplamente relacionado ao SNP, sendo considerado essencial para seu desenvolvimento e manutenção, assim como é de grande importância para manter a integridade funcional do SNC. A ação biológica do NGF é mediada por dois receptores, seu receptor de alta afinidade, tirosino cinase A (TrkA), e o receptor de neurotrofina, a glicoproteína transmembrana p75 (p75NTR), seu receptor de baixa afinidade (ALOE *et al.*, 2012; 2015; DECHANT e BARDE, 2002).

TrkA é expresso em vários órgãos e tecidos, como o SNP e SNC. Quando o mesmo é ativado por NGF, torna-se capaz de estimular diversas vias de sinalização, dentre elas a via

dependente de Ca^{2+} /Calcineurina (HIROSE et al., 2015; KAPLAN e MILLER, 1997; KIM M-S. et al., 2014).

A Calcineurina é uma fosfatase que possui sua atividade fortemente regulada pelo complexo Ca^{2+} /Calmodulina. Quando ativada por este complexo, a Calcineurina desfosforila membros da família NFAT, possibilitando a eles translocar-se para dentro do núcleo e ativar a expressão de seus genes alvo (FU et al., 2015; KIPANYULA; KIMARO; ETET, 2016).

Existem algumas drogas com a capacidade de inibir o processo de transdução de sinal, dentre elas encontra-se a Ciclosporina A (CsA), que possui ação imunossupressora através da inibição de Calcineurina, conseqüentemente, impedindo a desfosforilação de NFAT e a transcrição de genes, como a interleucina (IL)-2, importante mediador da ativação imune e proliferação de células T. (BARBARINO et al., 2013; ECKSTEIN et al., 2005)

A CsA é amplamente utilizada como um imunossupressor em pacientes transplantados, reduzindo a probabilidade de rejeição aguda, assim como em pacientes acometidos por doenças autoimunes (ARMSTRONG e OELLERICH, 2001; PONTICELLI, 2005).

Apesar de inicialmente a CsA ter como foco o sistema imunológico, sua ação não se limita apenas a este sistema. Em 2006, Sena e colaboradores utilizaram a Ciclosporina A no tratamento de pacientes com hanseníase, tanto as formas multibacilares quanto as paucibacilares, que apresentavam secreção de níveis elevados de autoanticorpos contra o NGF (anti-NGF), e em conseqüência a esses autoanticorpos, observou-se a diminuição dos níveis de NGF, caracterizando-se um quadro de neuropatia nesses pacientes.

O trabalho demonstrou a ação inibitória de anti-NGF *in vitro* e *in vivo* através do uso de CsA nestes pacientes, com conseqüente melhoria motora e sensorial. Estes dados sugerem um papel neuroprotetor que pode estar além da supressão da produção de autoanticorpos anti-NGF, controlando hiperalgesia e possivelmente promovendo plasticidade neural em decorrência da melhora no sistema motor.

A manutenção do SNP está intimamente relacionada aos níveis de NGF, o trabalho propõe o estudo de células neurais do SNP sob tratamento com diferentes concentrações de Ciclosporina A na modulação do NGF.

1.1. CICLOSPORINA A (CSA)

A CsA, um potente imunossupressor, é um decapeptídeo fúngico originado do *Tolypocladium inflatum gams*. Foi introduzido na década de 70 para provável uso em transplante de órgãos sólidos, no entanto, problemas surgiram relacionados a dosagem e absorção imprecisa, assim como efeitos colaterais negativos, especialmente a nefrotoxicidade. Dessa forma seu uso efetivo ocorreu apenas no início da década de 80, fato que revolucionou o transplante de órgãos com reduzida rejeição. Desde então, vem melhorando substancialmente a sobrevida de doentes, pacientes submetidos a transplantes cardíaco, renal, hepático, pancreático e pulmonar (GARCIA et al., 2004). Atualmente seu mecanismo de ação relacionado a imunotoxicidade é bem descrito (SCHMEITS et al., 2015)

Sua ação imunossupressora depende da formação de um complexo com seu receptor citoplasmático, a Ciclofilina, que se liga e inibe a proteína Calcineurina, fosfatase regulada por cálcio responsável por regular a translocação nuclear do fator nuclear de células T ativado (NFAT). NFAT hiperfosforilado torna-se incapaz de deslocar-se para o núcleo, onde se liga à região promotora de genes como interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4) e interferon gama ($INF\gamma$) (MATSUDA e KOYASU, 2000). A CsA é classificada como inibidor de transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T e seu principal efeito é o bloqueio de NFAT (GARCIA et al., 2004).

Além de sua ação imunossupressora que já é bem caracterizada, estudos tem demonstrado que a CsA possui outros efeitos como, neuroprotetor e cardioprotetor. Assim, seus mecanismos alternativos têm se tornado alvo de pesquisas em sistemas correlacionados (KIM S.Y. et al., 2014; LESHNOWER et al., 2008; MAZZEO et al., 2008; SENA et al., 2006).

1.2. FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO (NGF)

NGF foi a primeira neurotrofina descoberta nos anos 60, pela neurologista Rita Levi-Montalcini, sendo a ele atribuída a característica de promover o crescimento e sobrevivência de neurônios sensoriais e simpáticos de mamíferos, incluindo humanos (COHEN; LEVI-MONTALCINI, 1956).

NGF faz parte de uma família de proteínas, denominadas neurotrofinas. Além de NGF, a família das neurotrofinas é composta pelo Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Neurotrofina 3 (NT-3) e Neurotrofina 4, também conhecida como Neurotrofina 5 em ratos (NT-4/5) (XIAO e LE, 2016).

A ação de NGF é mediada por dois receptores de membrana, seu receptor de alta afinidade, TrkA e o de baixa afinidade, p75NTR (HIROSE et al., 2015). As neurotrofinas interagem com receptores Trk específicos, entretanto, todas ligam-se ao receptor de neurotrofinas p75NTR com semelhante afinidade (MEEKER e WILLIAMS, 2015; REICHARDT, 2006).

NGF é essencial para o desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso periférico. Diversos estudos demonstram que NGF possui ação protetora não apenas na sobrevivência de nervos periféricos em degeneração, mas também na regulação de neurotransmissores e síntese de neuropeptídeos em neurônios sensoriais e simpáticos. Sua ação é essencial para manter a integridade funcional de neurônios colinérgicos no sistema nervoso central (ALOE et al., 2012; 2015).

O NGF está diretamente relacionado ao ciclo celular, influencia múltiplas funções dependendo do contexto celular e dos receptores específicos expressados e ativados, podendo de tal forma induzir ou inibir proliferação celular. Seus efeitos em neurônios são bem caracterizados e variam desde manutenção e diferenciação via TrkA até a ativação de apoptose via p75 (Figura 1) (CRAGNOLINI; VOLOSIN; HUANG, 2012).

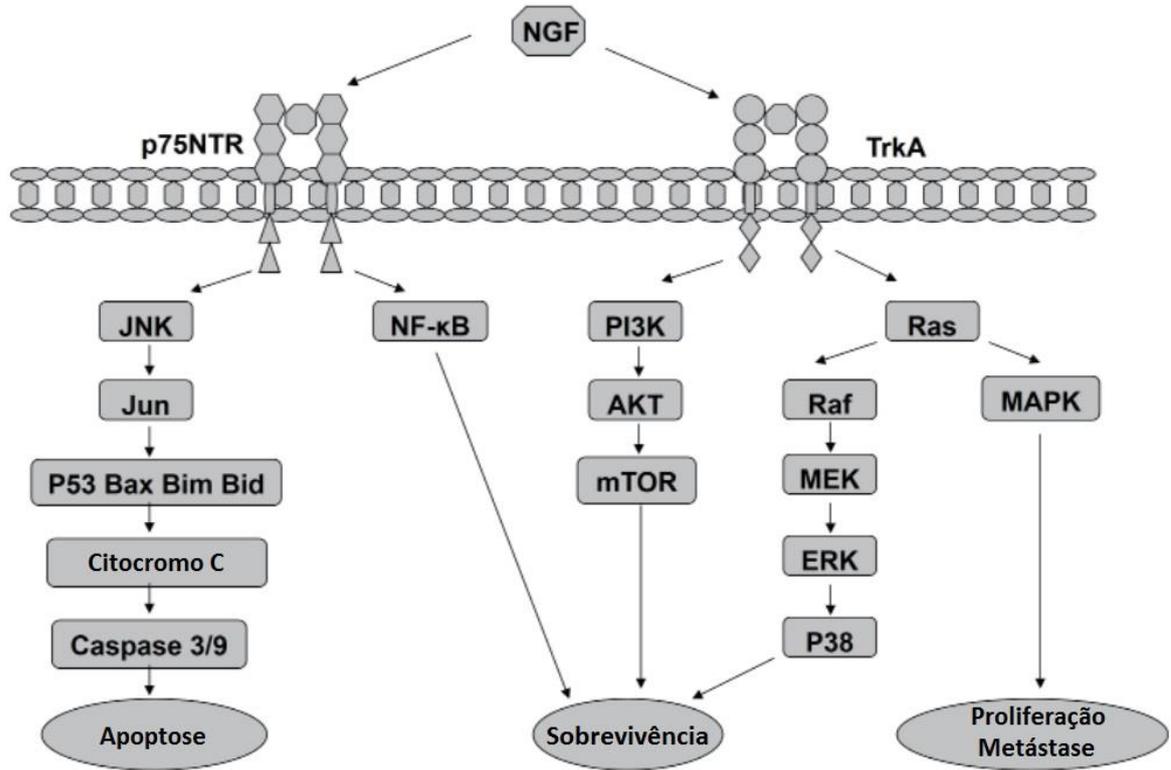


Figura 1 - Vias de sinalização de NGF. Vias TrkA e p75NTR. Setas representam modificação estimulatória. Adaptado de (WANG et al., 2014).

1.3. FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS (NFAT)

NFAT é uma família de fatores de transcrição, o primeiro membro identificado foi NFAT1, inicialmente identificado como um fator nuclear rapidamente induzível essencial para a expressão de IL-2 em células T ativadas (SHAW et al., 1988).

NFAT1 é principalmente expresso em células T e em diversas células do sistema imune mas já foi detectado em outras células, inclusive em neurônios (HO et al, 1994). Recentemente foi demonstrado que NFAT1 controla diretamente a expressão de Cinase Dependente de Ciclina (CDK4), cinase que desempenha um papel essencial no ciclo celular, à nível transcricional (BAKSH et al., 2002).

Com o passar dos anos, diversos estudos demonstraram que as proteínas NFAT regulam a expressão de diversos genes, incluindo proteínas sinalizadoras, citocinas, receptores de superfície celular e proteínas relacionadas ao ciclo celular e processo de apoptose. Atualmente, cinco isoformas já foram descritas e caracterizadas como membros da família NFAT: NFAT1 (NFATp; NFATc2); NFAT2 (NFATc; NFATc1); NFAT3 (NFATc4); NFAT4 (NFATx; NFATc3) e NFAT5 (TonEBP; OREBP) (MACIAN, 2005; VIOLA et al., 2005).

As isoformas NFAT1-NFAT4 são reguladas através da via de sinalização Cálcio/Calcineurina, conseqüentemente sendo reguladas por inibidores de Calcineurina, como a Ciclosporina A (Figura 2). NFAT5 é independente desta via, sendo este regulado por estresse hiperosmótico (MACIAN, 2005; VIOLA et al., 2005).

A regulação negativa de NFAT ocorre devido a ação de diferentes proteínas cinases como, a cinase de caseína I (CKI). Estudos sugerem que a atividade de NFAT em neurônios pode ser regulada por NGF através da ativação da via PI3K/Akt que inativa a cinase sintase de glicogênio 3 β (GSK3 β), responsável por fosforilar NFAT e promover sua exportação do núcleo (KIM M-S et al., 2014; ZHU et al., 1998).

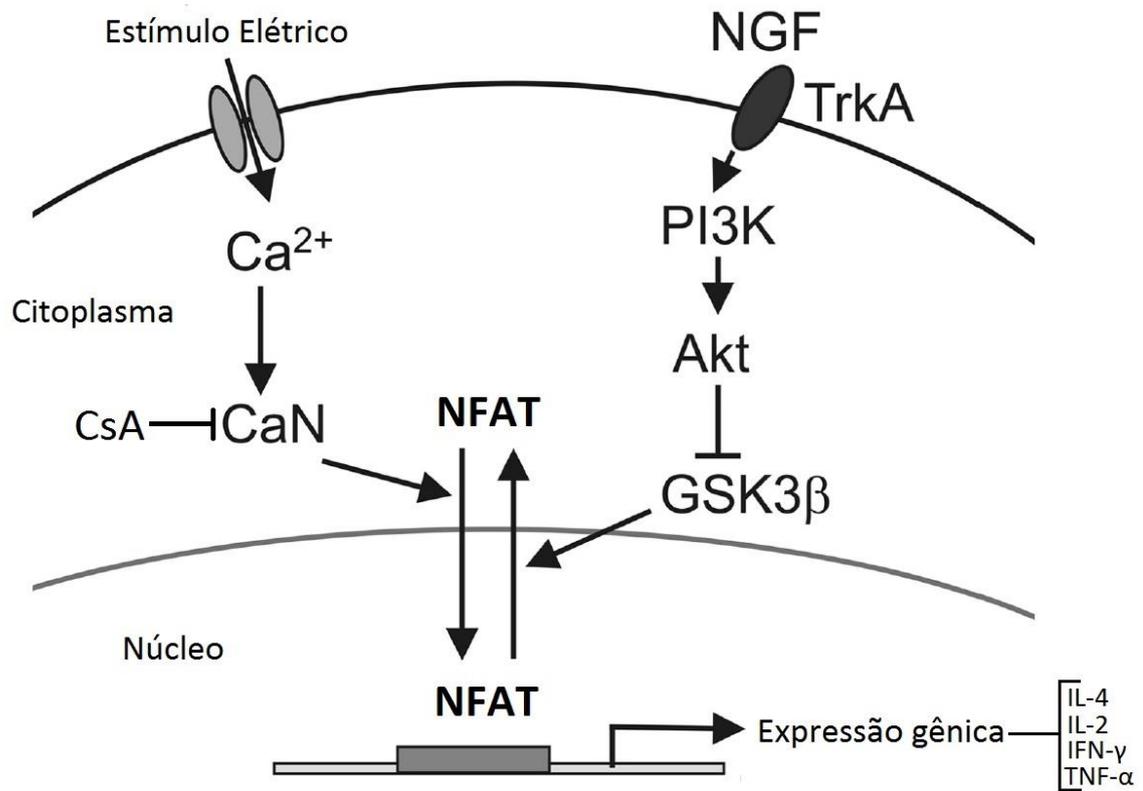


Figura 2 - Regulação de NFAT por Ciclosporina A e GSK3 β através de diferentes vias do fator de transcrição. Adaptada de (KIM M-S et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos do tratamento com o imunossupressor Ciclosporina A na modulação do Fator de Crescimento de Nervo (NGF) em modelo *In vitro* de células neurais de gânglio da raiz dorsal de embriões de galinha.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade celular em culturas enriquecidas de neurônios e células da glia de Schwann, tratadas com diferentes concentrações de Ciclosporina A;
- Avaliar imunocitoquimicamente a captação de Fator de Crescimento de Nervo (NGF) em culturas enriquecidas de neurônios tratadas com diferentes concentrações de Ciclosporina A.

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ovos embrionados de galinha *White Leghorn* classificados segundo estagiamento (HAMBURGER; HAMILTON, 1951), provenientes da Granja Makaru - Ananindeua - Pará, que chegam ao laboratório no estágio de E7 e são mantidos em chocadeira digital, com controle de temperatura e umidade até o dia do experimento (E10).

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da UFPA (CEPAE -UFPA) sob o parecer 85/15.

3.2. PLACAS DE CULTURA

Foi realizada uma modificação eletrostática na superfície dos poços das placas de cultura através de incubação com uma solução de poli-L-lisina (10µg/ml) por aproximadamente 12h (overnight), com o objetivo de melhorar a adesão das células neurais ao plástico das placas de cultura. Após o período de incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS estéril (pH 7.2-7.4) e secas dentro da capela de fluxo laminar por 30 minutos.

Posteriormente as placas foram tratadas com solução de Laminina (20 µg/ml), para proporcionar a adesão das células neurais, em um volume suficiente para cobrir a superfície de contato com as células, por no mínimo 2 horas em estufa úmida com 5% CO₂. O excesso de solução de laminina foi aspirado para então ser realizado o plaqueamento.

O mesmo tratamento foi realizado em lamínulas utilizadas para avaliação das células por imunofluorescência.

3.3. PREPARAÇÃO DA CICLOSPORINA A

O composto utilizado foi adquirido através da Sigma Aldrich (Código 80688). Trata-se de um peptídeo hidrofóbico cíclico com estrutura química definida, extraído do fungo *Tolyocladium inflatum gams*, (DYNAROWICZ-ŁĄTKA; WNETRZAK; MAKYŁA-JUZAK, 2015) inserido na clínica com finalidade imunossupressora, e age diretamente em linfócitos T.

Para o presente trabalho, a substância altamente lipofílica foi diluída inicialmente em solvente DMSO. Em seguida diluído em DMEM, que foi mantido em solução estoque e solução de uso em freezer -20 para uso posterior.

A substância foi usada para tratamento das culturas com células dissociadas. Foram usadas diferentes concentrações (1, 10 e 40 μ M), onde 40 μ M é a concentração máxima atingida no cérebro, levando em consideração a dose máxima segura de 5mg/kg (BROPHY et al., 2013). O cálculo foi feito para que a droga atingisse a concentração final na presença das células e do MCR.

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

O preparo do meio condicionado, rico em fatores de crescimento como o NGF e outras neurotrofinas foi executada de acordo com o protocolo de cultura de células retinianas de embrião de galinha (REIS et al., 2002). Por ser rico em NGF e outras neurotrofinas, utilizamos o meio condicionado como alternativa de substituição do NGF comercial nos tratamentos, tornando os experimentos mais viáveis e baratos.

Utilizamos ovos embrionados com 9 dias de desenvolvimento (E9). Após enucleação do globo ocular dos embriões em meio livre de cálcio (CMF), e microdissecação, a retina foi dissociada em solução de Tripsina concentrada a 0,05% por 12 minutos a 37°C com leve agitação a cada 4 minutos durante este período, a fim de romper proteínas da matriz extracelular do tecido através de sua propriedade proteolítica, facilitando a dissociação tecidual.

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

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

Após este período de exclusão de neurônios, as células gliais, produtoras de fatores neurotróficos, foram mantidas em meio DMEM acrescido de 10% de FBS, reposto em

intervalos de três dias, coletando-se esses meios de cultura da placa enriquecidos com fatores de crescimento produzidos durante esse período. Após três dias de condicionamento o meio foi coletado, filtrado em filtro estéril de 0,22 μ m e armazenado em freezer à -20°C para posterior utilização.

3.5. OBTENÇÃO E CULTURA DE NEURÔNIOS PERIFÉRICOS

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

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

Duas metodologias foram adotadas para a análise da ação da CsA: culturas mistas preparadas a partir de gânglios dissociados, com células da glia e neurônios, e células enriquecidas em populações Neurais ou Gliais, avaliando o efeito do fármaco em cada população celular.

O estudo da ação da CsA em células isoladas foi feito após os gânglios dissecados imersos em meio DMEM serem incubados em Tripsina (Concentração final para 0,05%) por 12 minutos a 37°C com leve agitação a cada 4 minutos, facilitando assim a dissociação das células neuroblásticas que compõem o gânglio. Após a dissociação por tripsina, os gânglios foram lavados através de quatro centrifugações (1000 rpm por 30 segundos), duas vezes com DMEM e duas vezes com DMEM + 10% FBS, foram centrifugados e dissociados mecanicamente em aproximadamente 1,5mL de meio.

Após este processo, fibroblastos, neurônios e glia de schwann foram separados usando um processo de decantação, depositando cuidadosamente o material celular em uma bureta preenchida com 60 ml de meio DMEM pré-resfriado a 4°C (Overnight ou no mínimo 12 horas), suplementado com 10% FBS.

O uso da bureta tem a finalidade de separar por sedimentação diferencial, com base na gravidade e na complexidade dos corpos celulares, que diferem, por exemplo, de grumos formados por células mal dissociadas e restos teciduais, que se mantem em uma região diferente das células dissociadas e viáveis.

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

Após 40 minutos de decantação, frações de aproximadamente 5 ml com as respectivas células separadas foram coletadas, centrifugadas e resuspensas em meio DMEM para posterior plaqueamento em placas de cultura estéril e pré-tratadas.

Após adesão das células à placa, suplementa-se o meio DMEM + 10% de FBS com meio condicionado de retina na proporção de 50% DMEM 50% Meio Condicionado de Retina nos poços que serão tratados com a CsA. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ por 48 ou 72 horas.

A diferenciação entre grupos celulares foi realizada através de microscopia óptica, de acordo com a característica morfológica de cada tipo celular (corpo celular bem definido em neurônios, com presença de dendritos e axônios, e células espalhadas, características de células gliais).

3.6. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE MTT

Para verificar a viabilidade das células expostas à Ciclosporina A em diversas concentrações, foi utilizado o método fotolorimétrico do MTT (3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio bromídico), onde células viáveis reduzem o composto MTT de coloração amarela, em Formazam, de cor violeta, podendo este último ser quantificado por espectrofotometria em leitor de microplaca, em comprimento de onda de 570 nm (MOSMANN, 1983).

Após 48h de tratamento com a Ciclosporina A, o meio de cultura foi retirado e substituído pela solução de MTT diluída em meio DMEM (0,5mg/ml). Após o período de reação de 2h, a solução de MTT foi retirada e foi adicionado DMSO, homogeneizando a solução

em contato com as células para que houvesse a completa dissolução dos cristais de formazam. A leitura foi feita em leitor de microplacas Biotek, modelo ELx800.

3.7. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA NGF EM CÉLULAS NEURAIS

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

Após o tratamento com a Ciclosporina A, as células foram fixadas usando solução a 4% de paraformaldeído por 10 minutos. Posteriormente as células fixadas foram lavadas com solução tampão fosfato (pH 8.0), seguido de permeabilização da membrana celular com Triton-X100 (0,3%) por 10 minutos, detergente surfactante que age na membrana celular e é responsável pela facilitação da marcação de proteínas intracelulares.

O bloqueio dos sítios inespecíficos dos grupos aldeído do fixador paraformaldeído foi realizado com Cloreto de Amônio (NH₄Cl) por 2 horas. A lavagem com solução de albumina de soro bovino (BSA, 3%) por 10 minutos foi efetuada com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas. Os anticorpos primários (Anti-NGF, anti-rabbit, 1:100, Santa Cruz) e (GFAP C-19, anti-goat, 1:100, Abcam) foram incubados por 2 horas em câmara úmida, enquanto que o anticorpo secundário fluorescente (Alexa Fluor 488 anti-rabbit e anti-goat) foi incubado por 2 horas em temperatura ambiente.

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

As lâminas foram montadas usando *ProLong® Gold antifade* (P-36934-Invitrogen), evitando fotodegradação e prolongando a fluorescência na molécula alvo. As mesmas foram armazenadas em freezer devidamente protegidas da luz, para posterior análise por microscópio de fluorescência e confocal (LSM5 Pascal, Zeiss).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism versão 5.0.0, usando o Teste T de Student para mesma amostra ou Análise de variância (Anova) para comparação entre os grupos, seguidos de um pós teste (Tukey). A significância estatística foi dada quando $p \leq 0.05$ e foi determinado para o estudo dados amostrais com $n=3$.

4. RESULTADOS

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

Realizamos o teste de viabilidade celular em culturas enriquecidas com neurônios, glias, assim como em cultura mista (neurônios e glia), de acordo com as condições anteriormente citadas (Item 3.6).

Em culturas enriquecidas com neurônios e culturas enriquecidas com glia, o tratamento com Ciclosporina A em diferentes concentrações demonstrou diferença significativa na viabilidade entre os grupos controle FBS e os grupos tratados. Em neurônios a maior diferença ocorreu entre FBS e CsA 1 e 10 μ M. A concentração de 10 μ M também apresentou diferença significativa com o grupo MCR e CsA 40 μ M.

Em culturas mistas, o grupo NGF apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle FBS, assim como o esperado. Apesar de nosso grupo de células tratadas apenas com MCR não ter apresentado resultados esperados, ao compararmos o grupo NGF com os grupos tratados com Ciclosporina A, notamos que os grupos NGF e CsA 10 não apresentaram diferença significativa.

Viabilidade Celular

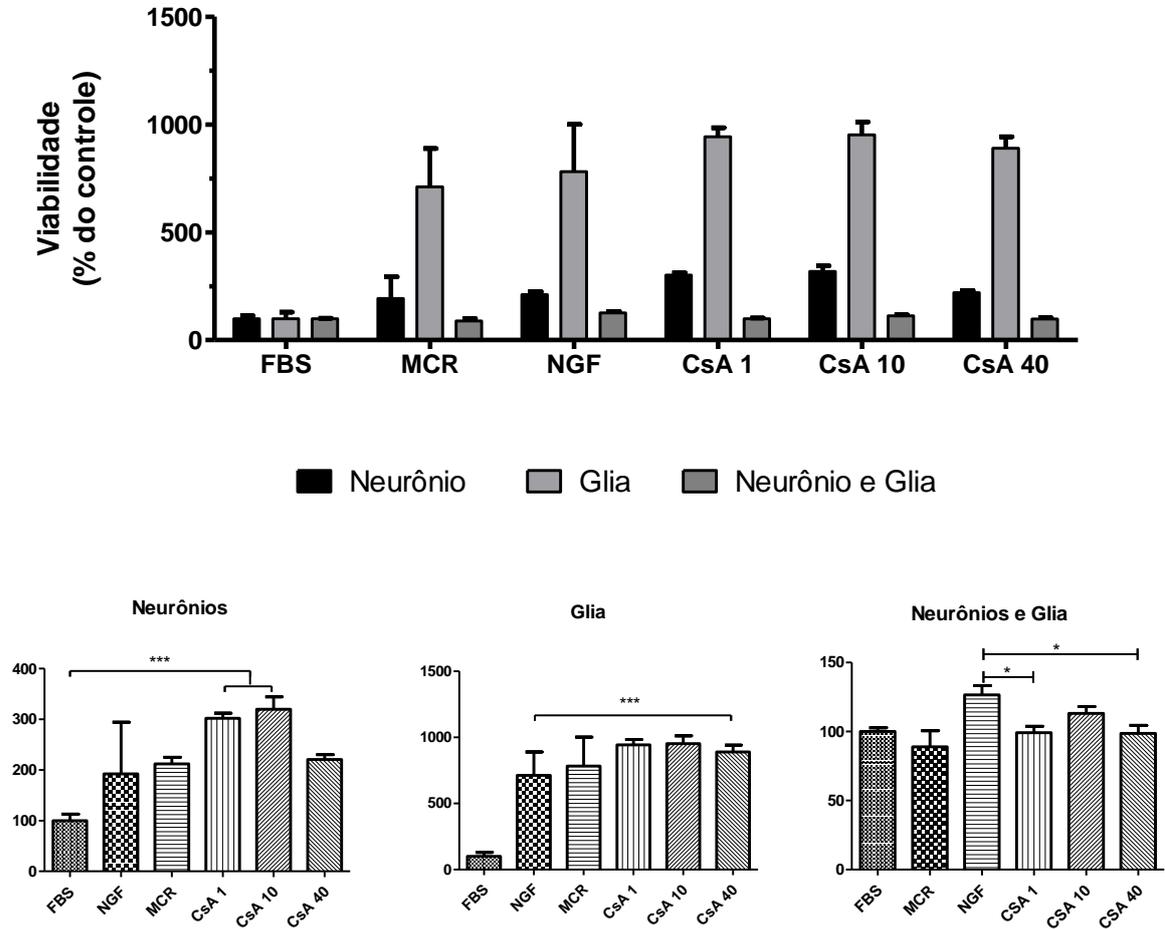


Figura 3 - Viabilidade Celular em culturas enriquecidas de neurônio, glia e mista (neurônios e glia) após tratamento por 48h com CsA. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido por pós teste de Tukey. Em culturas de neurônio houve diferença significativa entre FBS e os grupos CsA 1 e 10 (***) e entre FBS e CsA 40 (*). Em culturas de glia houve diferença significativa entre FBS e todos os grupos tratados com CsA (***) . Em cultura mista houve diferença entre NGF e os grupos CsA 1 e 40 (*). (* $P < 0,05$; *** $P < 0,0001$).

4.1. AVALIAÇÃO DE NGF EM NEURÔNIOS

Realizamos através de imunofluorescência, marcação de NGF com o intuito de avaliar se o tratamento com Ciclosporina A nas concentrações $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ e $40\mu\text{M}$, aumenta a expressão de NGF. Para confirmar se nossa cultura era realmente enriquecida em neurônios, fizemos um grupo controle com marcação para glia utilizando anticorpo GFAP (Figura 5).

Após 48h de tratamento com Ciclosporina A e fatores neurotróficos, realizamos marcação através da técnica de imunofluorescência com a utilização de anticorpos anti-NGF.

Observamos que as culturas mantidas em DMEM suplementado com 10% FBS + MCR tratadas com as diferentes concentrações de Ciclosporina A, expressam maior quantidade de NGF quando comparadas às células mantidas apenas em 100% MCR.

No grupo tratado com CsA $1\mu\text{M}$ podemos observar um acúmulo de NGF próximo aos neurônios, já nos grupos tratados com $10\mu\text{M}$ e $40\mu\text{M}$, a presença de NGF já pode ser observada também nos neuritos.

Dados anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que neurônios tratados com CsA em diferentes concentrações, expressam maiores quantidade de TrkA quando comparados a neurônios sem tratamento com CsA.

Dessa forma, podemos assumir que nas concentrações de $10\mu\text{M}$ e $40\mu\text{M}$ de CsA, NGF é internalizado pelos neurônios devido a um aumento na expressão de seu receptor TrkA induzido por CsA.

Em nosso grupo controle, células mantidas com 100% de DMEM + 10% FBS, a expressão de NGF não foi significativa. Estes dados nos mostram que o tratamento com Ciclosporina A provavelmente induz a glia, produtora de fatores neurotróficos, a expressar mais NGF e que a captação deste NGF por neurônios é maior.

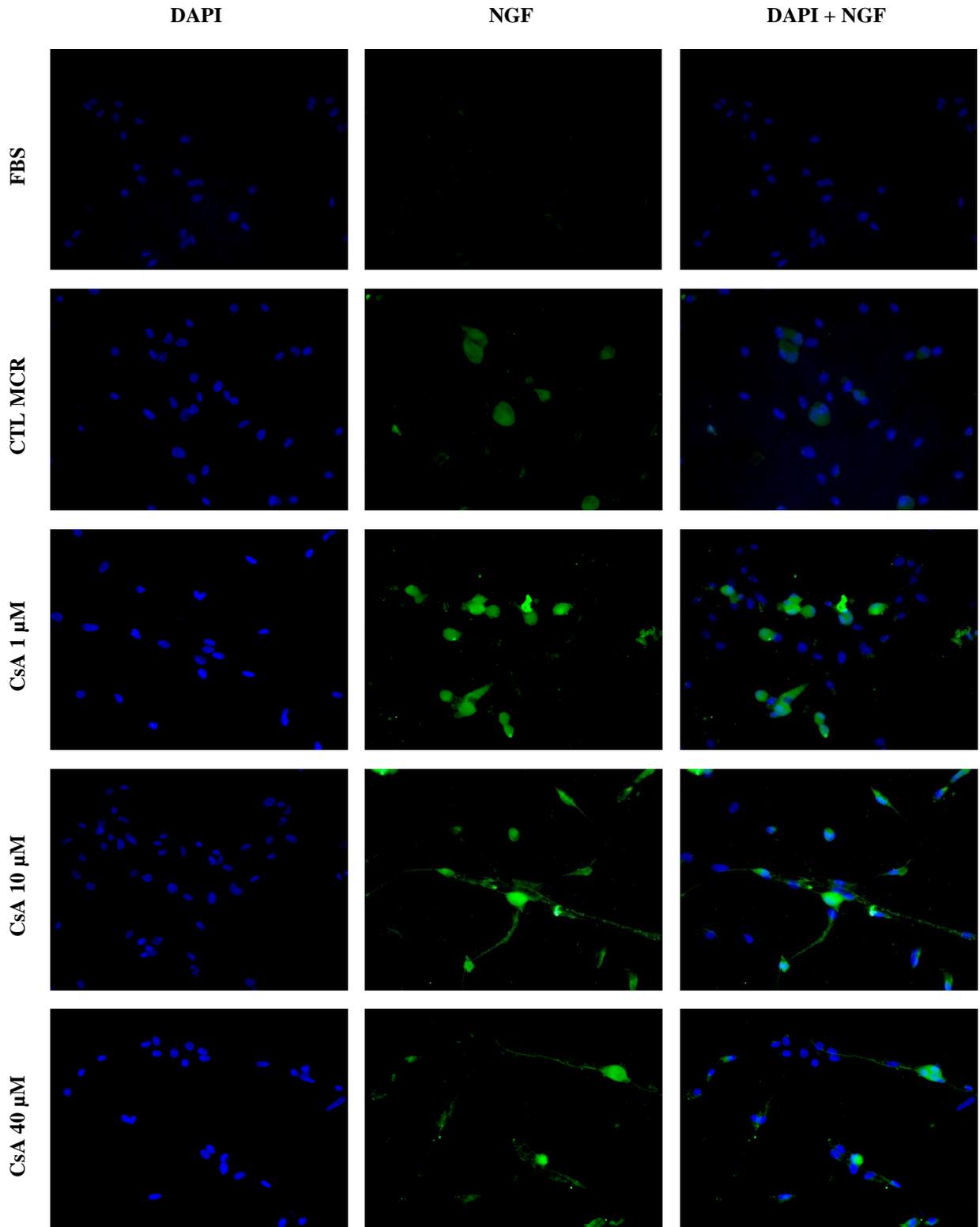


Figura 4 - Imunofluorescência para NGF em neurônios: Marcação com anticorpos para NGF (verde). Núcleo celular marcado com DAPI (azul). Microscópio de Fluorescência – Zeiss/Zen Blue. Aumento 40X.

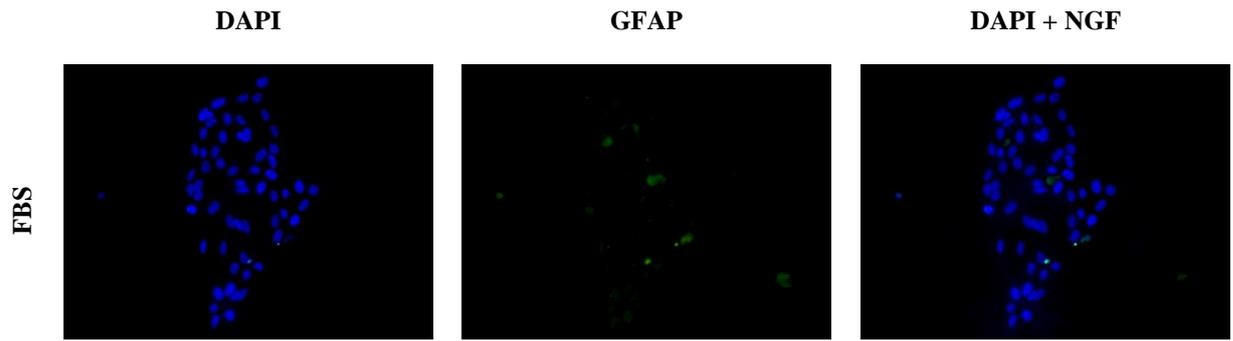


Figura 5 - Imunofluorescência para Glia: Marcação com anticorpos para GFAP (verde). Núcleo celular marcado com DAPI (azul). Microscópio de Fluorescência – Zeiss/Zen Blue. Aumento 40X.

5. DISCUSSÃO

A Ciclosporina A é um imunossupressor que possui um mecanismo de ação muito bem descrito em linfócitos T, visto que é caracterizada como inibidor da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T. Ciclosporina A inibe a fosfatase Calcineurina consequentemente levando à inibição da transcrição de NFAT. Igualmente linfócitos T, células neurais também expressão membros da família NFAT e são importantes para regulação de processos fisiológicos no sistema nervoso.

Neste trabalho procuramos elucidar a ação da Ciclosporina A no sistema nervoso periférico. Diversos estudos têm demonstrado o papel da Ciclosporina A em órgãos e tecidos que não estão diretamente relacionados ao sistema imune (CHANG; JOHNSON, 2002; KIM S.Y. et al., 2014; LESHNOWER et al., 2008; MAZZEO et al., 2008; SENA et al., 2006), evidenciando mecanismos alternativos pelos quais este fármaco atua.

Em estudo anterior publicado por nosso grupo de pesquisa, resultados obtidos demonstraram que, o tratamento com Ciclosporina A em pacientes com hanseníase em estágios reacionais crônicos, promoveu melhora sensorial e motora. Isto deve ter ocorrido em função do tratamento inibir a secreção de auto anticorpos contra NGF (anti-NGF), que promovia um quadro de neuropatia nestes pacientes. Em consequência aos níveis reduzidos de anti-NGF, a dor neuropática foi controlada, e após o período de tratamento, observou-se a completa ausência de dores em 11 de 12 pacientes (SENA et al., 2006). Estes resultados demonstram que a Ciclosporina A exerce um importante papel na plasticidade e no controle da dor neural periférica.

Em nosso trabalho realizamos tratamento com 1, 10 e 40 μ M de Ciclosporina A em culturas enriquecidas de neurônios, glia de Schwann e mistas (neurônios e glia), provenientes de gânglio da raiz dorsal de embriões de galinha. Fizemos também um grupo controle negativo (DMEM + 10% FBS), visto que os neurônios periféricos necessitam de fatores neurotróficos para seu desenvolvimento e manutenção, fizemos um grupo controle com 100% de meio condicionado de retina que é rico em neurotrofinas, assim como em NGF, e um grupo controle contendo NGF na concentração padrão encontrada na literatura, 50ng/ml.

Através da técnica de imunofluorescência observamos que o tratamento com Ciclosporina A, em todas as concentrações testadas, induz uma maior expressão de NGF em culturas enriquecidas de neurônios. Dados anteriores de nosso grupo de pesquisa revelaram que o tratamento com Ciclosporina A também induz a expressão de TrkA. Além disso, também já

foi demonstrado que Ciclosporina A induz a expressão de NGF em células epiteliais da córnea de humanos (LEE et al., 2011).

Na concentração de 1 μ M podemos observar o acúmulo de NGF induzido por Ciclosporina A próximo aos corpos celulares dos neurônios (Figura 3), já nas concentrações de 10 e 40 μ M, NGF também pode ser visualizado em axônios. Levando em consideração que o transporte de NGF se dá de forma retrógrada, ou seja, NGF é captado por axônios e conduzido para o corpo celular (CAMPENOT e MACINNIS, 2004), podemos assumir que devido à maior expressão de TrkA induzido por Ciclosporina A, NGF é mais facilmente internalizado pelos neurônios. A concentração de 10 μ M promoveu uma maior expressão de NGF quando comparada aos outros grupos, enquanto que a concentração de 40 μ M, apesar de também promover o transporte do NGF para o corpo celular, induz menor viabilidade. Isto pode ser confirmado a partir da observação do menor número de células marcadas na imunofluorescência, assim como nos resultados obtidos através dos testes de viabilidade.

Os testes de viabilidade realizados através da técnica de MTT demonstraram que o tratamento com as diferentes concentrações de Ciclosporina A em culturas enriquecidas de neurônios e culturas enriquecidas de glia, promove maior viabilidade visto que houve diferença significativa entre os grupos controle FBS e todos os grupos tratados com Ciclosporina A. Ao compararmos os 3 tipos de culturas, podemos ver que a glia é o tipo celular mais afetado pelo tratamento, nos levando a acreditar que a ação neuroprotetora induzida pela Ciclosporina A é proveniente da glia.

A partir destes dados, podemos inferir que a Ciclosporina A induz a expressão de NGF e ação neuroprotetora proveniente da glia, e que na concentração de 10 μ M essa ação é mais expressiva, promovendo a viabilidade celular em culturas enriquecidas de neurônios, glia e culturas mistas.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, chegamos à conclusão de que a expressão de NGF em células neurais do sistema nervoso periférico é induzida por Ciclosporina A de maneira dose-dependente, e que NGF induzido por Ciclosporina A promove maior viabilidade celular. Os mecanismos exatos de como ocorre a indução de NGF por Ciclosporina A ainda devem ser investigados.

Estes dados suportam a hipótese de que a Ciclosporina A, além de imunossupressor, exerce um papel de neuromodulador no sistema nervoso periférico. Isto nos mostra que o estudo de seus mecanismos alternativos é um caminho para novas aplicações clínicas.

7. REFERÊNCIAS

- ALOE, L.; ROCCO M. L.; BALZAMINO, B. O. et al. Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. **Current Neuropharmacology**, **13**: 294-303, 2015.
- ALOE, L.; ROCCO, M. L.; BIANCHI, P. et al. Nerve Growth Factor: From the Early Discoveries to the Potential Clinical Use. **Journal of Translational Medicine**, **10**: 239, 2012.
- ARMSTRONG, V. W.; OELLERICH, M. New Developments in the Immunosuppressive Drug Monitoring of Cyclosporine, Tacrolimus, and Azathioprine. **Clinical Biochemistry**, **34**: 9-16, 2001.
- BAKSH, S.; WILD, H. R.; FRASER-ABEL, A. A. et al. NFATc2-Mediated Repression of Cyclin-Dependent Kinase 4 Expression. **Molecular Cell**, **10** (5): 1071-1081, 2002.
- BARBARINO, J. M.; STAATZ, C. E.; VENKATARAMANAN, R. et al. PharmGKB Summary: Cyclosporine and Tacrolimus Pathways. **Pharmacogenet Genomics**, **23** (10): 563-585, 2013.
- BROPHY, G. M.; MAZZEO, A. T.; BRAR, S. et al. Exposure of Cyclosporin A in Whole Blood, Cerebral Spinal Fluid, and Brain Extracellular Fluid Dialysate in Adults with Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, **30** (17): 1484-1489, 2013.
- CAMPENOT, R. B.; MACINNIS B. L. Retrograde Transport of Neurotrophins: Fact and Function. **Journal of Neurobiology**, **58** (2): 217-229, 2004.
- CHANG, L. K.; JOHNSON, E. M. Cyclosporin A Inhibits Caspase-Independent Death of NGF-Deprived Sympathetic Neurons: A Potential Role For Mitochondrial Permeability Transition. **Journal of Cell Biology**, **157** (5): 771-781, 2002.
- COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated From Snake Venom. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **42** (9): 571-574, 1956.
- CRAGNOLINI, A. B.; VOLOSIN, M.; HUANG, Y. et al. Nerve Growth Factor Induces Cell Cycle Arrest of Astrocytes. **Developmental Neurobiology**, **72** (6): 766-776, 2012.
- DECHANT, G.; BARDE, Y-A. The Neurotrophin Receptor p75(NTR): Novel Functions and Implications for Diseases of the Nervous System. **Nature Neuroscience**, **5** (11): 1131-1136, 2002.

- DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P.; WNETRZAK, A.; MAKYŁA-JUZAK, K. Cyclosporin A in Membrane Lipids Environment: Implications for Antimalarial Activity of the Drug--The Langmuir Monolayer Studies. **The Journal of Membrane Biology**, **248** (6):1021-1032, 2015.
- ECKSTEIN, L. A.; VAN QUILL, K. R.; BUI, S. K. et al. Cyclosporin A Inhibits Calcineurin/Nuclear Factor of Activated T-Cells Signaling and Induces Apoptosis in Retinoblastoma Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, **46** (3): 782-790, 2005
- FU, C.; ZHANG, J.; ZHENG, Y. et al. Binding of Calmodulin Changes the Calcineurin Regulatory Region to A less Dynamic Conformation. **International Journal of Biological Macromolecules**, **79**: 235-239, 2015.
- GARCIA, S. C.; LOPES, L. S.; SCHOTT, K. L. et al. Ciclosporina A e Tacrolimus: Uma Revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, **40** (6): 393-401, 2004.
- GORDON, T. The Role of Neurotrophic Factors in Nerve Regeneration. **Neurosurgical focus**, **26** (2): E3, 2009.
- HIROSE, M.; KURODA, Y.; MURATA, E. NGF/TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain. **Pain Practice: The Official Journal of World Institute of Pain**, **16** (2): 175-182, 2016.
- HO, A. M.; JAIN, J.; RAO, A. et al. Expression of the transcription factor NFATp in a neuronal cell line and in the murine nervous system. **The Journal Of Biological Chemistry**, **269** (45): 28181-28186, 1994.
- KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Signal Transduction by the Neurotrophon Receptors. **Current Opinion in Cell Biology**, **9** (2): 213-221, 1997.
- KIM, M-S.; SHUTOV, L. P.; GNANASEKARAN, A. et al. Nerve Growth Factor (NGF) Regulates Activity of Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) in Neurons via the Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt-Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, **289** (45): 31349-31360, 2014.
- KIM, S. Y.; SHIM, M. S.; KIM, K-Y. et al. Inhibition of Cyclophilin D by Cyclosporin A Promotes Retinal Ganglion Cell Survival by Preventing Mitochondrial Alteration in Ischemic Injury. **Cell Death and Disease**, **5** (3): e1105, 2014.
- KIPANYULA, M. J.; KIMARO, W. H.; ETET, P. F. S. The Emerging Roles of the Calcineurin-Nuclear Factor of Activated T-Lymphocytes Pathway in Nervous System Functions and Diseases. **Journal of Aging Research**, **2016**: 5081021, 2016.

LESHNOWER, B. G.; KANEMOTO, S.; MATSUBARA, M. Cyclosporine Preserves Mitochondrial Morphology After Myocardial Ischemia/Reperfusion Independent of Calcineurin Inhibition. **The Annals of Thoracic Surgery**, **86** (4): 1286-1292, 2008.

MACIAN, F. NFAT Proteins: Key Regulators of T-Cell Development and Function. **Nature Reviews. Immunology**, **5** (6): 472-484, 2005.

MATSUDA, S.; KOYASU, S. Mechanisms of Action of Cyclosporine. **Inmunopharmacology**, **47** (2-3): 119-125, 2000.

MAZZEO, A. T.; ALVES, O. L.; GILMAN, C. B. et al. Brain Metabolic and Hemodynamic Effects of Cyclosporin A After Human Severe Traumatic Brain Injury: A Microdialysis Study. **Achta Neurochirurgica**, **150** (10): 1019-1031, 2008.

MEEKER, R. B.; WILLIAMS K. S. The Neurotrophin Receptor: At the Crossroad of Neural Repair And Death. **Neural Regeneration Research**, **10** (5): 721-725, 2015.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, **65**: 55-63, 1983.

PONTICELLI, C. Cyclosporine: From Renal Transplantation to Autoimmune Diseases. **Annals of the New York Academy of Science**, **1051**: 551-558, 2005.

REICHARDT L. F. Neurotrophin-Regulated Signaling Pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society. Biological sciences**, **361** (1473): 1545-1564, 2006.

REIS, R. A. M.; SILVA, M. C. C.; MELLO, F. G. et al. Müller Glia Factors Induce Survival and Neuritogenesis of Peripheral and Central Neurons. **Brain Research**, **1205**: 1–11, 2008.

REIS, R. A. M.; SILVA, M. C. C.; SANTOS, N. E. L. et al. Sympathetic Neuronal Survival Induced by Retinal Trophic Factors. **Journal of Neurobiology**, **50** (1): 13–23, 2002.

SCHMEITS, P. C. J.; SCHAAP, M. M.; LUIJTEN, M. et al. Detection of the Mechanism of Immunotoxicity of Cyclosporine A in Murine in Vitro and in Vivo Models. **Archives of Toxicology**, **89** (12): 2325-2337, 2015.

SEBBEN, A. D.; COCOLICHIO F.; SCHMITT AP.V. et al. Efeito de Fatores Neurotróficos Sobre o Reparo de Nervo Periférico. **Scientia Medica**, **21** (2): 81-89, 2011.

SENNA, C. B. C.; SALGADO, C. G.; TAVARES, C. M. P. et al. Cyclosporine A Treatment of Leprosy Patients With Chronic Neuritis is Associated With Pain Control and Reduction in Antibodies Against Nerve Growth Factor. **Leprosy Review**, **77** (2): 121-129, 2006.

SHAW, J-P.; UTZ, P. J.; DURAND, D. B. et al. Identification of a Putative Regulator of Early T Cell Activation Genes. **The Journal of Immunology**, **241** (4862): 202-205, 1988.

SILVERTHORNE, D.U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2010. 992p.

TERENGGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of Anatomy**, **194** (1): 1–14, 1999.

VIOLA, J. P. B.; CARVALHO, L. D. S.; FONSECA, B. P. F. et al. NFAT Transcription Factors: From Cell Cycle to Tumor Development. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **38** (3): 335-344 ,2005.

WANG, W.; CHEN, J.; GUO, X. The Role of Nerve Growth Factor and its Receptors in Tumorigenesis and Cancer Pain. **Bioscience Trends**, **8** (2): 68-74, 2014.

XIAO, N.; LE, Q-T. Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, **64** (2): 89-99, 2016.

ZHU, J; SHIBASAKI, F.; PRICE, R. et al. Intramolecular Masking of Nuclear Import Signal on NF-AT4 by Casein Kinase I and MEKK1. **Cell**, **93** (5): 851-561, 1998.