

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



CARLOS VINÍCIUS ALMEIDA DE ASSIS

“EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO FATOR
NEUOTRÓFICO CILIAR E DA INIBIÇÃO DA
FOSFODIESTERASE IV SOBRE NEURÔNIOS DA MEDULA
LOMBAR DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO NERVOSA
PERIFÉRICA”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Carlos Vinícius Almeida de Assis
e aprovada pela Comissão julgadora.
Fábio Rogério

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rogério

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

As76e

Assis, Carlos Vinícius Almeida de

Efeitos da administração sistêmica do fator neurotrófico ciliar e da inibição da fosfodiesterase IV sobre neurônios da medula lombar de ratos submetidos à lesão nervosa periférica / Carlos Vinícius Almeida de Assis. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Fábio Rogério.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ratos neonatos. 2. Nervo ciático. 3. *Western immunoblotting*. I. Rogério, Fábio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Effects of systemic administration of ciliary neurotrophic factor and inhibition of phosphodiesterase IV in rat's lumbar spinal neurons after peripheral injury.

Palavras-chave em inglês: Neonate rats; Sciatic nerve; Western immunoblotting.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Fábio Rogério, Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Simone Aparecida Teixeira.

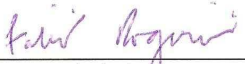
Data da defesa: 29/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 29 de março de 2010

BANCA EXAMINADORA

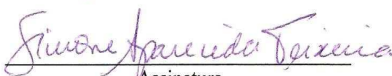
Prof. Dr. Fábio Rogério (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari


Assinatura

Profa. Dra. Simone Aparecida Teixeira


Assinatura

Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli

Assinatura

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Assinatura

Dedicatória

Eu dedico esse trabalho ao grande mestre professor Dr. Francesco Langone. Mestre que me ensinou os primeiros passos a serem dados na construção do conhecimento e do ato de fazer Ciência. Mestre que, com certeza, está feliz pela realização dessa etapa que começou com entusiasmo.

Muito obrigado por tudo, professor. Pelos momentos de alegrias, conversas, mesmo os momentos de dificuldade, discussões e reuniões. Foi o senhor quem me acolheu, me instruiu e me guiou. Obrigado por ter sido presente e ter me mostrado o que e como deve ser feito.

Além de mestre, foi um amigo, que me mostrou quando estava errado e não tinha receio de falar alto e me corrigir. Muito obrigado por mostrar o caminho a ser seguido profissionalmente e que, com certeza, me ajudará a ser uma pessoa melhor.

Muito obrigado por ter sido um guerreiro dedicado ao trabalho e a seus ideais. Por ter sido batalhador e perseverante, mesmo nos momentos finais de sua vida. Sempre se mostrou digno e respeitoso.

Ao grande mestre Francesco Langone dedico esse trabalho.

Minha eterna gratidão.

Fique em paz.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por todas as realizações e alegrias da minha vida.

A minha família, pois sem o apoio dela, nada do que consegui teria sido possível.

Obrigado pelo amor, pela força e ajuda de sempre.

Em especial, ao meu pai e a minha mãe, peças fundamentais na formação de quem eu sou hoje. Seu amor, força, apoio e compreensão foram e são minha base e meu entusiasmo para a realização dos meus objetivos de vida e minha inspiração para sempre crescer. Apesar da distância, sempre foram o grande incentivo para eu atingir minhas metas. Meu eterno amor e gratidão.

Ao mestre e honrado professor Dr. Francesco Langone, que em vida me ensinou os primeiros passos da Ciência e me orientou nesse caminho com muito trabalho, determinação e paciência. Dedico esse trabalho a ele que, tenho certeza, acompanhou tudo como desde o começo e que, tanto em momentos ruins quanto nos bons, esteve sempre presente.

Ao meu orientador Dr. Fábio Rogério, que foi um grande companheiro acima de tudo e muito disposto a me ajudar. Apesar das dificuldades presentes, sempre foi atencioso e muito presente. Muito obrigado por ter construído esse trabalho comigo e por ter dado continuidade ao que foi iniciado pelo professor Dr. Francesco Langone. Obrigado pela paciência, pela solicitude, compreensão e por ter me orientado nessa etapa final.

Ao Dr. Alessandro Negro do Centro di Ricerche in Biotecnologie Innovative-CRIBI da Universidade de Padova (Padova, Itália) pelo fornecimento do CNTF. Sem sua generosa contribuição esse trabalho não poderia ser realizado.

Aos amigos Alexandre César Santos Rezende, André Schwanbach Vieira, César Renato Sartori, Gustavo Facchini, Janice Nascimento, Karina Fukuda, Priscila Ferreira do Amaral, Raffaella Ignarro Silvestre do laboratório de Neurobiologia, que, além de grandes companheiros, sem eles, esse trabalho também não seria possível. Com eles aprendi o que sei hoje e que vai me fazer crescer mais ainda profissionalmente. Agradeço, em especial, ao Alexandre, André, César e Gustavo, pelo auxílio prestado em diversos momentos. Ao André novamente por ter sido tão solícito e pelo suporte intelectual. Às amigas Dionéia Araldi e Maria Athié pelo companheirismo, simpatia e incentivo de sempre.

Aos amigos da faculdade, os de minha turma, de outros anos e os que moraram comigo. Por terem sido companheiros e não terem me deixar abater nas dificuldades. Foram também meu refúgio e conforto em um lugar distante de casa. Muito obrigado a todos.

Ao professor Dr. Carlos Amílcar Parada, por todo o suporte dado nos momentos difíceis, pela disposição de seu laboratório e a ajuda com análise estatística. Obrigado pela compreensão, pela ajuda e companheirismo com todos e pela simpatia.

Ao professor Dr. Arício Xavier Linhares pelo auxílio na análise estatística de alguns resultados.

Agradeço à banca de qualificação composta por prof. Dr. Alexandre César Santos Rezende, prof. Dr. Carlos Amílcar Parada e profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari pelas sugestões e críticas construtivas para a finalização de minha dissertação.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

Índice

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Abreviaturas.....	3
1 – Introdução.....	6
2 – Objetivos.....	18
3 – Material e Método.....	19
3.1 - Animais, grupos experimentais e doses utilizadas.....	19
3.2 - Procedência do CNTF e Rolipram.....	20
3.3 - Procedimentos cirúrgicos e tratamentos.....	20
3.4 - Avaliação da evolução ponderal.....	21
3.5 - Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para biologia molecular.....	21
3.6 - Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para histologia.....	23
3.7 - Análise quantitativa.....	24
4 – Resultados.....	27
4.1 - Evolução ponderal.....	27
4.2 - Análise molecular.....	28
4.3 - Análise morfológica.....	37
5 – Discussão.....	39
6 – Conclusões.....	52
7 – Referências Bibliográficas.....	53

Resumo

A busca por estratégias para o tratamento de doenças neurodegenerativas e neurotraumas tem sido realizada mediante o emprego de moléculas que possam atuar impedindo a morte de células nervosas e/ou estimulando a regeneração axonal e dendrítica. Dentre elas se encontram os fatores neurotróficos e, em especial, o fator neurotrófico ciliar (CNTF), membro da família das neuroquinas que promove a sobrevivência de uma variedade de populações de neurônios, além de desempenhar papel importante na resposta do tecido nervoso à lesão. Seu mecanismo de ação se dá através da via Janus Quinase/Proteína Transdutora de Sinal e Ativadora de Transcrição (JAK/STAT), conhecidamente envolvida na expressão de diversos genes implicados na neuroproteção através da fosforilação da STAT3. Outra via de sinalização intracelular também relacionada com mecanismos de neuroproteção e regeneração axonal é aquela dependente da concentração citoplasmática do monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), cuja concentração intracelular também pode ser modificada farmacologicamente através da interferência nos seus processos de síntese e degradação. O cAMP está envolvido em diversos eventos fisiológicos envolvendo o sistema nervoso e sua proteção. Seu principal alvo é a Proteína Quinase A, a qual exerce funções, dentre elas, a de estimular vias de sinalização intracelulares comprometidas com a sobrevivência neuronal e regeneração axonal. A estratégia aplicada no presente estudo consistiu na inibição da degradação de cAMP através de um inibidor de fosfodiesterase tipo IV, Rolipram. Diversas evidências sugerem que existam importantes interações entre a atividade do cAMP e a ação de neuroquinas que potencializam os efeitos protetores destas últimas. Tendo isso em vista, investigamos os efeitos da associação do Rolipram e CNTF na proteção de neurônios da medula espinal de ratos neonatos após secção do nervo isquiático. Foi estudado um lote de ratos para investigação a curto prazo (tratamento e sacrifício no mesmo dia) para a investigação das vias de sinalização envolvidas e outro a longo prazo (tratamento por cinco dias) para a investigação morfológica com os grupos CNTF (0,3µg/g), Rolipram (2,0µg/g), CNTF + Rolipram (C+R) (0,3µg/g e 2,0µg/g, respectivamente), PBS e DMSO. Os dois últimos foram agrupados em um grupo denominado CONTROLE para análise protéica. As consequências no crescimento dos animais (evolução ponderal) foram mais proeminentes, visto que o grupo C+R cresceu menos que os outros grupos, denotando um efeito deletério já a partir do segundo dia de intervenção (P3) no desenvolvimento dos animais. Os tratamentos rápidos desencadearam um padrão diversificado de resultados. O tratamento com CNTF aumentou a fosforilação de STAT3 (pSTAT3) e a STAT3 total. A proteína pró-apoptótica BAD fosforilada aumentou com C+R, porém sua forma total não sofreu alterações. Já o fator de transcrição proteína ligadora ao elemento responsivo ao cAMP (CREB) e sua forma fosforilada, pCREB, não apresentaram alterações após os diferentes tratamentos. Após o tratamento prolongado não houve diferença entre os grupos no Índice de Sobrevivência Neuronal. Não observamos efeito aditivo com tratamento simultâneo de CNTF e Rolipram nas vias relacionadas com a sobrevivência neuronal no presente modelo de lesão nervosa periférica.

Abstract

The search for strategies for the treatment of neurodegenerative diseases and neurotraumas has been performed through the use of molecules that may act as neuroprotective agents and avoid the death of neural cells and/or stimulate axonal and dendritic regeneration. Among these strategies, the neurotrophic factors, specially the ciliary neurotrophic factor (CNTF), member of the neurocytokines, have gained interest due to the fact of being capable of promoting the survival of a variety of neurons besides playing an important role in response to nervous injury. The mechanism of action is through Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT), known to be involved in the expression of a variety of genes implicated in neuroprotection by phosphorylation of STAT3. Another intracellular signaling via also related with neuroprotection and axonal regeneration mechanisms is the one dependent on the cytoplasmic concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), whose intracellular concentration may also be modified pharmacologically through the interference in the processes of its synthesis and degradation. cAMP has been reported to be involved in several physiological events involving the nervous system and its protection. Its main target is Protein Kinase A (PKA), which exerts functions such as neuronal survival and axonal regeneration. The strategy applied on this work consisted on the inhibition of the breakdown of cAMP through an inhibitor of phosphodiesterase type IV, Rolipram. It has been described important relationship between the activity of cAMP and action of neurocytokines that potentiate the neuroprotective effects of the latter. In the present work we investigated the effects of the association of Rolipram and CNTF on the protection of spinal motoneurons of neonatal rats after transection of sciatic nerve. A set of rats was used to investigate short period treatment (treatment and sacrifice in the same day) in order to analyse intracellular signaling vias involved and other set to investigate a prolonged treatment (treatment for five days) to make a morphological analysis of the groups CNTF (0,3µg/g), Rolipram (2,0µg/g), CNTF + Rolipram (C+R) (0,3µg/g e 2,0µg/g, respectively), PBS and DMSO. For proteic analysis, the two latter were grouped in one group called CONTROL. C+R group showed failure to thrive, meaning that a deleterious effect occurred as of the second day of intervention (P3). Short period treatments showed different results. Treatment with induced both phosphorylation and total amount of STAT3. The pro-apoptotic protein BAD raised its levels in response to C+R, but the total levels were not affected. On the other hand, cAMP Responsive Element Binding Protein (CREB) and its phosphorylated form, pCREB, showed no alteration after the treatments. In the prolonged investigation there was no difference between the treatments in the Neuronal Survival Index. There was no additive effect after simultaneous treatment with CNTF and Rolipram in neuronal survival in the present model of peripheral nervous injury.

Abreviaturas

ADP – Adenosine Diphosphate (Adenosina Difosfato)

AMP – Adenosine Monophosphate (Adenosina Monofosfato)

ATP – Adenosine Triphosphate (Adenosina Trifosfato)

BAD – Bcl-2 Associated Death Promoter (Promotor de Morte Associado a Bcl-2)

Bax – Bcl-2 Associated X Protein (Proteína X Associada à Bcl-2)

Bcl-2 – B-Cell Leukemia/Lymphoma 2 (Leucemia de Células B/Linfoma 2)

BDNF – Brain Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)

cAMP – Cyclic Adenosine Monophosphate (Monofosfato de Adenosina cíclico)

CPT-cAMP – 8-(4 chlorophenyltio)-adenosine-3',5-cyclic monophosphate (8-(4 clorofeniltio)-adenosina-3',5-monofosfato cíclico)

CNTF – Ciliary Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Ciliar)

CNTFR α – Ciliary Neurotrophic Factor Receptor Alpha (Receptor Alfa do Fator Neurotrófico Ciliar)

CTRL - Controle

CREB – cAMP Response Element Binding Protein (Proteína Ligadora ao Elemento Responsivo a cAMP)

db-cAMP – Dibutyl-cyclic AMP (Dibutiril-cAMP)

DMSO – Dimethyl Sulfoxide (Dimetilsulfóxido)

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

GDNF – Glial Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado da Glia)

GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein (Proteína Ácida Fibrilar Glial)

gp-130 – Glycoprotein 130 (Glicoproteína 130)

G93A SOD1 – Glycine-Alanine Substitution Cu, Zn-Superoxide Dismutase (Cu, Zn-Superóxido Dismutase com substituição Glicina-Alanina)

HGF – Hepatocyte Growth Factor (Fator de Crescimento de Hepatócito)

IBMX – Isobutylmethylxanthine (Isobutilmetilxantina)

IL-6 – Interleucine 6 (Interleucina 6)

i.p – Intraperitoneal

ISN – Índice de Sobrevida Neuronal

JAK2 – Janus Kinase 2 (Janus Quinase)

LIF – Leukemia Inhibitory Factor (Fator Inibidor de Leucemia)

LIFR β – Leukemia Inhibitory Factor Receptor Beta (Receptor Beta do Fator Inibidor de Leucemia)

(LV)-srCNTF – Lentivirus-small recombinant CNTF (Lentivírus de CNTF pequeno recombinante)

MAG – Myelin-Associated Glycoprotein (Glicoproteína Associada à Mielina)

MEK/Erk – Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Regulated Kinase (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno/Quinase Regulada Extracelularmente)

mRNA – Messenger Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucléico mensageiro)

NGF – Nerve Growth Factor (Fator de Crescimento do Nervo)

NPY – Neuropeptide Y (Neuropeptídeo Y)

NT-3 – Neurotrophin 3 (Neurotrofina 3)

NT-4/5 – Neurotrophin 4/5 (Neurotrofina 4/5)

PB – Phosphate Buffer (Tampão Fosfato)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

pBAD – Phospho-Bcl-2 Associated Death Promoter (Proteína Promotora de Morte Associado a Bcl-2 Fosforilada)

pCREB – Phospho-cAMP Response Element Binding Protein (Proteína Ligadora ao Elemento Responsivo a cAMP Fosforilada)

PKA – Protein Kinase A (Proteína Quinase A)

pSTAT3 – Phospho-Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Proteína Transdutora de Sinal e Ativadora de Transcrição Fosforilada)

RGC – Retinal Ganglion Cell (Célula Ganglionar da Retina)

rhCNTF – Recombinant human Ciliary Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Ciliar recombinante humano)

s.c. – Subcutâneo

SOCS – Suppressor of Cytokine Signaling (Supressor de Sinalização de Citocina)

STAT3 – Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Proteína Transdutora de Sinal e Ativadora de Transcrição)

TNF- α – Tumor Necrosis Factor-alpha (Fator de Necrose Tumoral-alfa)

TrkA – Tropomyosin Receptor Kinase A (Receptor Tropomiosina-Kinase A)

TrkB – Tropomyosin Receptor Kinase B (Receptor Tropomiosina-Kinase B)

TrkC – Tropomyosin Receptor Kinase C (Receptor Tropomiosina-Kinase C)

1. Introdução

A investigação de estratégias para o tratamento de doenças neurodegenerativas e neurotraumas tem mostrado que diversas moléculas podem atuar como agentes neuroproterores por impedirem a morte das células nervosas e/ou estimularem a regeneração axonal e dendrítica (Koller, 1997; Rodrigues et al., 1998). Dentre estas moléculas encontram-se os fatores neurotróficos, que podem atuar sobre alvos neurais específicos, ativando vias de sinalização intracelular através de sua interação com receptores de membrana (Segal e Greenberg, 1996). Outras moléculas podem exercer sua ação neuroprotetora sem interagir com receptores de membrana, mas penetrando na célula e estimulando vias de sinalização comprometidas com a sobrevivência e regeneração neuronal (Gozes et al., 2000). Neste cenário, tem ficado cada vez mais evidente a necessidade de se investigar estratégias terapêuticas que permitam o emprego de várias moléculas que, atuando através de mecanismos diferentes, promovam sinergicamente um efeito neuroprotetor mais amplo e eficaz.

Os fatores neurotróficos podem ser agrupados em classes segundo sua estrutura molecular e tipos de receptores. Dentre elas estão as neurotrofinas, das quais fazem parte o fator de crescimento do nervo (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina 4/5 (NT-4/5) e a neurotrofina 3 (NT-3), que atuam sobre diferentes populações de neurônios sensitivos e motores nos mamíferos. Suas ações biológicas são mediadas através da interação com receptores de membrana específicos e pertencentes à família tirosinas quinase (Trk). Para o NGF, o receptor específico é o TrkA, para BDNF e NT-4/5, o receptor é TrkB e para NT-3 o TrkC (Barbacid, 1994; Cui, 2006). Ocorre, também, sobreposição de receptores para um mesmo ligante. Por sua vez, na classe das neuroquinas, encontram-se o fator neurotrófico ciliar (CNTF), o fator inibidor de leucemia (LIF) e a interleucina 6 (IL-6). As neuroquinas atuam sobre

diferentes populações de neurônios através de sua interação com receptores compostos por duas ou três subunidades, dentre as quais está sempre presente a glicoproteína 130 (gp130) (Stahl e Yancopoulos, 1994; Inoue et al., 1996).

O CNTF foi inicialmente identificado como um fator capaz de garantir a sobrevivência de neurônios parassimpáticos do gânglio ciliar de pintainho (Varon et al., 1979). Posteriormente, o estudo da sua expressão, purificação e clonagem foi realizado por diferentes autores (Barbin et al., 1984; Manthorpe et al., 1986; Stockli et al., 1989; Lin et al., 1989; Negro et al., 1991a,b). Atualmente sabe-se que o CNTF é produzido por células de Schwann associadas a fibras mielínicas e por subpopulações de astrócitos, sendo amplamente distribuído no sistema nervoso central (Stockli et al., 1991; Friedman et al., 1992; Rende et al., 1992; Henderson et al., 1994; Kirsch e Hofmann, 1994; Richardson, 1994). Além disso, essa molécula é capaz de promover a sobrevivência de uma variedade de populações de neurônios e de atuar na proliferação e diferenciação de células gliais no sistema nervoso central durante o desenvolvimento (Lillien et al., 1990; Stockli et al., 1991), assim como seu receptor é amplamente distribuído no sistema nervoso central (MacLennan et al., 1996). Recentemente, o CNTF foi visto atuar com quimioatrativo de macrófagos que atuam na sobrevivência de células ganglionares da retina (RGC's) (Cen et al., 2007).

Ao longo dos últimos anos foram obtidas diversas evidências que reforçam a hipótese de que o CNTF desempenhe um papel importante na resposta do tecido nervoso à lesão (Thoenen, 1991; Sendtner et al., 1997; Tripathi e McTigue, 2008). Neste sentido, observou-se que após lesões no sistema nervoso central ou periférico são desencadeadas intensas alterações nos níveis de CNTF nas regiões afetadas. Lesões mecânicas provocadas no cérebro, por exemplo, levam a um expressivo aumento na quantidade de mRNA para CNTF bem como da própria proteína no local lesado (Ip et al., 1993; Asada

et al., 1995). Especificamente, este aumento na expressão do mRNA para CNTF foi localizado em astrócitos reacionais no local da lesão cerebral (Ip et al., 1993; Asada et al., 1995). Rana et al. (2010) observaram que o estiramento mecânico do gânglio cervical superior de ratos estimulou o crescimento de neurócitos além de aumentar os níveis de mRNA e proteína para CNTF nessas células. Desta forma, é possível que o CNTF tenha uma dupla função no processo pós-lesional, atuando como molécula trófica para os neurônios e como estimulador de resposta glial (Rudge et al., 1992; Winter et al., 1995; Dallner et al., 2002).

No sistema nervoso periférico íntegro são detectados altos níveis de mRNA para CNTF e desta proteína no citoplasma das células de Schwann (Stockli et al., 1991; Rende et al., 1992; Friedmann et al., 1992). Porém, após uma lesão traumática, os níveis de mRNA para CNTF diminuem drasticamente no coto distal e aumenta a quantidade desta proteína no espaço extracelular (Smith et al., 1993). Desta forma acredita-se que o CNTF estocado nas células de Schwann seja abundantemente liberado em resposta à lesão para atuar como um agente neuroprotetor rápido (Friedman et al., 1992; Sendtner et al., 1992c; Smith et al., 1993). Yetiser e Kahraman (2008) também observaram aumento de CNTF após secção do nervo facial. Esses autores observaram, ainda, que a secção aumentou em maior proporção os níveis de CNTF comparado ao esmagamento. Têm-se também evidências de que o CNTF possa ser internalizado e retrogradamente transportado pelos axônios até o corpo celular após uma lesão nervosa periférica, assim como outros fatores neurotróficos (Sendtner et al., 1990; Curtis et al., 1993; Lee et al., 2004). É interessante notar que as células de Schwann passam a expressar novamente CNTF durante o processo regenerativo do nervo à medida que estabelecem contatos com os axônios em crescimento (Sendtner et al., 1992c; Lee et al., 1995).

Os efeitos neurotróficos e neuroprotetores da administração exógena de CNTF foram evidenciados em modelos experimentais de doenças neurológicas e de lesões traumáticas de nervos periféricos (Sendtner et al., 1990; Sendtner et al., 1992a,b; Hagg et al., 1992; Lo et al., 1995; Simon et al., 1995; Lindsay, 1995; Kuzis e Eckenstein, 1996; Zhang et al., 2004; Hapner et al., 2006; Pun et al., 2006; Wu et al., 2007). Recentemente, Pun et al. (2006), mostraram que administração intramuscular de CNTF em camundongos transgênicos que expressam grande quantidade da proteína G93A SOD1, um modelo de esclerose lateral amiotrófica familiar, reduziu a vulnerabilidade axonal de motoneurônios de unidades motoras de contração rápida. Por sua vez, Wu et al. (2007) mostraram que a indução da síntese e secreção de CNTF nos gânglios das raízes dorsais (DRG) através da injeção intraganglionar do Lentivirus (LV)-srCNTF (vírus com capacidade de assimilar sequência de DNA específica do CNTF e com capacidade de serem incorporados em células-alvo) estimulou regeneração axonal dos neurônios pseudounipolares no interior das raízes dorsais.

As ações do CNTF são mediadas por uma sequência de eventos intracelulares que têm início com a ligação deste ao CNTFR α (receptor de CNTF subunidade alfa), que está ligado à membrana celular através de uma âncora de glicosilfosfatidil inositol (GPI). Esse complexo se liga ao gp-130 e ao LIFR β (receptor de LIF subunidade beta) formando um heterodímero (Davis et al., 1993). A formação do complexo CNTF/CNTFR α /gp-130/LIFR β aproxima as proteínas da classe das Janus Quinases 2 (JAK2) que estão previamente associadas à porção citoplasmática dos componentes β . Esta aproximação desencadeia a autofosforilação das JAK2, além da fosforilação de tirosinas das subunidades do complexo receptor (Wilks et al., 1991; Stahl et al., 1994a,b). As tirosinas fosforiladas nas subunidades β servem como sítios de recrutamento de monômeros da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3

(STAT3) (Boulton et al., 1995). Uma vez associadas ao complexo receptor, as STAT3 fosforiladas pelas JAK2 se dimerizam e são translocadas para o núcleo, onde atuam como fatores de transcrição regulando a expressão de diversos genes implicados na neuroproteção e neuroregeneração (Heinrich et al., 2003; Kirsch et al., 2003; Cafferty et al., 2004; Qiu et al., 2005) (Figura 1).

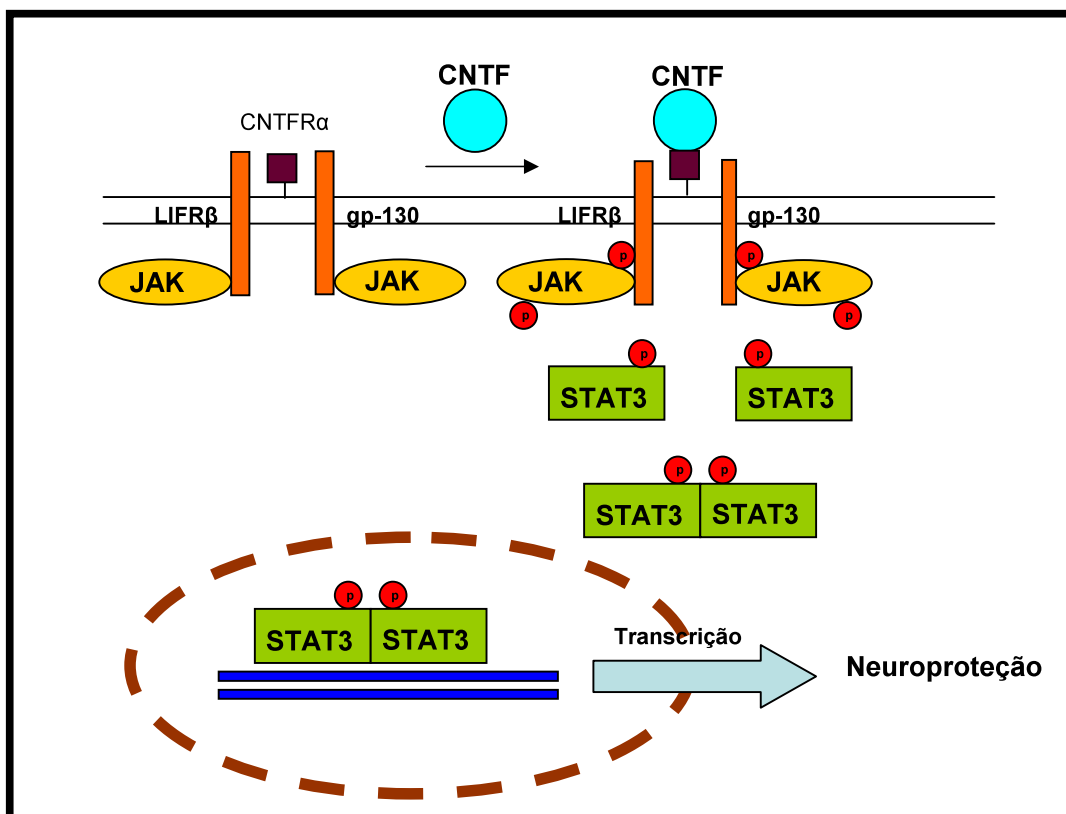


Figura 1: Via de sinalização da JAK/STAT. O CNTF se liga ao complexo receptor CNTFR α /LIFR β /gp-130 e desencadeia o processo de fosforilação das JAK's e auto-fosforilação do receptor em tirosina. Esse processo estimula o recrutamento de STAT3 que se fosforilam, dimerizam-se e são translocadas para o núcleo, onde exercem o papel de fatores de transcrição de genes relacionados com neuroproteção e neuroregeneração. Adaptado de Boyd e Gordon, 2003.

Particularmente, Kirsch et al. (2003) mostraram que após a secção no nervo facial de camundongo o CNTF liberado no local de lesão foi capaz de ativar, retrograda e rapidamente, a fosforilação da STAT3 no corpo celular dos motoneurônios axotomizados. Lee et al. (2004) observaram que ocorre fosforilação da STAT3 nos corpos celulares de motoneurônios axotomizados na medula espinal 24 horas após a

secção de nervo isquiático. No sítio da lesão, esse fenômeno ocorre após 15 minutos, predominantemente no segmento proximal do nervo axotomizado. Esses autores concluíram que, além de ser um fator de transcrição, a STAT3 é uma molécula neuroprotetora transportada retrogradamente a partir do coto proximal até o corpo celular do neurônio lesado.

Outras vias de sinalização intracelular relacionadas com mecanismos de neuroproteção e regeneração axonal são aquelas dependentes da concentração citoplasmática do monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (Rehen et al., 1996, Varella, 1997). O cAMP atua como segundo mensageiro na mediação de diversas respostas celulares induzidas por hormônios e outros ligantes de receptores de membrana (Robinson et al., 1968, McKnight, 1991, Rodbell, 1997, Selbie et al., 1998). Sua concentração intracelular também pode ser modificada farmacologicamente através da interferência nos seus processos de síntese e degradação. A síntese do cAMP é derivada da quebra do ATP em ADP e AMP, que, pela ação da adenilato ciclase ancorada à subunidade α da proteína G, adquire sua forma cíclica, e sua degradação depende da atividade da fosfodiesterase (PDE) (Walikonis e Poduslo, 1998). Um alvo importante do cAMP é a proteína quinase A (PKA), que depende dessa interação para exercer suas variadas funções biológicas, dentre as quais está sua capacidade de ativar vias de sinalização intracelulares comprometidas com a sobrevivência neuronal e regeneração axonal (Roisen et al., 1972; Song et al., 1997; Hanson et al., 1998; Cai et al., 1999; Neumann et al., 2002; Li et al., 2000; Silveira e Linden, 2005). Em particular, sabe-se que a PKA é capaz de fosforilar a BAD (pBAD) inibindo, assim, sua participação na morte celular (Harada et al., 1999). Os principais sítios de fosforilação da BAD incluem os resíduos de Ser112 ou Ser155 (Silveira e Linden, 2005).

Fosforilada, a BAD é translocada da mitocôndria para o citoplasma ligada a proteínas adaptadoras 14-3-3 que bloqueiam sua ação apoptótica (Datta et al., 1997) (Figura 2).

O CREB (do inglês, cAMP Responsive Element Binding Protein) é também ativado por níveis elevados de cAMP e serve como um mediador primário da transcrição mediada por cAMP (Lonze e Ginty, 2002). A ativação do CREB ocorre via PKA e também via MEK/Erk e ocorre em resíduo de Ser133 (Gao et al., 2004). De maneira geral, além de ter papel importante nos processos de memória, aprendizado e plasticidade, o CREB está envolvido em proliferação, diferenciação e crescimento neuronais, bem como promotor de sobrevivência e neuroproteção (Lonze e Ginty, 2002) (Figura 2). Para atestar a participação de CREB na regeneração axonal foi feito um experimento com injeção de adenovírus contendo CREB ativo em gânglios de ratos previamente a lesão da coluna dorsal e observou-se que os grupos controle não regeneraram seus axônios diferentemente dos tratados com os adenovírus (Gao et al., 2004). Em 2008, Aglah et al. demonstraram que o cAMP é capaz de promover o crescimento de ramificações de motoneurônios *in vitro* e que esse fenômeno ocorre mediado pela PKA.

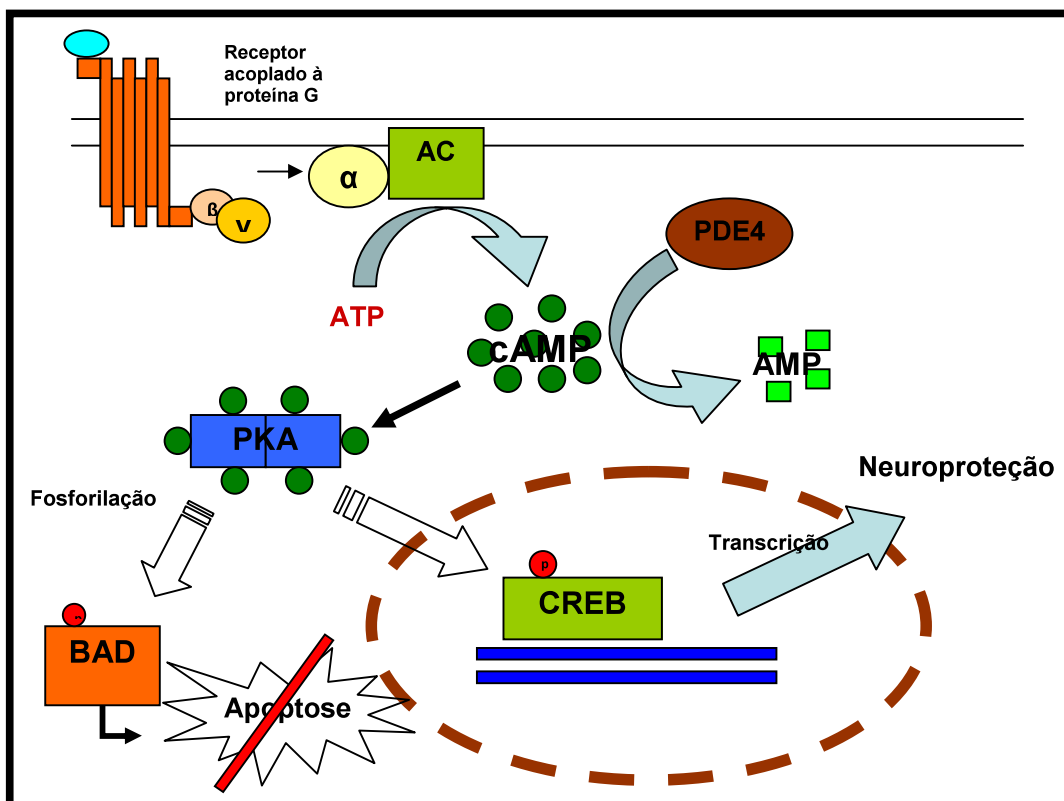


Figura 2: Vias de síntese do cAMP e de sinalização celular mediada pelo cAMP, PKA e CREB. Detalhes no texto. AC: Adenilato Ciclase; α , β , γ : subunidades da proteína G. Adaptado de Linden et al., 2005; Gao et al., 2004.

Recentes evidências reforçam a hipótese de que a elevação da concentração intracelular de cAMP através da inibição da PDE pode ser uma importante estratégia terapêutica de neuroproteção (Schubert et al., 1997). Dentre os agentes neuroprotetores inibidores da PDE encontra-se o Rolipram (4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]-2-pirrolidinona), um inibidor seletivo de PDE 4 (Nikulina et al., 2004). Diversos autores têm mostrado que a administração de Rolipram em roedores após lesão traumática de medula espinal estimula a regeneração axonal, inibe a gliose reativa e acelera a recuperação funcional (Pearse et al., 2004; Nikulina et al., 2004; Hannila et al. 2008). Recentemente, Whitaker, et al. (2008) mostraram que o tratamento com Rolipram impede a morte de oligodendrócitos do funículo ventrolateral após lesão da medula cervical por contusão. Esse trabalho também mostrou que o Rolipram, ao aumentar a

disponibilidade de cAMP, está, também, indiretamente relacionado com atividade anti-inflamatória ao diminuir os níveis de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória induzida após estímulo lesivo, que tem sua produção e secreção dependente de fosfodiesterase. Embora os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesses efeitos do Rolipram não sejam bem conhecidos, tem-se sugerido que o Rolipram exerça seus efeitos neuroprotetores inibindo a ativação de vias apoptóticas e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, bem como estimulando a expressão de fatores neurotróficos (Nakagawa et al., 2002; Chen et al., 2007; Whitaker et al., 2008). Em comparação a isobutilmetilxantina (IBMX), também um inibidor de fosfodiesterase, o Rolipram permite que um maior número de motoneurônios emita extensões in vitro (Aglah et al., 2008). Recentemente, Gordon et al. (2009) observaram que estímulo elétrico em coto axonal proximal de uma lesão nervosa periférica causa elevação nos níveis de cAMP. Assim, pode-se propor também que o papel neuroprotetor do Rolipram envolveria participação do cAMP.

De maneira interessante, diversas evidências sugerem que existam importantes interações entre a atividade do cAMP e a ação de neuroquinas, como IL-6, LIF e CNTF, ao potencializar os efeitos neuroprotetores destas últimas. Em particular, Cui et al. (2003) mostraram que a elevação da concentração de cAMP na retina de ratos potencializou o efeito neuroprotetor da injeção intravítrea de CNTF sobre as células ganglionares da retina. Estes autores também reportaram que a ação cooperativa do cAMP e CNTF estimulou a regeneração axonal das RGC's no interior de um segmento de nervo isquiático enxertado no nervo óptico. Por sua vez, Cao et al. (2006) verificaram que a expressão da IL-6 aumentou marcadamente nos neurônios sensitivos do DRG após secção do nervo isquiático de camundongos. Aumento similar foi observado por esses autores em culturas primárias de neurônios de DRG após a administração do análogo de

cAMP, dibutilil-cAMP (db-cAMP). Também foi visto que a adição de db-cAMP e o aumento da expressão de IL-6 estimularam o crescimento de neuritos das células sensoriais mesmo na presença da glicoproteína associada à mielina (MAG), inibidora da regeneração axonal. Além disso, é importante destacar que Wu et al. (2007) verificaram também que a administração intraganglionar de db-cAMP induziu aumento da expressão do mRNA para IL-6 e LIF e da presença da STAT3 fosforilada (pSTAT3) no núcleo dos neurônios do DRG. Como foi considerado acima, neste mesmo trabalho os autores também confirmaram a ação estimuladora do CNTF sobre a regeneração axonal sensitiva central induzindo sua síntese e secreção nos DRG's através da injeção intraganglionar do Lentivirus (LV)-srCNTF. Em 2004, Spencer e Filbin observaram que neurônios cultivados em meio contendo MAG ou mielina purificada podem emitir extensões após o tratamento prévio com neurotrofinas. Esse fenômeno denominado “priming” não foi observado com a aplicação de db-cAMP, sugerindo que o cAMP possa participar da via de sinalização de neurotrofinas. Pode-se concluir, então, que o tratamento com neurotrofinas aumenta os níveis de cAMP.

Sabe-se que, durante a primeira semana após o nascimento, os neurônios motores e sensitivos de ratos e camundongos são vulneráveis à lesão axonal. A secção do nervo isquiático de ratos no dia do nascimento leva à morte de aproximadamente 75% dos neurônios sensitivos e de praticamente 100% dos motoneurônios atingidos. A morte neuronal pode ser notada poucas horas após a lesão e acentua-se gradativamente no decorrer dos dias (Schmalbruch, 1984, 1987a, 1987b, 1988, 1990; Lowrie e Vrbová, 1992; Lowrie et al., 1994). Além de morte acentuada, a axotomia resulta em alterações morfológicas, como a redução da árvore dendrítica, assim como em funcionamento anormal dos motoneurônios sobreviventes (Mentis et al., 2007). Ainda, vários autores

mostraram que lesão do nervo isquiático em ratos recém-nascidos também causa a morte de populações de interneurônios espinais (Lowrie e Lawson, 2000; Oliveira et al., 2002).

É bem estabelecido que o tratamento de ratos recém-nascidos com CNTF reduz a morte dos motoneurônios, bem como dos interneurônios na intumescência lombar, após secção do nervo isquiático (Oliveira et al., 2002; Rezende et al., 2008). Recentemente, pudemos verificar que a proteção de motoneurônios promovida pela administração sistêmica de CNTF após secção do nervo isquiático de ratos neonatos está associada ao aumento da pSTAT3 e da ligação da proteína Bcl-2 à Bax na medula lombar, resultando numa inibição dessa última proteína e evitando, assim, sua ação pró-apoptótica (Rezende et al. 2008).

É interessante notar que em ratos neonatos a concentração de cAMP nos gânglios das raízes dorsais (DRG's) é alta nas primeiras horas após o nascimento e cai drasticamente após 2 dias de vida (Cai et al. 2001). Esta alta concentração de cAMP tem sido relacionada à grande capacidade de os neurônios sensitivos de animais neonatos regenerarem seus axônios *in vitro* e *in vivo* (Cai et al. 1999, 2001). Além disso, Qiu et al. (2002) mostraram que a injeção de db-cAMP no interior dos DRG's de ratos adultos, uma semana antes da secção do funículo posterior da medula, estimulou a regeneração do axônio dos neurônios sensitivos. Estes autores também obtiveram evidências de que, após a secção do nervo isquiático em ratos jovens (18 dias de vida), houve aumento transitório da quantidade de cAMP nos DRG's correspondentes a esse nervo. Também é importante observar que a secção do nervo isquiático realizada em ratos adultos antes do esmagamento das raízes dorsais estimula a regeneração axonal no interior destas últimas, bem como no funículo posterior da medula espinal (Richardson e Verge, 1987; Neumann e Woolf, 1999; Wu et al., 2007). Tal lesão do nervo isquiático neste modelo experimental tem sido denominada “lesão condicionante”. Recentemente Wu et al.

(2007) verificaram que, neste modelo experimental, a administração intraganglionar de db-cAMP causou efeito semelhante ao da lesão condicionante do nervo isquiático. Tais evidências reforçam a idéia de atuação do cAMP como agente neuroprotetor.

A relação entre o aumento da concentração de cAMP, sobrevivência neuronal e regeneração axonal observada para os neurônios sensitivos também ocorre em neurônios motores. Hanson et al. (1998) observaram que a elevação dos níveis de cAMP em motoneurônios em cultura, induzida pela estimulação da adenilato ciclase com forskolina e pela inibição da fosfodiesterase (PDE) com IBMX, garantiu a sobrevivência destes neurônios por sete dias e estimulou o crescimento de neuritos na ausência de fatores tróficos como BDNF, CNTF, GDNF (do inglês, fator neurotrófico derivado da glia), HGF (do inglês, fator de crescimento de hepatócito) e insulina. Por outro lado, a presença destes últimos associada ao aumento da concentração de cAMP garantiu a sobrevivência dos motoneurônios por três semanas em cultura.

Até o presente momento não há trabalhos estudando a associação de CNTF e Rolipram em modelo de axotomia periférica.

2. Objetivos

Geral

O presente estudo teve como objetivo geral verificar o efeito neuroprotetor do CNTF e do Rolipram sobre neurônios espinais após a lesão do nervo isquiático.

Específicos

Investigar o efeito da administração subcutânea de CNTF e Rolipram, isolados ou em associação, sobre as proteínas STAT3 e sua forma fosforilada (pSTAT3); BAD e sua forma fosforilada (pBAD); CREB e sua forma fosforilada (pCREB).

Avaliar o efeito da administração subcutânea de CNTF e Rolipram, isolados ou em associação, na sobrevivência de motoneurônios espinais após secção do nervo isquiático de ratos neonatos.

3. Material e Método

3.1. Animais, grupos experimentais e doses utilizadas

Foram empregados ratos Wistar com idade de dois dias (P2) fornecidos pelo centro de bioterismo da Unicamp - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biologia da Unicamp (Protocolo 1998-1).

Um lote de ratos foi utilizado para a avaliação do efeito neuroprotetor da administração de CNTF e/ou Rolipram por um longo período através de análises histológicas da medula espinal. Durante o tratamento prolongado os animais foram mantidos junto à mãe com livre acesso à amamentação e sob condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura (21°C). Os animais foram distribuídos em grupos que receberam tratamento subcutâneo (s.c.) com CNTF (0,3µg/g) (n=5), Rolipram (2,0µg/g) (n=5), CNTF + Rolipram (0,3µg/g e 2,0µg/g, respectivamente) (n=6), veículo de diluição do CNTF (PBS) (n=5) e veículo de diluição do Rolipram (2%DMSO em solução salina – NaCl 0,9%) (n=5).

Um lote de ratos foi utilizado para a investigação dos efeitos da administração subcutânea de CNTF e/ou Rolipram após um curto período de tempo sobre vias de sinalização intracelular na medula espinal. Os grupos estudados foram idênticos aos do tratamento prolongado: CNTF (0,3µg/g) (n=5), Rolipram (2,0µg/g) (n=5), CNTF + Rolipram (0,3 µg/g e 2,0µg/g, respectivamente) (n=4), veículo de diluição do CNTF (PBS) (n=5) e veículo de diluição do Rolipram (2% DMSO em solução salina – NaCl 0,9%) (n=5).

A dose de CNTF foi adotada baseando-se em dados prévios de experimentos com ratos neonatos realizados em nosso laboratório (Rezende et al., 2008). Com relação

ao Rolipram, empregou-se a dose de 2,0µg/g escolhida dentre ampla faixa de valores encontrados na literatura (0,005 a 50µg/g) (Iyo et al., 1995; Egawa et al., 1997).

3.2. Procedência do CNTF e Rolipram

O CNTF recombinante humano (rhCNTF) foi produzido a partir da clonagem de cDNA para o CNTF humano conforme descrito por Negro et al. (1991) e fornecido pelo Dr. Alessandro Negro do Centro di Ricerche in Biotecnologie Innovative-CRIBI da Universidade de Padova (Padova, Itália). O Rolipram foi adquirido da A.G. Scientific (R-1012; San Diego, Califórnia, EUA).

3.3. Procedimentos cirúrgicos e tratamentos

Os animais com dois dias de vida (P2) foram anestesiados por hipotermia e imediatamente posicionados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos, M90). Foi realizada uma incisão na face lateral da coxa esquerda e, em seguida, a musculatura afastada para exposição do nervo isquiático. Com auxílio de microtesoura (Vannas, Steel Inox-S. OF3212) o nervo foi dissecado até sua emergência no forame isquiático, onde foi seccionado e retirado um segmento de aproximadamente três milímetros do coto distal. A musculatura foi então reposicionada e a pele suturada com fio de seda 8-0 (Ethicon). Logo após, os animais foram colocados em local aquecido até despertarem da anestesia e foram devolvidos à mãe.

O tratamento dos animais seguiu o protocolo abaixo, utilizando-se as concentrações de CNTF e Rolipram já mencionadas e seus respectivos controles (veículos de diluição) nos volumes correspondentes. A primeira dose foi administrada 30 minutos antes da lesão, a segunda imediatamente após a lesão e a terceira duas horas e meia após a primeira aplicação. Os animais destinados ao estudo dos efeitos

desencadeados pela administração em curto período foram sacrificados uma hora após a última dose. Por sua vez, os animais utilizados no estudo dos efeitos do tratamento prolongado receberam doses diárias durante cinco dias, sendo sacrificados 24 horas após a última dose.

3.4. Avaliação da evolução ponderal

Foi avaliada a evolução ponderal dos animais, ou seja, a mudança da massa corpórea durante o tratamento prolongado. Para a avaliação estatística foi realizada análise da variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni pelo programa estatístico Prism® (GraphPad Software Inc.) para as medidas de massa corpórea de P2 a P7.

3.5. Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para biologia molecular

Os animais destinados à investigação dos efeitos da administração de CNTF e Rolipram, isolados ou em associação, sobre as vias de sinalização a curto prazo foram sacrificados por decapitação. Imediatamente após, a intumescência lombar da medula espinal foi removida sob condições resfriadas (4°C). Os espécimes foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C em biofreezer até o seu processamento.

Os espécimes foram processados para análise das proteínas STAT3, pSTAT3, CREB, pCREB, BAD e pBAD pela técnica de Western Blotting. Para a extração de proteínas foi realizada homogeneização dos espécimes em tampão de extração (1% Triton X-100, 50mM PB pH 7.4, 1mM pirofosfato de sódio, 1mM sódio fluorido, 5mM EDTA, 1mM Vanadato de sódio, 1% coquetel inibidor de protease P8340 Sigma, 7M Uréia, 2M Tiouréia) na proporção 10% peso/volume a 4°C num gerador 20s Politron

PTA (Modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY) em velocidade máxima (30000rpm) por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas a 12.000G/4°C por 15 min, retirando-se o sobrenadante que contém o extrato das proteínas totais do tecido. A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Ao equivalente a 100µg de proteínas totais de cada amostra foi adicionado um volume igual de tampão de amostra Laemmli (Laemmli, 1970). Subseqüentemente, as amostras foram mantidas por 5 minutos em banho-maria a 95°C. As amostras foram, então, submetidas à eletroforese, com SDS, em gel de 8% de poliacrilamida com quantidade protéica de 70µg. As proteínas contidas no gel foram eletrotransferidas por 90 minutos a 120V para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) (Towbin et al., 1979). Com a finalidade de se observar o padrão da quantidade protéica presente após a transferência, foi realizada a coloração com Ponceau S, a qual evidencia as bandas de proteínas totais na membrana. Os sítios de ligações inespecíficas da membrana foram bloqueados com 20ml de solução de 5% leite desnatado em pó, 50mM PB PH 7.4, 150mM NaCl, 0,01% Tween 20 (PBS-tween + leite) por 1 hora. A membrana foi subseqüentemente incubada com anticorpo primário anti-pSTAT3 (Tyr705, Cell Signaling, #9145) diluído 1:1000 em 10ml de tampão PBS-tween contendo 3% BSA, por 12h a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi, então, lavada por 5 minutos com solução PBS-tween e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Zymax – Zymed Laboratories) diluída 1:10000 em 10mL de PBS-tween + 3% leite desnatado em pó, por 1h à temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada 4 vezes por 4 minutos com PBS-tween, sendo as bandas imunorreativas detectadas por auto-radiografia em um filme Kodak GBX2 utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce). Após a detecção das bandas imunorreativas as membranas foram incubadas por dois minutos com NaOH 0,1M,

lavadas por duas vezes com água deionizada e duas vezes com PBS-tween para a eluição dos anticorpos presentes e possibilitar o uso de outros.

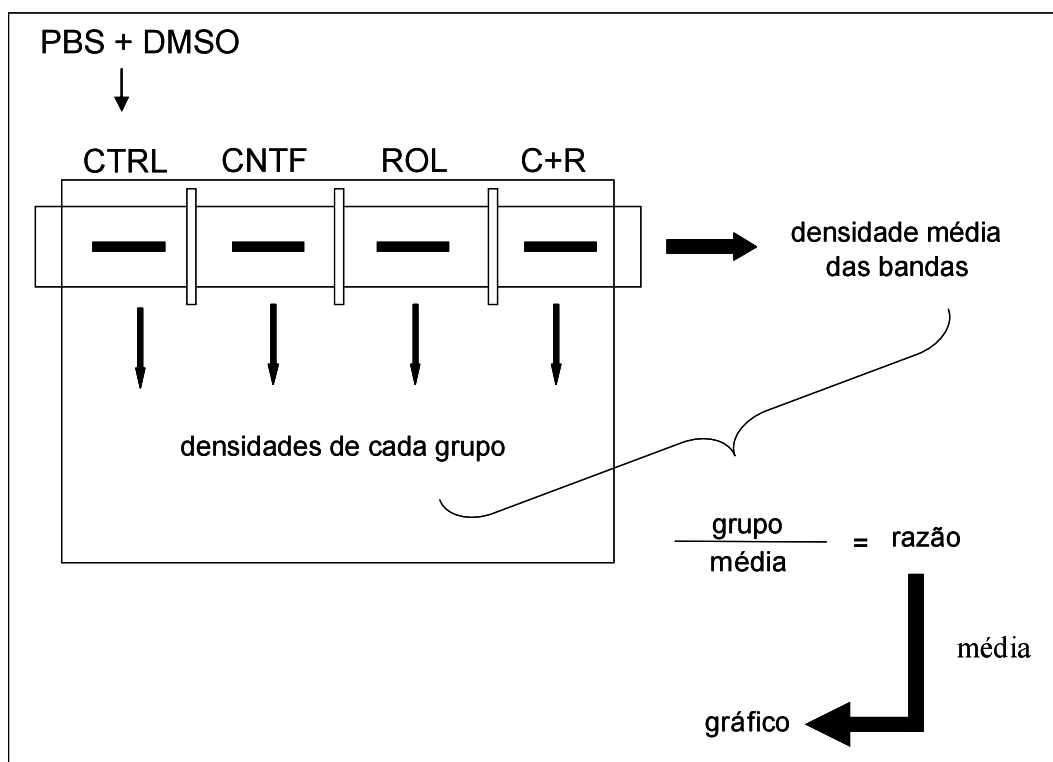
Os mesmos procedimentos anteriormente descritos foram realizados para detecção das proteínas pCREB (Ser133, Cell Signaling, #9198) , CREB (Cell Signaling, #9197), pBAD (Ser112, Cell Signaling, #5284) e BAD (Cell Signaling, #9239) diluídos na proporção 1:1000.

3.6. Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para histologia

Durante os 5 dias de tratamento os animais foram monitorados quanto à evolução ponderal. Vinte e quatro horas após o último tratamento (idade P7) os animais foram novamente pesados e anestesiados com mistura de quetamina e cloridrato de xilazina (100mg/kg e 10mg/kg, respectivamente; i.p.). A seguir foram submetidos à toracotomia e perfundidos com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Após a fixação os animais foram eviscerados e mantidos na mesma solução fixadora por 24h. A seguir a intumescência lombar da medula espinal foi dissecada e processada para inclusão em parafina. De cada intumescência lombar foram coletados cortes seriados transversais com 8µm de espessura. Para cada série de 5 cortes seguidos coletados em lâminas gelatinizadas, uma série seguinte de 12 cortes foi descartada. Este procedimento foi realizado até o esgotamento de todo o espécime. Os cortes foram, então, processados segundo o protocolo padrão para coloração de neurônios com cresil violeta 5% (Sigma). Em seguida, os cortes foram desidratados em bateria de álcool-xilol e as lâminas montadas com Permount (Fisher).

3.7. Análise quantitativa

Para a avaliação dos efeitos de CNTF e/ou Rolipram no lote de animais tratados e sacrificados no mesmo dia as bandas imunorreativas detectadas no filme fotográfico foram escaneadas (HP Deskejet F-380) e submetidas à mensuração por densitometria óptica (Scion Image®). Para cada proteína estudada foi calculada uma razão entre o valor de densidade óptica da banda referente a um grupo e a média das densidades ópticas de todos os grupos numa mesma membrana. Em seguida, calculou-se a média das razões obtidas para cada grupo em todas as membranas analisadas. Para a análise quantitativa molecular, a média das razões para cada grupo foi submetida a teste-T pareado de uma cauda com relação a um grupo denominado controle, o qual corresponde à união dos grupos PBS e DMSO mencionados anteriormente. Tal união foi realizada devido ao fato de que não se observou diferença significativa entre os grupos PBS e DMSO (vide item 4.2). Optou-se pela análise da média das razões para cada grupo pois não foi possível a normalização dos dados através de medidas de densidade óptica de bandas representativas de cada membrana por Ponceau S, visto que houve variabilidade do padrão de coloração entre as diferentes membranas processadas. A análise dos dados foi realizada através do programa estatístico Prism® (GraphPad Software Inc.), conforme esquema abaixo:



A avaliação do efeito neuroprotetor dos diferentes tratamentos no experimento de cinco dias foi feita através da contagem dos motoneurônios do grupamento ventrolateral da intumescência lombar. Para isso, foram usados 20 cortes semi-seriados representativos dos segmentos L4, L5 e L6 da intumescência lombar de cada animal. Desta forma, a distância entre cada um dos cortes selecionados foi de aproximadamente 100µm. Para a contagem dos motoneurônios foram considerados apenas aqueles com nucléolo evidente, evitando-se dessa forma, a dupla contagem. O lado contralateral, não lesado, foi considerado como controle no respectivo corte. As contagens foram realizadas através do programa ImageJ® com a ferramenta de contagem de células. O procedimento foi realizado pelo experimentador sem conhecimento prévio do grupo ao qual pertencia o espécime.

O efeito dos tratamentos foi representado pelo índice de sobrevivência neuronal (ISN), que corresponde à razão entre o número de motoneurônios computados no lado lesado e o número de motoneurônios no lado não lesado (Rogério et al., 2002). Após o

cálculo do ISN individual para cada corte obtido, foi gerado um ISN médio para cada grupo. Esse último foi submetido à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey pelo programa estatístico Prism® (GraphPad Software Inc.).

4. Resultados

4.1. Evolução ponderal

Durante o período de tratamento prolongado, a massa corpórea dos animais foi monitorada diariamente. O resultado do efeito da administração (de P2 a P7) dos cinco grupos do tratamento prolongado está demonstrado na figura 3.

O acompanhamento do ganho de peso dos animais mostrou que aqueles que receberam tratamento com CNTF apresentaram crescimento semelhante ao do observado nos animais do grupo PBS. Por sua vez, os animais tratados com C+R sempre tiveram ganho de peso significativamente inferior aos dos animais tratados com PBS ($p<0,05$). Especificamente, o menor crescimento dos animais tratados com C+R foi significativo a partir do segundo dia de tratamento ($p<0,05$). Na idade P7, o peso corporal dos animais do grupo C+R foi 32% e 33% inferior ao dos animais tratados com PBS e CNTF, respectivamente. Por fim, o grupo tratado com Rolipram apresentou ganho ponderal similar ao apresentado pelo grupo C+R, sendo significativamente maior no terceiro e no sexto dias de sobrevivência ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente).

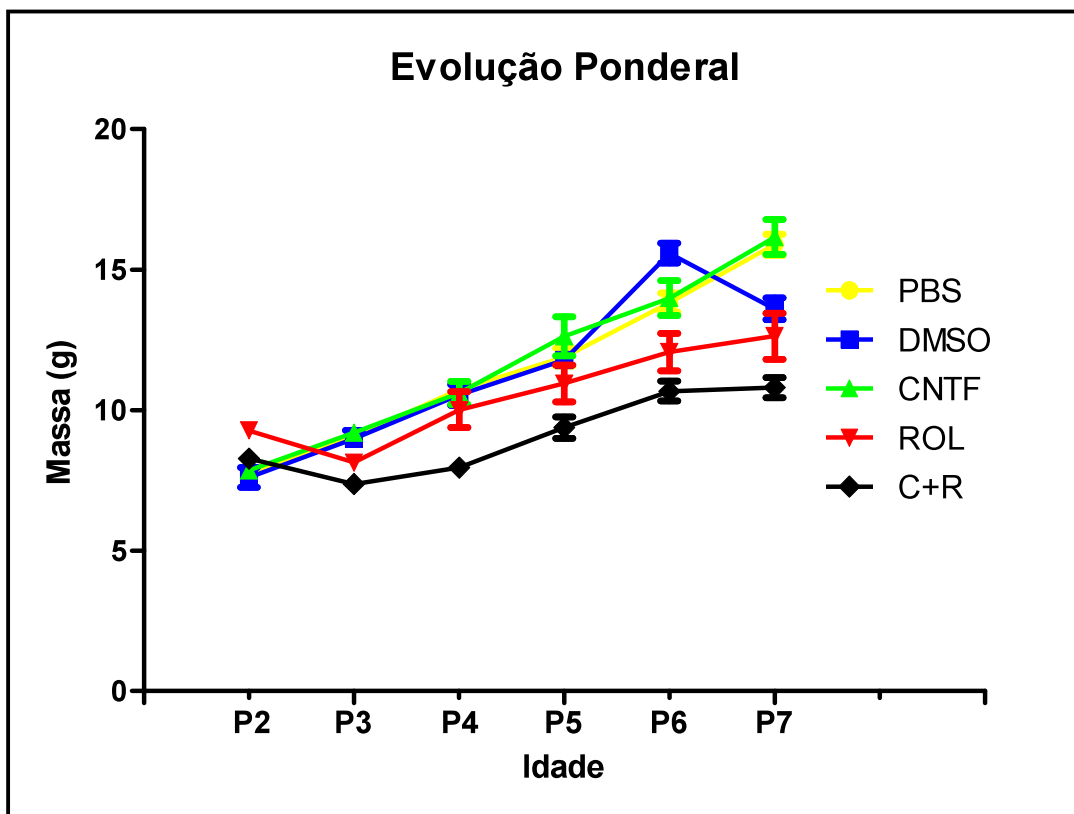


Figura 3: Evolução ponderal nos diferentes grupos durante cinco dias de tratamento. Nota-se a diferença de evolução do ganho de massa entre os animais tratados com a associação de CNTF e Rolipram e os demais grupos. PBS: Phosphate Buffered Saline; DMSO: Dimethyl Sulphoxide; CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor; ROL: Rolipram; C+R: CNTF+Rolipram. C+R vs PBS ($p<0,05$); C+R vs CNTF ($p<0,001$).

4.2. Análise molecular

Para todas as proteínas, foi utilizado como referência para a análise estatística o grupo denominado CONTROLE (CTRL), visto que o tratamento com PBS não apresentou diferença estatística em comparação ao tratamento com DMSO.

A proteína STAT3 fosforilada (pSTAT3) apresentou maior fosforilação no grupo tratado com CNTF ($p<0,05$). Os demais tratamentos não apresentaram diferença em comparação ao grupo CTRL (figura 4). Para a proteína STAT3 total também foi observada diferença entre o tratamento com CNTF e o grupo CTRL ($p<0,01$) (figura 5).

A proteína BAD fosforilada (pBAD) apresentou diferença entre os grupos CONTROLE e C+R ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre os demais grupos (figura 6). A proteína BAD total não mostrou alteração de expressão após os diferentes tratamentos (figura 7).

Por sua vez, a proteína CREB total e sua forma fosforilada, pCREB, não apresentaram diferença estatística entre os grupos (figuras 8 e 9).

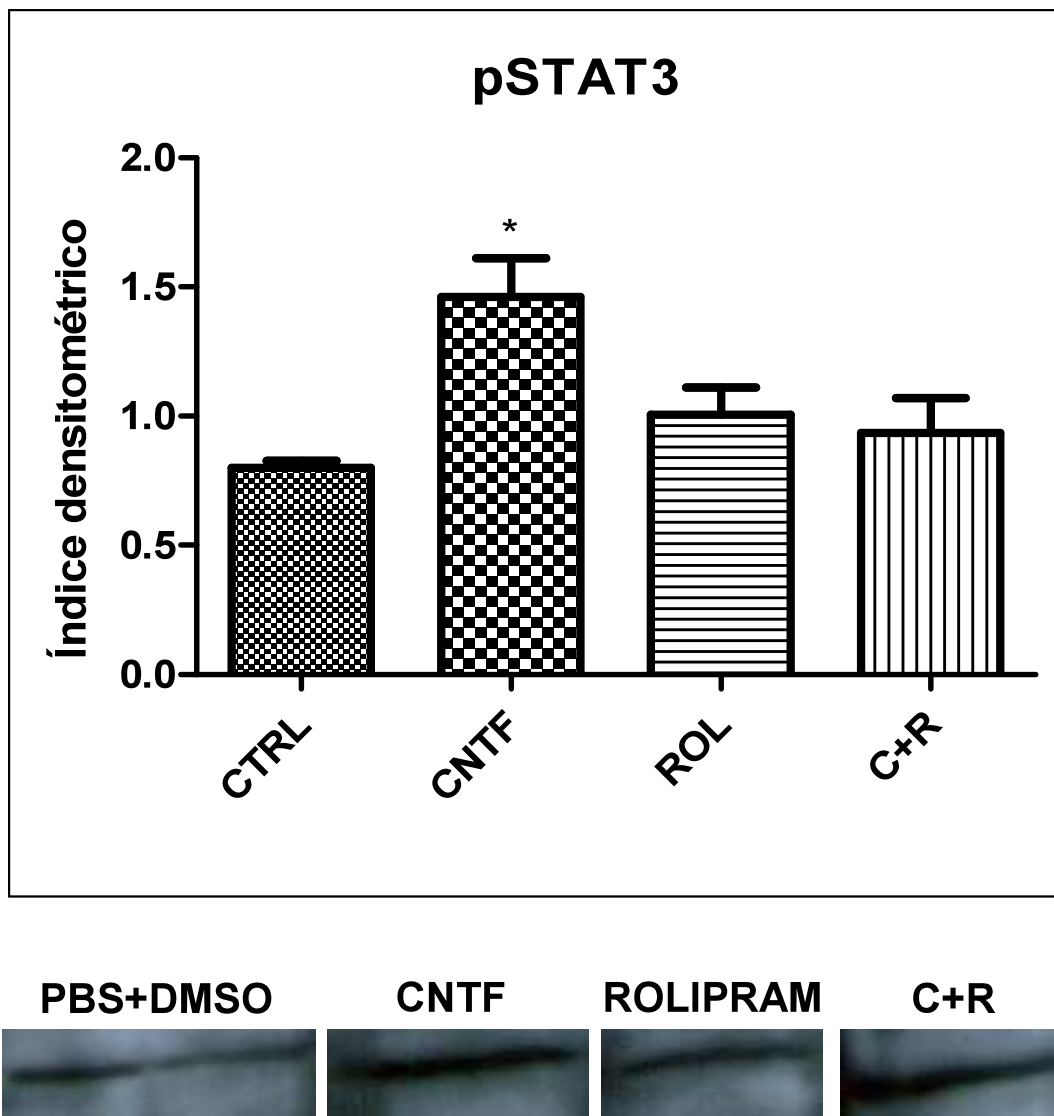


Figura 4: Fosforilação de STAT3 após os diferentes tratamentos. Notar diferença entre os grupos CTRL e CNTF (* $p < 0,05$). Na porção inferior da figura, são mostradas bandas representativas obtidas através da técnica de Western blot para cada um dos grupos experimentais estudados. CTRL: Controle (n=10 – PBS+DMSO); CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor (n=5); ROL: Rolipram (n=5); C+R: CNTF+Rolipram (n=4). Tratamentos: 30 minutos antes, imediatamente depois e 2 horas após a lesão.

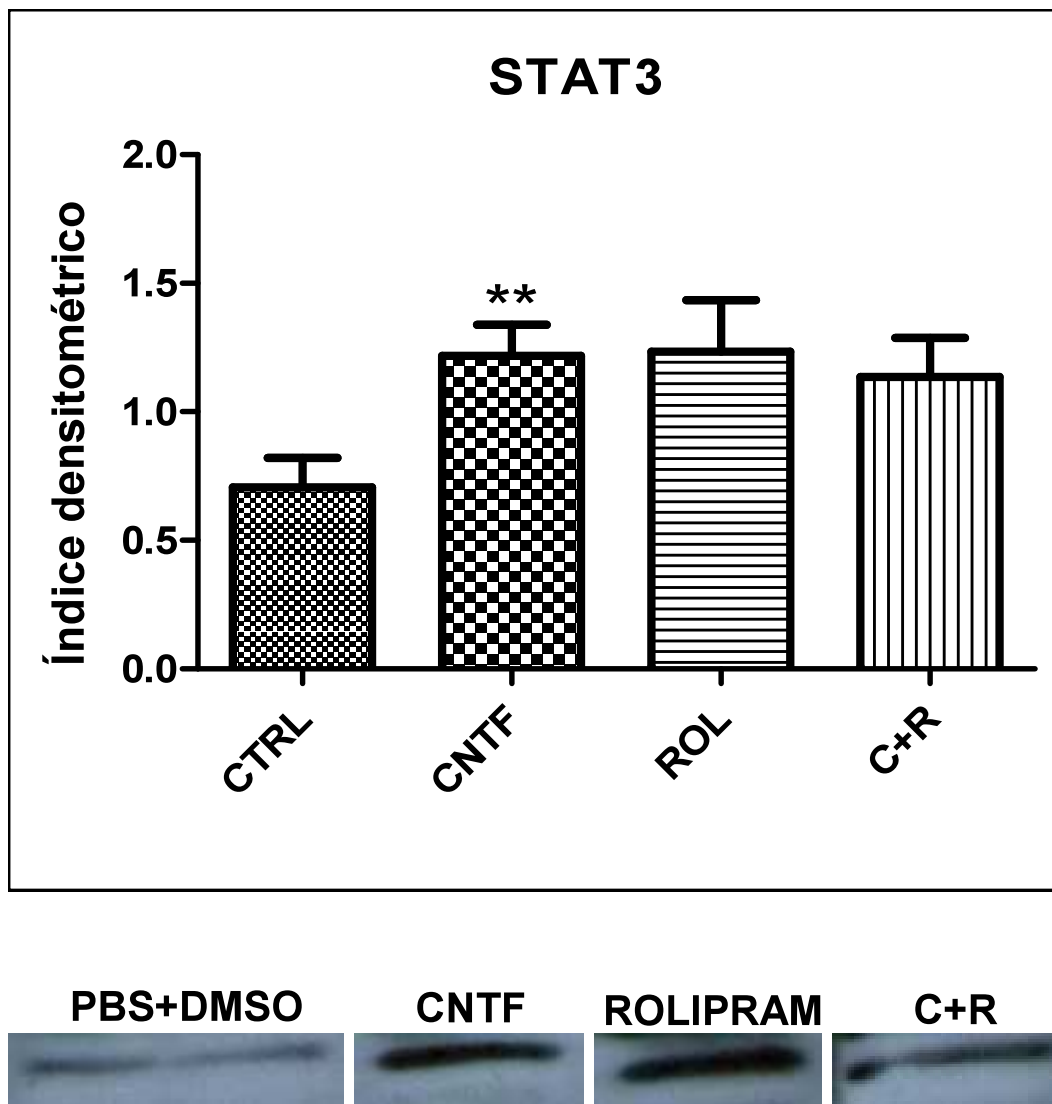


Figura 5: Quantidade total de STAT3 após os diferentes tratamentos. Pode-se verificar diferença entre os grupos CTRL e CNTF (** $p < 0,01$). Na porção inferior da figura, são mostradas bandas representativas obtidas através da técnica de Western blot para cada um dos grupos experimentais estudados. CTRL: Controle (n=10 – PBS+DMSO); CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor (n=5); ROL: Rolipram (n=5); C+R: CNTF+Rolipram (n=4). Tratamentos: 30 minutos antes, imediatamente depois e 2 horas após a lesão.

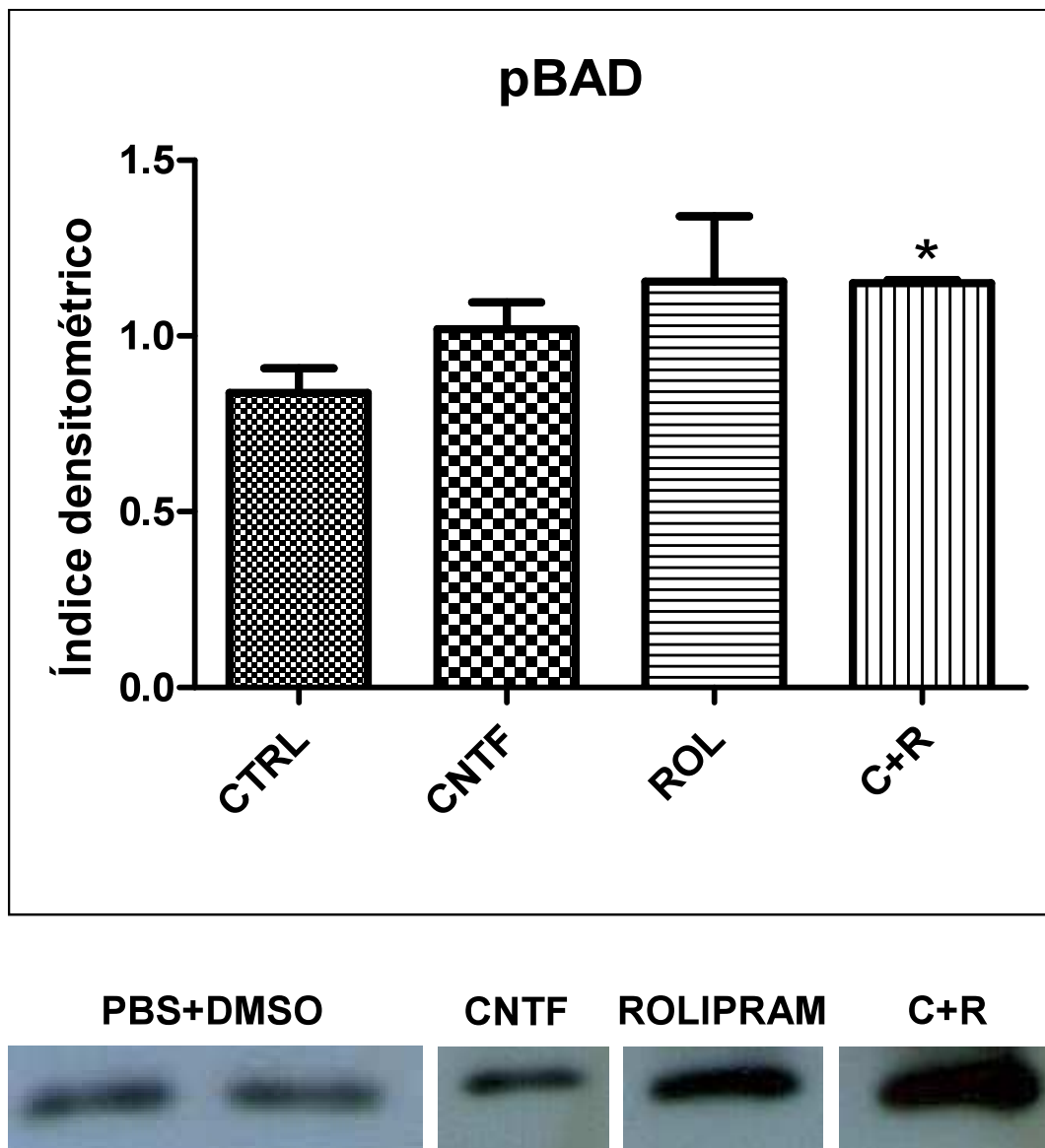


Figura 6: Fosforilação da BAD após os diferentes tratamentos. A administração conjunta de CNTF e Rolipram determinou fosforilação significativamente maior com relação à observada no grupo CTRL (* $p < 0,05$). Na porção inferior da figura, são mostradas bandas representativas obtidas através da técnica de Western blot para cada um dos grupos experimentais estudados. CTRL: Controle ($n=10$ – PBS+DMSO); CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor ($n=5$); ROL: Rolipram ($n=5$); C+R: CNTF+Rolipram ($n=4$). Tratamentos: 30 minutos antes, imediatamente depois e 2 horas após a lesão.

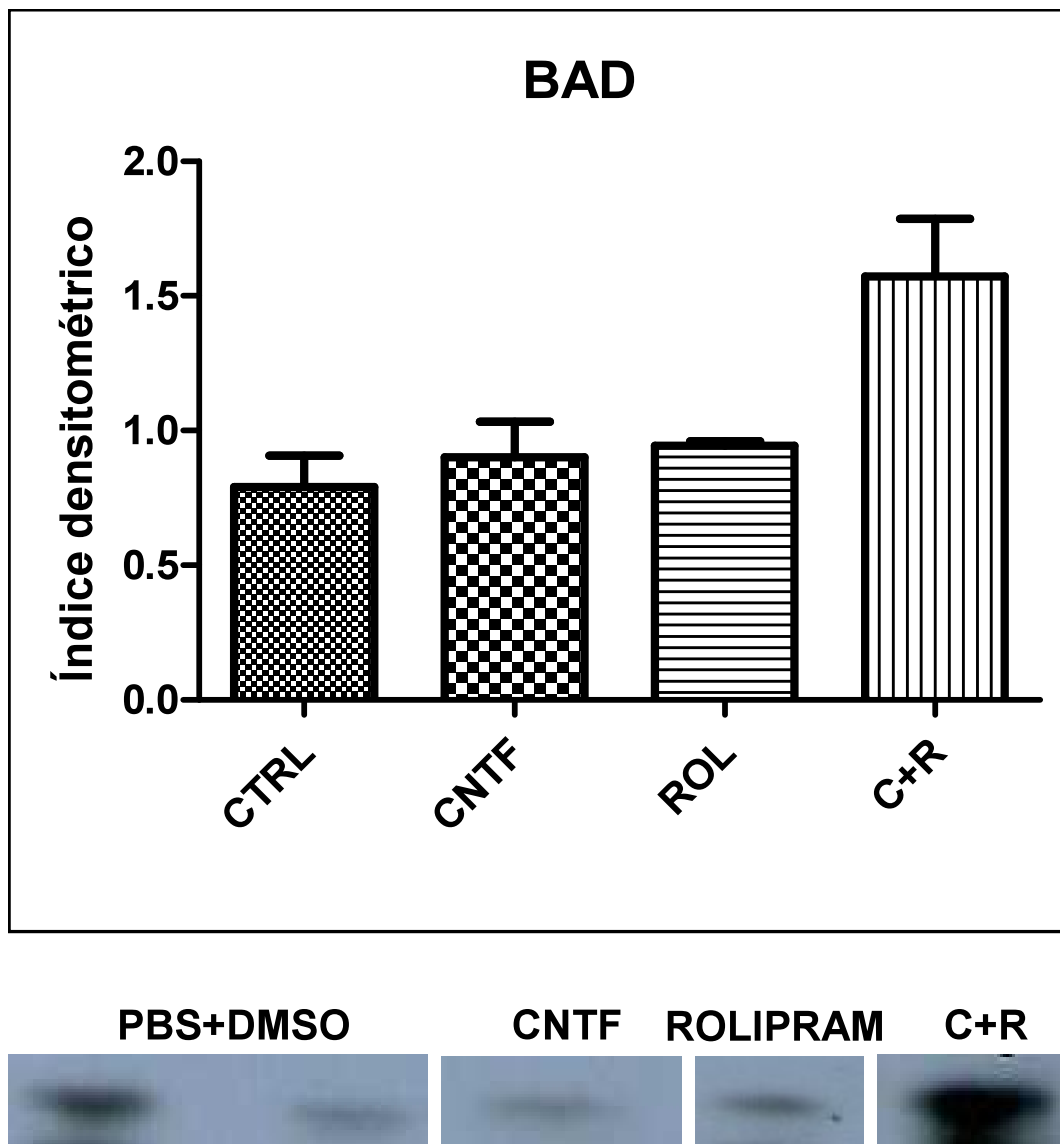


Figura 7: Expressão da proteína BAD após os diferentes tratamentos. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais estudados. Na porção inferior da figura, são mostradas bandas representativas obtidas através da técnica de Western blot para cada grupo. CTRL: Controle (n=10 – PBS+DMSO); CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor (n=5); ROL: Rolipram (n=5); C+R: CNTF+Rolipram (n=4). Tratamentos: 30 minutos antes, imediatamente depois e 2 horas após a lesão.

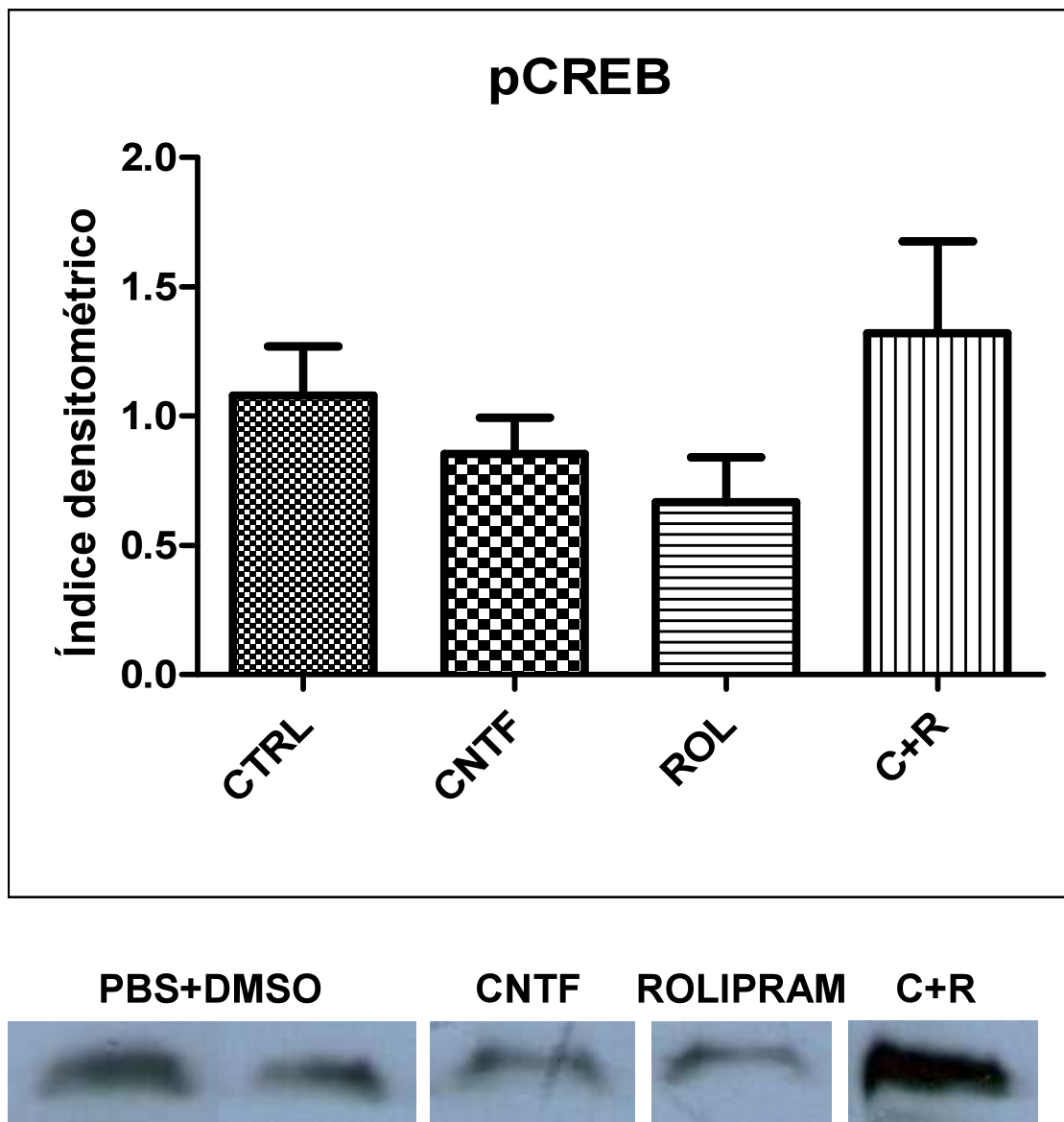


Figura 8: Fosforilação de CREB após os diferentes tratamentos. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais estudados. Na porção inferior da figura, são mostradas bandas representativas obtidas através da técnica de Western blot para cada grupo. CTRL: Controle (n=10 – PBS+DMSO); CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor (n=5); ROL: Rolipram (n=5); C+R: CNTF+Rolipram (n=4). Tratamentos: 30 minutos antes, imediatamente depois e 2 horas após a lesão.

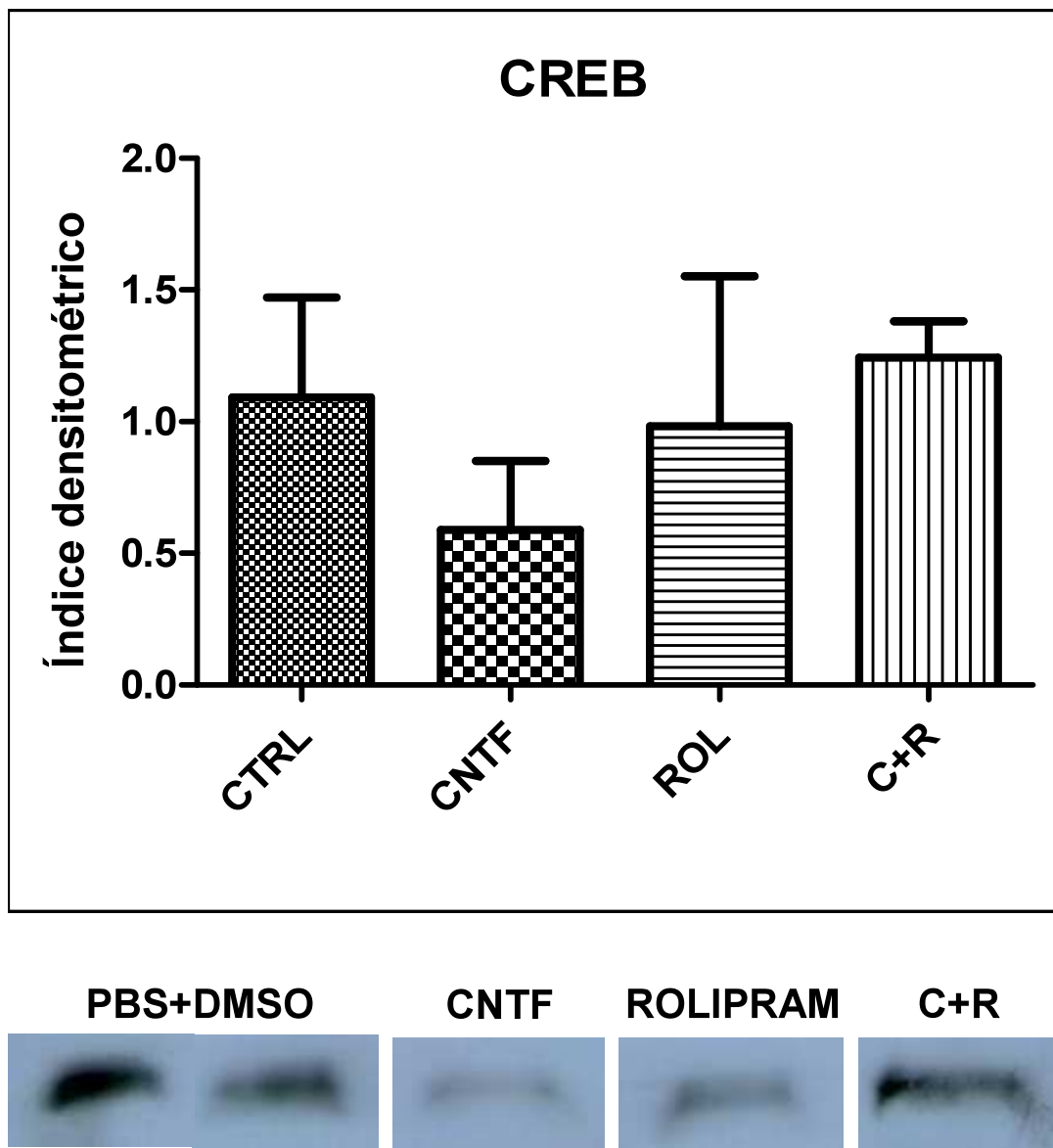


Figura 9: Expressão de CREB após os diferentes tratamentos. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais estudados. Na porção inferior da figura, são mostradas bandas representativas obtidas através da técnica de Western blot para cada grupo. CTRL: Controle (n=10 – PBS+DMSO); CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor (n=5); ROL: Rolipram (n=5); C+R: CNTF+Rolipram (n=4). Tratamentos: 30 minutos antes, imediatamente depois e 2 horas após a lesão.

Os valores de média e erro padrão obtidos após a análise densitométrica das bandas para cada proteína analisada em todos os grupos experimentais são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Média e erro padrão dos valores de densitometria das proteínas analisadas após teste-T pareado com grupo controle. CTRL: Controle; CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor; ROL: Rolipram; C+R: CNTF+Rolipram.

Proteína	Média	Erro padrão	p
pSTAT3			
CTRL	0,7988	0,02873	
CNTF	1,461	0,1496	0,0292*
ROL	1,007	0,1037	0,1243
C+R	0,9349	0,1344	0,1720
STAT3			
CTRL	0,706	0,1144	
CNTF	1,218	0,1213	0,0087**
ROL	1,235	0,199	0,0949
C+R	1,136	0,1522	0,0884
pBAD			
CTRL	0,838	0,07038	
CNTF	1,019	0,0772	0,0904
ROL	1,155	0,1853	0,1666
C+R	1,15	0,009709	0,0213*
BAD			
CTRL	0,7911	0,1163	
CNTF	0,9004	0,1341	0,3309
ROL	0,9444	0,01586	0,1623
C+R	1,573	0,2153	0,0655
pCREB			
CTRL	1,079	1,079	
CNTF	0,8537	0,1403	0,1963
ROL	0,667	0,1733	0,1462
C+R	1,322	0,3545	0,3369
CREB			
CTRL	1,093	0,3807	
CNTF	0,5887	0,2624	0,2566
ROL	0,9821	0,5706	0,4590
C+R	1,244	0,136	0,3504

4.3. Análise morfológica

Após serem realizadas as contagens dos motoneurônios da região ventrolateral da intumescência lombar da medula espinal, foram calculados os índices de sobrevivência neuronal (ISN's) para cada animal em cada grupo de tratamento. A partir dos índices individuais chegou-se a um ISN médio por grupo. Não foi observada diferença estatística entre os grupos analisados, conforme pode ser observado na figura 10. Cortes representativos da região da intumescência lombar de cada grupo estão apresentados na figura 11 (exceto DMSO).

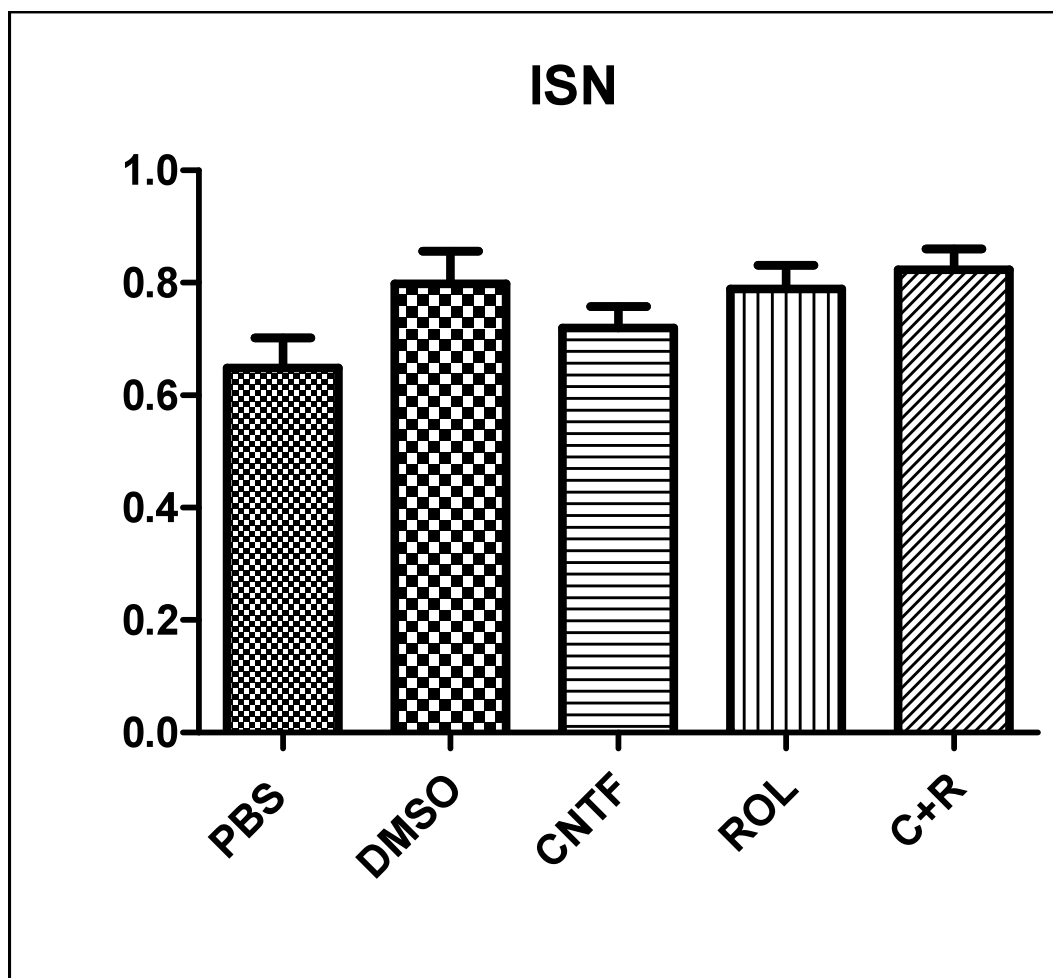


Figura 10: Índice de Sobrevivência Neuronal (ISN) de cada grupo após tratamento prolongado. Não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados. CTRL: Controle; CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor; ROL: Rolipram; C+R: CNTF+Rolipram.

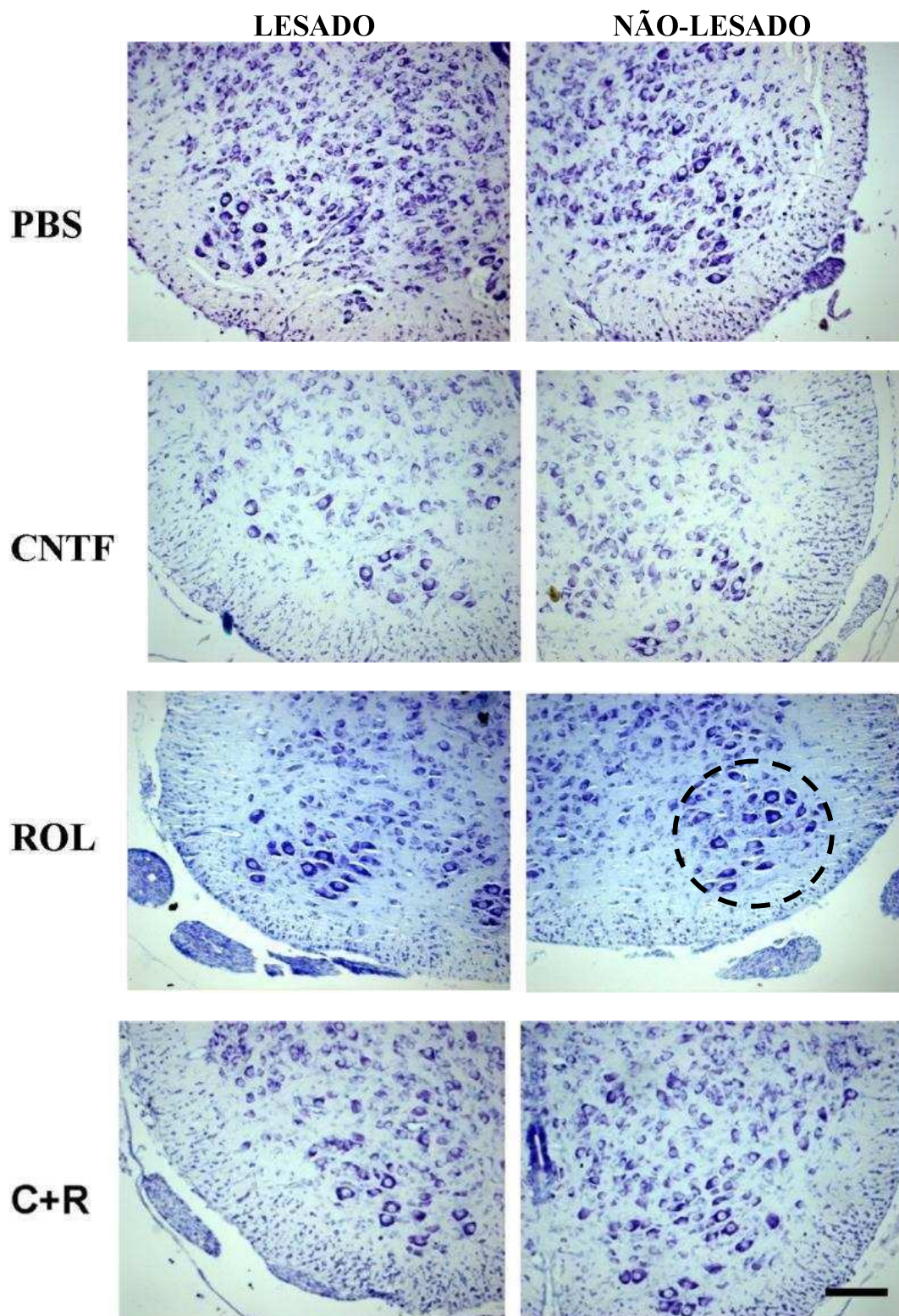


Figura 11: Cortes transversais da intumescência lombar dos animais que receberam doses subcutâneas diárias de PBS, CNTF (0,3µg/g), Rolipram (2µg/g) e CNTF+Rolipram (0,3µg/g+2µg/g). Os grupos tratados com DMSO apresentaram resultados semelhantes aos que receberam PBS. O círculo tracejado indica o grupamento ventrolateral onde se encontram os motoneurônios contados. PBS: Phosphate Buffered Saline; DMSO: Dimethyl Sulphoxide; CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor; ROL: Rolipram; C+R: CNTF+Rolipram. Barra: 100µm.

5. Discussão

O presente estudo representa a primeira investigação sobre o efeito da administração de CNTF e Rolipram, isolados ou associados, na sobrevivência de motoneurônios espinais após axotomia periférica de ratos neonatos.

O modelo experimental da axotomia em ratos neonatos empregado neste trabalho tem sido escolhido por vários autores para o estudo de agentes neurotróficos e/ou neuroprotetores (Sendtner et al., 1990, 1992a,b,c; Yan et al, 1992, Vergani et al.,1998; Rogério et al., 2002, 2005; Rezende et al., 2008, 2009). É sabido que a axotomia produzida pelo esmagamento ou secção de nervos periféricos em roedores no período da primeira semana de vida é capaz de acarretar a morte de um grande número dos motoneurônios lesados. Esse efeito é tanto mais drástico quanto mais jovem for o animal, podendo acarretar a morte de praticamente 100% dos motoneurônios quando a axotomia é realizada na idade P0 (Lowrie e Vrbova, 1992; Snider et al., 1992; Vejsada et al., 1995).

Durante a primeira semana de vida as células de Schwann parecem não expressar CNTF, já que sua detecção através de imunoistoquímica, bem como do seu mRNA, através de Northern blot, só foi possível após esse período em ratos (Stöckli et al., 1991; Dobrea et al., 1992; Sendtner et al., 1997).

Ainda, Sendtner et al. (1990) descreveram que os níveis de CNTF são baixos no período pós-natal no nervo isquiático e aumentam com a idade. Foi observado também que a expressão de mRNA de CNTF é baixa tanto na medula espinal íntegra de ratos neonatos quanto após lesão traumática entre P3 e P10, comparado com a idade adulta (Nakamura e Bregman, 2001). Nesse mesmo trabalho, foi observado também que NGF, BDNF, NT-3 e GDNF possuem uma expressão maior no mesmo período analisado. No caso de lesão, somente os níveis de BDNF aumentam no neonato. O contrário acontece

quando o tempo de observação se estende de P10 a P17, ou seja, os níveis de fatores neurotróficos diminuem e os de CNTF aumentam na medula íntegra, mostrando a relação entre a idade e a expressão do CNTF.

A expressão de fatores neurotróficos e de seus receptores diminui uma semana após axotomia de motoneurônios no período pós-natal, sendo que atinge seus piores níveis por volta de 60 dias após a lesão (Gordon, 2009). Sob essas condições, a aplicação de fatores neurotróficos exógenos seria mais eficiente em promover efeito protetor.

Papel neuroprotetor também tem sido atribuído ao cAMP (Rehen et al., 1996, Varella, 1997), assim como outras funções observadas no sistema nervoso como a diferenciação neuronal (Fujioka et al., 2004), interferência na direção do cone de crescimento (Song et al. 1997), sobrevivência neuronal (Hanson et al., 1998) e regeneração axonal no sistema nervoso central (Cai et al., 1999).

Nesta presente investigação, com a finalidade de se verificar a importância do cAMP sobre motoneurônios axotomizados de ratos neonatos com dois dias de vida, empregamos o Rolipram, um inibidor seletivo de fosfodiesterase tipo 4, o qual promove o aumento indireto dos níveis de cAMP. Ainda, estudamos a associação do Rolipram com o CNTF, reconhecido agente neuroprotetor de motoneurônios nestas condições experimentais (Rezende et al., 2008).

No presente estudo, a evolução ponderal dos animais foi avaliada durante seis dias após a secção do nervo isquiático. Dados prévios do nosso laboratório mostraram que a administração subcutânea diária de CNTF na dose de 1,2µg/g resultou em perda expressiva de massa corpórea de ratos neonatos submetidos à axotomia periférica (Rezende et al., 2009). Além disso, resultados preliminares também de nosso laboratório mostraram que a administração subcutânea, diária e conjunta de CNTF na concentração de 1,2µg/g com Rolipram (2µg/g), a ratos neonatos submetidos à axotomia do nervo

isquiático no segundo dia de vida, prejudicou sensivelmente o crescimento e ganho ponderal dos animais, culminando com a morte de todos os animais estudados, a partir do terceiro dia de tratamento. Com a finalidade de se verificar se a redução no ganho ponderal e se os efeitos deletérios do CNTF seriam atenuados, foi utilizada, no presente trabalho, uma concentração menor de CNTF (0,3µg/g) sozinho ou associado ao Rolipram. Interessantemente, constatamos que, nestas condições, os animais do grupo tratado com CNTF e Rolipram em associação não evoluíram a óbito, porém, foram os que apresentaram menor ganho de massa corpórea ao longo do experimento. De fato, comparado com os grupos tratados com PBS ou CNTF, os animais que receberam CNTF e Rolipram apresentaram ganho ponderal significativamente inferior. Até onde sabemos, das substâncias que foram administradas concomitantes no presente estudo ou em nossos experimentos preliminares, apenas o CNTF prejudicaria o ganho ponderal, visto que não foram encontrados relatos relacionando a administração de Rolipram a déficit ponderal. A hipótese que pode ser proposta para justificar o prejuízo do ganho ponderal determinado pelo tratamento com Rolipram e CNTF seria uma interferência do Rolipram sobre o metabolismo do CNTF, potencializando o conhecido efeito anorexigênico desta neurocina (Henderson et al., 1996; Rezende et al., 2009).

Com o objetivo de se estudar a ação do CNTF e Rolipram, administrados isolados ou em associação, sobre vias intracelulares relacionadas com neuroproteção, investigamos a expressão de pSTAT3, STAT3, pBAD, BAD, pCREB e CREB na intumescência lombar de ratos neonatos três horas após a secção do nervo isquiático.

O tratamento com CNTF induziu maior fosforilação da proteína STAT3 (pSTAT3). Esse resultado corrobora com o que se tem presente na literatura, pois, sabe-se que a STAT3 e sua forma fosforilada são componentes-chave ativados na via de sinalização do CNTF, via complexo receptor CNTFR α , LIFR β e gp130. Lee et al.

(2004) mostraram que a pSTAT3 é rapidamente detectada em motoneurônios, neurônios sensoriais e no segmento distal de nervo isquiático transecionado. Uma vez ativada, a STAT3 atua como fator de transcrição neuroprotetor após ser retrogradamente transportada até o corpo celular do neurônio a partir do local da lesão (Lee et al., 2004). De fato, como visto por Haas et al. (1999), ocorre fosforilação de STAT3 dentre as primeiras 24 horas e mantida por cinco dias nos motoneurônios do núcleo facial de ratos adultos após axotomia do nervo facial. De maneira similar, Kirsch et al. (2003) mostraram que STAT3 é rapidamente fosforilada, após transecção do nervo facial de camundongos C57BL/6, em motoneurônios do mesmo núcleo supracitado, nos quais o CNTF age como uma molécula sinalizadora retrógrada a partir do local da lesão. Schweizer et al. (2002) demonstraram que a ativação da STAT3 em motoneurônios de ratos está relacionada exclusivamente à regeneração e não ao desenvolvimento embrionário. Assim, é possível que, no presente trabalho, o tratamento com CNTF tenha induzido efeito protetor por um curto período após a secção do nervo isquiático nos neurônios motores da intumescência lombar. Além disso, sabe-se que o CNTF promove a sobrevivência de interneurônios da medula espinal de ratos neonatos após a axotomia do isquiático (Oliveira et al., 2002). Deste modo, é possível também que o aumento da expressão da forma fosforilada da STAT3 que detectamos no presente estudo seja decorrente da ação da neurocina neste outro tipo de neurônio. Finalmente, o restante dos tratamentos no presente trabalho não exerceu efeito sobre a fosforilação da STAT3.

O tratamento com CNTF na quantidade total de STAT3 causou efeito similar ao observado na forma fosforilada dessa proteína. Isso, do ponto de vista biológico, sugere que o tratamento com CNTF desencadeou tanto transcrição da proteína STAT3 quanto sua ativação na forma fosforilada. É interessante notar que a dose utilizada de CNTF foi de 0,3µg/g, inferior às previamente utilizadas neste mesmo modelo experimental (Vieira

et al., 2009; Rezende et al., 2008). Isso sugere que o CNTF, administrado nessa dose, foi capaz de iniciar os mecanismos de sobrevivência na maquinaria bioquímica das células nervosas da medula espinal. Além dessa ação da STAT3 em neurônios motores, outros tipos celulares na intumescência lombar de ratos neonatos poderiam ter apresentado ativação da STAT3. Corrobora com essa hipótese o relato de Tripathi e McTigue (2008), de que há maior expressão de CNTF e fosforilação de STAT3 em astrócitos após contusão espinal moderada em ratos adultos. De forma semelhante, como descrito no trabalho de Lee et al. (2004), foi observada fosforilação de STAT3 em motoneurônios e neurônios sensoriais após transecção do nervo isquiático de ratos adultos. Dominguez et al. (2008) observaram que a ligação de nervos espinais L5 e L6 de ratos adultos gerou acúmulo da forma fosforilada de STAT3 em células microgliais na porção posterior da medula. Nota-se, assim, a ativação de STAT3 em outros tipos celulares, o que contribuiria com maior sobrevivência celular na intumescência lombar, inclusive a de motoneurônios. Outra forma possível de ativação da STAT3 em neurônios motores e terminações nervosas sensoriais na intumescência lombar de ratos adultos se dá através do CNTF liberado no espaço extracelular do local lesado. Isso ocorre, pois acredita-se que o CNTF estocado nas células de Schwann seja abundantemente liberado (Sendtner et al. 1992c; Smith et al., 1993), internalizado e retrogradamente transportado pelos axônios até o corpo celular após uma lesão nervosa periférica, assim como outros fatores neurotróficos (Curtis et al. 1993). Porém, sabe-se que a transcrição de CNTF é baixa nas medulas espinais de ratos neonatos e de adultos nas condições íntegras e após lesão (Nakamura e Bregman, 2001). Por isso, a aplicação exógena de CNTF é comprovadamente eficaz na proteção de motoneurônios, além de aumentar a expressão de genes relacionados à regeneração em modelo de transecção e ligação de nervo isquiático de ratos adultos em tubo de silicone (Xu et al., 2009).

Após os tratamentos com Rolipram e a associação entre CNTF e Rolipram não foram observados fosforilação de STAT3 ou aumento de sua quantidade total. Tal observação pode ter ocorrido pelo fato de que o cAMP, mesmo sendo capaz de estimular processos de neuroproteção, não seja fundamental na promoção de sobrevivência neuronal e regeneração axonal, como discutido no trabalho de Muller em modelo de lesão de RGC (Muller et al., 2009). Nesse trabalho, os autores ainda ressaltaram o papel do CNTF aplicado isoladamente, o qual é efetivo na regeneração axonal, sem estrita dependência do cAMP como colaborador. Sabe-se, também, que a elevação de cAMP em modelo de axotomia de RGC não é suficiente para aumentar a expressão de pSTAT3 (Park et al., 2004). Han et al. (2004) estudaram o papel do db-cAMP em modelo de lesão de nervo isquiático e não observaram aumento na taxa de regeneração de neurônios. Esses autores também descreveram que não houve aumento da capacidade regenerativa de neurônios centrais mesmo na ausência de substâncias inibidoras (enxerto de nervo periférico na medula espinal após transecção da coluna dorsal). Tais autores sugerem não haver efeito do Rolipram sobre a STAT3, isolado ou em associação com CNTF. É importante ressaltar que até o presente momento não há dados na literatura relativos à influência de Rolipram sobre a STAT3 em modelos de lesão nervosa periférica e central.

Por fim, ao contrário da administração de CNTF apenas, não observamos alteração na expressão de STAT3 total ou fosforilada após a administração conjunta de CNTF e Rolipram. Possível interferência negativa de uma substância sobre a outra permanece como ponto a ser investigado.

Com relação à proteína BAD o tratamento associado entre CNTF e Rolipram elevou significativamente sua fosforilação, mesmo não tendo sido observada nos demais grupos experimentais. A importância biológica da fosforilação da BAD reside em sua inibição e, portanto, interrupção das atividades pró-apoptóticas desencadeadas por ela. O

tratamento associado de CNTF e Rolipram foi capaz de desencadear resposta anti-apoptótica já num curto período após a lesão e o tratamento. Em ratos recém-nascidos foram observados diminuição da fosforilação e aumento dos níveis totais de BAD em neurônios do hipocampo após asfixia dos ratos por imersão. Tal fato reforça o papel da BAD sobre a morte neuronal (Morales et al., 2008). Por esse motivo o tratamento com fatores neurotróficos, em conjunção ou não com outras drogas, é importante para a manutenção de mecanismos anti-apoptóticos após um estímulo lesivo. Ainda que não existam dados na literatura relativos à influência do Rolipram sobre a atividade da BAD no sistema nervoso, nossos resultados mostram que, pelo menos seu tratamento conjunto com CNTF, foi capaz de fosforilar e inibir a BAD. Além disso, o CNTF, sozinho, exerce seus efeitos neuroprotetores através da redução da expressão da proteína pró-apoptótica Bax assim como sua heterodimerização com a Bcl-2, inibindo, assim, a via apoptótica desencadeada pela Bax (Rezende et al., 2008). O tratamento associado entre Rolipram e CNTF provavelmente potencializou os efeitos anti-apoptóticos de cada uma dessas moléculas, ainda que o tratamento somente com Rolipram não tenha resultado em maior fosforilação, agindo pela via da BAD, de maneira sinérgica.

O envolvimento da BAD no processo de morte após estímulo lesivo no sistema nervoso central é visto, também, através de sua forma fosforilada (pBAD). Os níveis de BAD aumentam após lesão traumática em cérebro de ratos (Yao et al., 2005) e sua fosforilação com conseqüente retenção citosólica foi observada um dia após lesão de medula espinal de ratos (Yu et al., 2005). Sakurai et al. (2009) observaram, em modelo de isquemia de medula espinal de coelho, que tanto a BAD total quanto sua forma fosforilada estavam presentes nos motoneurônios em processo de morte celular. Esses autores discutem que a indução de pBAD logo após a reperusão da medula pode ser um fator importante na promoção da morte neuronal tardia observada após o estímulo

lesivo. Nossos resultados permitem concluir que o tratamento com CNTF e Rolipram foi capaz de desencadear processos anti-apoptóticos pela fosforilação da BAD. Além disso, nenhum tratamento resultou em expressão significativamente maior da quantidade total de BAD.

Corroborando com a ação anti-apoptótica da BAD fosforilada, Koriyama et al. (2006) observaram que os níveis de pBAD são rapidamente diminuídos na retina de peixes-dourados após lesão do nervo óptico devido à perda das RGC's. De maneira semelhante, Homma et al (2007) também observaram rápida queda na fosforilação de BAD além de morte de RGC's seis dias após a lesão do nervo óptico. Em ambos trabalhos foi observada maior expressão da proteína Bax após a lesão das RGC's, contribuindo para a morte dessas. Nesse contexto de morte por apoptose, nossos resultados são interessantes no sentido de que a fosforilação da BAD inibiria a perda celular na intumescência lombar. Além disso, é importante ressaltar que não há estudos prévios relatando os achados referentes à proteína BAD observados no presente modelo experimental. Na literatura atual não se descreve atuação do CNTF e do Rolipram, isolados, sobre a BAD. É possível propor que tanto o CNTF quanto o Rolipram não estejam envolvidos diretamente com vias intracelulares de inibição da BAD no modelo experimental aqui estudado.

Para a proteína CREB e sua forma fosforilada (pCREB) não foi observada diferença estatística entre os diferentes tratamentos. De forma semelhante, Herdegen et al. (1994) mostraram não haver aumento de pCREB em diferentes modelos de axotomia em ratos (nervos isquiático, hipoglosso e facial; feixe prosencefálico medial e trato mamilotalâmico). Porém, mostraram ocorrer fosforilação de CREB em células da glia vizinhas ao corpo celular dos motoneurônios lesados, majoritariamente, micróglia. Particularmente, tais autores também notaram que a fosforilação é aumentada na região

superficial do corno dorsal do nível lombar entre 40 minutos e 24 horas após axotomia. É importante ressaltar que essa referência é a única que descreve alterações da proteína CREB após axotomia periférica. Nossos resultados sugerem que a proteína CREB não tenha seus níveis elevados nem seja fosforilada após a secção do nervo isquiático, ao menos durante o período estudado. Outra possibilidade é que a glia no microambiente lombar no período pós-natal não possua as condições celulares necessárias para induzir e/ou fosforilar o CREB em decorrência de axotomia de nervo periférico.

Conforme exposto acima, os tratamentos a curto prazo apresentaram resultados variados. Sabendo-se que na medula espinal há diferentes populações celulares, os dados de expressão para cada proteína analisada não se aplicam exclusivamente aos motoneurônios, o principal objetivo de estudo na presente investigação. Assim, é preciso considerar que os resultados obtidos não são necessariamente decorrentes de eventos envolvendo apenas motoneurônios, mas podem também ser decorrentes de eventos ocorridos em outros tipos celulares como células da glia, interneurônios e terminações centrais de neurônios sensitivos. Por sua vez os resultados do tratamento a longo prazo no presente trabalho mostraram que a administração de CNTF e/ou Rolipram não foi capaz de desencadear resposta de neuroproteção, visto que não houve diferença estatística entre os grupos estudados, após os cálculos dos ISN's. Uma explicação para essa observação consiste na possibilidade de que as doses utilizadas de CNTF tenham sido baixas. Especificamente, a dose empregada de CNTF pode não ter sido capaz de desencadear efeitos sobre motoneurônios ou outras populações celulares. O fato observado no presente estudo e que corrobora com esta hipótese é a ausência de influência do CNTF sobre o ganho ponderal dos animais. De fato, o padrão de evolução ponderal observado no grupo CNTF se assemelha ao dos grupos controle, sendo que, em doses altas, essa neurocina induz intensa perda de massa corpórea (Rezende et al., 2009).

Outra possível explicação para os resultados obtidos após o tratamento prolongado seria o tempo decorrido entre a aplicação da lesão e a análise da intumescência lombar. É possível que, após cinco dias de tratamento, as alterações nas vias de sinalização celular não tenham sido suficientes para garantir a sobrevivência dos motoneurônios lesados. Deve-se considerar, conforme mencionado anteriormente, que o ambiente medular é constituído por diferentes populações celulares (neurônios e glia). Especificamente, é descrito que, tanto astrócitos cerebrais quanto espinais, reagem a estímulos lesivos mudando suas características morfológicas e secretando fatores neurotróficos e moléculas imunorregulatórias (Chadi et al., 1998). Em modelo de lesão do sistema nervoso central, os astrócitos são responsáveis pela liberação de fatores inibitórios do crescimento axonal em ratos adultos (McKeon et al., 1991). Em ratos neonatos observa-se, também, esse tipo de reação astrocitária, denominada gliose, após lesão da medula espinal (Firkins et al., 1993). As proteínas GFAP (do inglês, glial fibrillary acidic protein) e vimentina são especialmente aumentadas em astrócitos reativos. O controle da expressão dessas proteínas, tanto por vetores lentivirais quanto por transgenia, constitui-se importante estratégia do controle da gliose (Ribotta et al., 2004; Desclaux et al., 2009). Assim como a reação astrocitária e a consequente formação da cicatriz glial ocorre após lesão nervosa central, a mesma reação pode ser induzida após lesão nervosa periférica. Murray et al. (1990) observaram que ocorre aumento da síntese de GFAP em astrócitos reativos após lesão de nervo isquiático de ratos adultos tanto no corno ventral quanto no dorsal das medulas espinais desses animais. Essa alteração é também vista três dias após a intervenção cirúrgica no lado contralateral da medula espinal, ou seja, os astrócitos respondem a estímulos tanto derivados da degeneração Walleriana (degeneração de nervos periféricos decorrente de uma lesão) quanto de alterações retrógradas e transganglionares. Em modelo de lesão de nervo tibial de ratos adultos,

Lee et al. (2009) observaram que, além da redução de interneurônios GABAérgicos, houve aumento na expressão de GFAP em astrócitos dos cornos ventral e dorsal da medula espinal dos animais, tanto ipsi quanto contralateralmente. Sabe-se que, no modelo experimental que estudamos, a axotomia resulta em reação glial ispilateral à lesão (Rogério et al., 2002). A natureza detalhada da resposta astrocitária é controversa. Alguns autores argumentam que essa resposta possui um papel benéfico, como a estabilização do tecido nervoso após a lesão, prevenção da ação inflamatória, reparo da barreira hematoencefálica, dentre outros (Silver e Miller, 2004; Sofroniew, 2009). Ao contrário, outros autores defendem que a reação astrocitária não tenha repercussão positiva sobre os diferentes tipos celulares no sistema nervoso central, como a restrição do crescimento axonal, demonstrado por Bush et al. (1999) em modelo de lesão cerebral em camundongos. Wanner et al. (2008) realizaram experimento *in vitro* no qual mimetizaram a formação de uma cicatriz glial e observaram que, além da expressão aumentada de GFAP e marcadores associados à gliose (fosfacan, neurocan e tenascinas), inibiram o crescimento de neuritos colocados junto à cultura. De fato, Nikulina et al. (2004) reportaram que a administração de Rolipram atenuou a marcação de GFAP na medula espinal após hemissecção cervical em ratos, denotando uma diminuição na ativação dos astrócitos reativos. Tais autores discutem no trabalho que a cicatriz glial formada constitui uma barreira física para o crescimento axonal. É possível que, no presente estudo, ocorreram alterações substanciais na população glial das medulas dos animais estudados, levando, assim, a um padrão de inibição tanto do crescimento axonal quanto da sobrevivência celular.

Como visto em outros trabalhos, doses baixas de Rolipram (0,1 ou 0,3µg/g) foram mais eficientes em promover sobrevivência neuronal em modelos de isquemia e lesão medular (Block et al., 1997; Nikulina et al., 2004; Atkins et al., 2007) em

comparação a doses maiores. Foi visto ainda que alta concentração de Rolipram pode causar letargia e outros efeitos colaterais em camundongos (Barad et al., 1998). A dose utilizada no presente estudo foi, possivelmente, alta e pode ter sido ineficiente e incapaz de promover a sobrevivência de neurônios da intumescência lombar. Resultados similares foram observados por Nikulina et al. (2004), que testaram diferentes doses de Rolipram em modelo de lesão medular de ratos jovens e observaram que altas doses não determinavam a mesma resposta de extensão de neuritos, comparando-se com doses menores.

Em especial, o tratamento com CNTF e Rolipram em associação não garantiu a sobrevivência dos motoneurônios lombares no presente estudo. Apesar de ter sido descrito que a elevação de cAMP junto da aplicação de fatores tróficos em motoneurônios é capaz de promover sua sobrevivência em cultura por até três semanas (Hanson et al., 1998), Rakowicz et al. (2002) observaram que o CPT-cAMP não foi capaz de aumentar a sobrevivência de motoneurônios tratados com BDNF, CNTF e GDNF na intumescência lombar *in vivo*. Nota-se, assim, que o cAMP pode apresentar um comportamento diferente quando aplicado em conjunto com fatores tróficos, a depender do modelo experimental estudado. Wu et al. (2007) observaram que a administração intraganglionar conjunta de CNTF e db-cAMP em DRG de ratos adultos não produziu efeitos sinérgicos sobre a regeneração axonal. Estes autores levantaram a hipótese de que o CNTF não teria alcançado concentração adequada nos DRG's. Porém, ao considerarem que essas vias estão associadas à síntese de diferentes moléculas implicadas na regeneração neuronal, interpretaram os resultados obtidos como uma evidência de que as vias de sinalização do CNTF e do cAMP sejam convergentes mais no início do que no final das mesmas, antes de envolverem os efetores finais das vias relacionadas, pelo fato de que, ao se iniciar, uma cascata de sinalização celular é

possível amplificar o sinal gerado através do recrutamento sucessivo e direcionado de proteínas intracelulares. Sendo assim, as proteínas finais envolvidas nas duas vias, STAT3 e CREB, não teriam participação sinérgica no fenômeno neuroprotetor. Wu et al. (2007) mostraram, ainda, que a inibição da sinalização da JAK2 (uma proteína participante do início da via de sinalização do CNTF) por AG490, diminui neuroproteção mediada por cAMP, o qual estimularia a síntese de neuroquinas por neurônios e células não-neuronais adjacentes (Cao et al., 2006). Ou seja, logo no começo da sinalização intracelular iniciada pelo CNTF, é possível influenciar negativamente a ação neuroprotetora do cAMP através da interrupção da via da JAK/STAT.

A capacidade de se aumentar as respostas regenerativas de células nervosas tem sido alvo de intensa investigação com o objetivo de contribuir com estratégias de reparo do sistema nervoso. Com esse intuito, estudamos os efeitos da administração sistêmica de CNTF e/ou Rolipram após a secção do nervo isquiático de ratos neonatos. Nas doses utilizadas no presente trabalho, não foi observado efeito neuroprotetor em motoneurônios da intumescência lombar. A utilização de diferentes doses das drogas utilizadas, bem como mudança do esquema e de vias de administração, poderiam contribuir com a investigação de novas abordagens para tratamento de lesões traumáticas nervosas periféricas.

6. Conclusões

1 - O tratamento por cinco dias com CNTF (0,3µg/g) e Rolipram (2µg/g) em associação potencializa o efeito de perda de massa corpórea nos animais. Por outro lado, a administração apenas de CNTF (0,3µg/g) não influenciou a evolução ponderal dos animais, diferentemente do observado com doses superiores em outros estudos prévios.

2 - CNTF e Rolipram, isolados ou associados, foram capazes de estimular diferentes vias de sinalização em um curto período de tempo analisado, após a secção do nervo isquiático de ratos neonatos.

O CNTF estimulou a transcrição e fosforilação de STAT3, sugerindo ação protetora sobre as células da intumescência lombar no período neonatal.

O tratamento associado entre Rolipram e CNTF foi capaz de estimular a fosforilação de BAD, possivelmente inibindo a morte celular por apoptose. Para a quantidade total de BAD não houve diferença entre os tratamentos.

Para o fator de transcrição CREB e sua forma fosforilada (pCREB) não foi observada alteração após os tratamentos, o que sugere que, durante o intervalo do período neonatal estudado, ele não possui um papel relevante neste modelo experimental de axotomia periférica.

3 - Não se observou influência dos tratamentos crônicos na morte de motoneurônios na medula espinal de ratos neonatos submetidos à axotomia periférica. Essa observação pode ter sido decorrente do esquema de tratamento estudado e/ou alterações inibitórias de regeneração no microambiente medular.

7. Referências Bibliográficas

- AGLAH C, GORDON T, POSSE DE CHAVES EI. cAMP promotes neurite outgrowth and extension through protein kinase A but independently of Erk activation in cultured rat motoneurons. **Neuropharmacology.**, **55(1)**:8-17, 2008.
- ASADA H, IP NY, PAN L, RAZACK N, PARFITT MM, PLUNKETT RJ. Time course of ciliary neurotrophic factor mRNA expression is coincident with the presence of protoplasmic astrocytes in traumatized rat striatum. **J Neurosci Res.**, **40(1)**:22-30, 1995.
- ATKINS CM, OLIVA AA JR, ALONSO OF, PEARSE DD, BRAMLETT HM, DIETRICH WD. Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury. **Exp Neurol.**, **208(1)**:145-58, 2007.
- BARAD M, BOURTCHOULADZE R, WINDER DG, GOLAN H, KANDEL E. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. **Proc Natl Acad Sci USA.**, **95(25)**:15020-5, 1998.
- BARBACID M. The Trk family of neurotrophin receptors. **J Neurobiol.**, **25(11)**:1386-403, 1994.
- BARBIN G, MANTHORPE M, VARON S. Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. **J Neurochem.**, **43(5)**:1468-78, 1984.
- BLOCK F, TONDAR A, SCHMIDT W, SCHWARZ M. Delayed treatment with rolipram protects against neuronal damage following global ischemia in rats. **Neuroreport.**, **8(17)**:3829-32, 1997.
- BOULTON TG, ZHONG Z, WEN Z, DARNELL JE JR, STAHL N, YANCOPOULOS GD. STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. **Proc Natl Acad Sci USA**, **92(15)**:6915-9, 1995.
- BUSH TG, PUVANACHANDRA N, HORNER CH, POLITO A, OSTENFELD T, SVENDSEN CN, MUCKE L, JOHNSON MH, SOFRONIEW MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. **Neuron.** **23(2)**:297-308, 1999.
- CAFFERTY WB, GARDINER NJ, DAS P, QIU J, MCMAHON SB, THOMPSON SW. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. **J. Neurosci.** **24**: 4432-4443, 2004.
- CAI D, SHEN Y, DE BELLARD M, TANG S, FILBIN MT. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. **Neuron.**, **22(1)**:89-101, 1999.
- CAI D, QIU J, CAO Z, MCATEE M, BREGMAN BS, FILBIN MT. Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. **J Neurosci.**, **21(13)**:4731-9, 2001.
- CAO Z, GAO Y, BRYSON JB, HOU J, CHAUDHRYN, SIDDIQ M, MARTINEZ J, SPENCER T, CARMEL J, HART RB, FILBIN MT. The cytokine interleukin-6 is sufficient but not necessary to mimic the peripheral conditioning lesion effect on axonal growth. **J Neurosci.** **26**: 5565-5573, 2006.
- CEN LP, LUO JM, ZHANG CW, FAN YM, SONG Y, SO KF, VAN ROOIJEN N, PANG CP, LAM DS, CUI Q. Chemotactic effect of ciliary neurotrophic factor on macrophages in retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **48(9)**:4257-66, 2007.

- CHADI G, CASTELUCCI P, GOMIDE VC. Experimental microneurosurgery of the central and peripheral nervous system in the study of the neuronal and glial trophism and plasticity. **Acta Cir Bras.** **13(1)**:08-17, 1998.
- CHEN RW, WILLIAMS AJ, LIAO Z, YAO C, TORTELLA FC, DAVE JR. Broad spectrum neuroprotection profile of phosphodiesterase inhibitors as related to modulation of cell-cycle elements and caspase-3 activation. **Neurosci Lett.** **17;418(2)**:165-9, 2007.
- CUI Q. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. **Mol Neurobiol.** **33(2)**:155-79, 2006.
- CUI, Q, YIP, HK, ZHAO, RC, SO, KF, HARVEY, AR. Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. **Mol. Cell. Neurosci.** **22**: 49–61, 2003.
- CURTIS R, ADRYAN KM, ZHU Y, HARKNESS PJ, LINDSAY RM, DISTEFANO PS. Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. **Nature**, **365(6443)**:253-5, 1993.
- DALLNER C, WOODS AG, DELLER T, KIRSCH M, HOFMANN HD. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. **Glia**, **15;37(4)**:374-8, 2002.
- DATTA SR, DUDEK H, TAO X, MASTERS S, FU H, GOTOH Y, GREENBERG ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell.**, **17;91(2)**:231-41, 1997.
- DAVIS S, ALDRICH TH, IP NY, STAL N, SCHERER S, FARRUGGELLA T, DISTEFANO PS, CURTIS R, PANAYOTATOS N, GASCAN H, CHEVALIER S, YANCOPOULOS GD. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. **Science**, **259**:1736-1739, 1993.
- DESCLAUX M, TEIGELL M, AMAR L, VOGEL R, GIMENEZ Y, RIBOTTA M, PRIVAT A, MALLET J. A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth in vitro. **PLoS One.** **4(7)**:e6227, 2009.
- DOBREA GM, UNNERSTALL JR, RAO MS. The expression of CNTF message and immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of the rat. **Dev. Brain Res.**, **66**:209-219, 1992.
- DOMINGUEZ E, RIVAT C, POMMIER B, MAUBORGNE A, POHL M. JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. **J Neurochem.** **107(1)**:50-60, 2008.
- EGAWA T, MISHIMA K, MATSUMOTO Y, IWASAKI K, IWASAKI K, FUJIWARA M. Rolipram and its optical isomers, phosphodiesterase 4 inhibitors, attenuated the scopolamine-induced impairments of learning and memory in rats. **Jpn J Pharmacol.** **75(3)**:275-81, 1997.
- FIRKINS SS, BATES CA, STELZNER DJ. Corticospinal tract plasticity and astroglial reactivity after cervical spinal injury in the postnatal rat. **Exp Neurol.** **120(1)**:1-15, 1993.
- FRIEDMAN B, SCHERER SS, RUDGE JS, HELGREN M, MORRISEY D, MCCLAIN J, WANG DY, WIEGAND SJ, FURTH ME, LINDSAY RM. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. **Neuron**, **9(2)**:295-305, 1992.
- FUJIOKA T, FUJIOKA A, DUMAN RS. Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. **J Neurosci.** **24(2)**:319-28, Jan 14, 2004.

- GAO Y, DENG K, HOU J, BRYSON JB, BARCO A, NIKULINA E, SPENCER T, MELLADO W, KANDE ER, FILBIN MT. Activated CREB Is Sufficient to Overcome Inhibitors in Myelin and Promote Spinal Axon Regeneration In Vivo. **Neuron.**, **44**:609–621, 2004.
- GORDON T, CHAN KM, SULAIMAN OA, UDINA E, AMIRJANI N, BRUSHART TM. Accelerating axon growth to overcome limitations in functional recovery after peripheral nerve injury. **Neurosurgery**, **65 (4 Suppl)**:132-44, 2009.
- GORDON T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. **Neurosurg Focus**. **26(2)**:E3, 2009.
- GOZES I, BRENNEMAN DE. A new concept in the pharmacology of neuroprotection. **J Mol Neurosci.**, **14 (1-2)**: 61-68, 2000.
- HAAS CA, HOFMANN HD, KIRSCH M. Expression of CNTF/LIF-receptor components and activation of STAT3 signaling in axotomized facial motoneurons: evidence for a sequential postlesional function of the cytokines. **J Neurobiol.** **41(4)**:559-71, 1999.
- HAGG T, QUON D, HIGAKI J, VARON S. Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. **Neuron**, **8(1)**:145-58, 1992.
- HAN PJ, SHUKLA S, SUBRAMANIAN PS, HOFFMAN PN. Cyclic AMP elevates tubulin expression without increasing intrinsic axon growth capacity. **Exp Neurol.**, **189(2)**:293-302, 2004.
- HANNILA SS, FILBIN MT. The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. **Experimental Neurology** **209**: 321–332, 2008.
- HANSON JR MG, SHEN S, WIEMELT AP, MCMORRIS FA, BARRES BA. Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. **J Neurosci.** **18**: 7361–7371, 1998.
- HAPNER SJ, NIELSEN KM, CHAVERRA M, ESPER RM, LOEB JA, LEFCORT F. NT-3 and CNTF exert dose-dependent, pleiotropic effects on cells in the immature dorsal root ganglion: neuregulin-mediated proliferation of progenitor cells and neuronal differentiation. **Dev Biol.** **1;297(1)**: 182-97, 2006.
- HARADA H, BECKNELL B, WILM M, MANN M, HUANG LJ, TAYLOR SS, SCOTT JD, KORSMEYER SJ. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. **Mol Cell.**, **3(4)**: 413-422, 1999.
- HASHIMOTO Y, KURITA M, AISO S, NISHIMOTO I, MATSUOKA M. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130. **Mol Biol Cell.** **20(12)**:2864-73, 2009.
- HEINRICH, PC, BEHRMANN, I, HAAN, S, HERMANN, H., MULLER-NEWEN, G, SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. **Biochem. J.** **374**: 1–20, 2003.
- HENDERSON JT, SENIUK NA, RODER JC. Localization of CNTF immunoreactivity to neurons and astroglia in the CNS. **Mol. Brain Res.**, **22(1-4)**:151-65, 1994.
- HENDERSON JT, MULLEN BJ, RODER JC. Physiological effects of CNTF-induced wasting. **Cytokine.** **8(10)**:784-93, 1996.
- HERDEGEN T, GASS P, BRECHT S, NEISS WF, SCHMID W. The transcription factor CREB is not phosphorylated at serine 133 in axotomized neurons: implications for the expression of AP-1 proteins. **Brain Res Mol Brain Res.**, **26(1-2)**:259-70, 1994.

- HOMMA K, KORIYAMA Y, MAWATARI K, HIGUCHI Y, KOSAKA J, KATO S. Early downregulation of IGF-I decides the fate of rat retinal ganglion cells after optic nerve injury. **Neurochem Int**, **50(5)**:741-8, 2007.
- INOUE M, NAKAYAMA C, NOGUCHI H. Activating mechanism of CNTF and related cytokines. **Mol. Neurobiol.**, **12(3)**:195-209, 1996.
- IP NY, WIEGAND SJ, MORSE J, RUDGE JS. Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. **Eur. J. Neurosci.**, **5**:25-33, 1993.
- IYO M, MAEDA Y, INADA T, KITAO Y, SASAKI H, FUKUI S. The effects of a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor, rolipram, on methamphetamine-induced behavior. **Neuropsychopharmacology**. **13(1)**:33-9, 1995.
- KIRSCH M, HOFMANN HD. Expression of ciliary neurotrophic factor mRNA and protein in the early postnatal and adult rat nervous system. **Neurosci. Lett.**, **180**: 163-166, 1994.
- KIRSCH M, TERHEGGEN U, HOFMANN. Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. **Mol. Cell. Neurosci.**, **24**:130-138, 2003.
- KOLLER WC. Neuroprotective therapy for Parkinson's disease. **Exp Neurol.**, **144**:24-8, 1997.
- KORIYAMA Y, HOMMA K, KATO S. Activation of cell survival signals in the goldfish retinal ganglion cells after optic nerve injury. **Adv Exp Med Biol.** (**572**):333-7, 2006.
- KUZIS K, ECKENSTEIN FP. Ciliary neurotrophic factor as a motor neuron trophic factor. **Perspect. Dev. Neurobiol.**, **4(1)**:65-74, 1996.
- LEE DA, ZURAWEL RH, WINDEBANK AJ. Ciliary neurotrophic factor expression in Schwann cells is induced by axonal contact. **J. Neurochem.**, **65(2)**:564-8, 1995.
- LEE JW, SIEGEL SM, OAKLANDER AL. Effects of distal nerve injuries on dorsal-horn neurons and glia: relationships between lesion size and mechanical hyperalgesia. **Neuroscience**. **158(2)**:904-14, 2009.
- LEE N, NEITZEL KL, DEVLIN BK, MACLENNAN AJ. STAT3 phosphorylation in injured axons before sensory and motor neuron nuclei: potential role for STAT3 as a retrograde signaling transcription factor. **J Comp Neurol.**, **474(4)**:535-45, 2004.
- Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. **Mol Cell Biol.** **20(24)**:9356-63, 2000.
- LILLIEN LE, SENDTNER M, RAFF MC. Extracellular matrix-associated molecules collaborate with ciliary neurotrophic factor to induce type-2 astrocyte development. **J. Cell Biol.**, **111(2)**:635-44, 1990.
- LIN LFH, MISMER D, LILE JD, ARMES LG, BUTLER III ET, VANNICE JL, COLLINS F. Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). **Science**, **46(4933)**:1023-5, 1989.
- LINDSAY, RM. Specificity, synergy and autocrine roles of the neurotrophins and CNTF. In: Life and Death in Nervous System. Eds. Ibáñez CF, Hökfelt T, Olson L, Fuxe K, Jörnvall H, Ottoson D. New York, Pergamon, (Wenner-Gren International Series, v. 67). p.363-378, 1995.

- LO AC, LI L, OPPENHEIM RW, PREVETTE D, HOUENOU LJ. Ciliary neurotrophic factor promotes the survival of spinal sensory neurons following axotomy but not during the period of programmed cell death. **Exp Neurol.** **134**: 49–55, 1995.
- LONZE, BE, GINTY, DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. **Neuron.**, **35**:605–623, 2002.
- LOWRIE MB, VRBOVA G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. **Trends Neurosci.**, **15 (03)**: 80-84, 1992.
- LOWRIE MB, LAVALETTE D, DAVIES CE. Time course of motoneurone death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. **Dev. Neurosci.**, **16(5-6)**:279-84, 1994.
- LOWRIE MB, LAWSON SJ. Cell death of spinal interneurons. **Prog Neurobiol.** **61(6)**:543-55, 2000.
- MANTHORPE M, SKAPER SD, WILLIAMS LR, VARON S. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor. **Brain Res.**, **367(1-2)**:282-6, 1986.
- MACLENNAN AJ, VINSON EN, MARKS L, MCLAURIN DL, PFEIFER M, LEE N. Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha expression in the rat nervous system. **J Neurosci.** **16(2)**:621-30, 1996.
- MCKEON RJ, SCHREIBER RC, RUDGE JS, SILVER J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. **J Neurosci.** **11(11)**:3398-411, 1991.
- MCKNIGHT GS. Cyclic AMP second messenger systems. **Curr Opin Cell Biol.**, **3(2)**:231-217, 1991.
- MENTIS GZ, DÍAZ E, MORAN LB, NAVARRETE R. Early alterations in the electrophysiological properties of rat spinal motoneurons following neonatal axotomy. **J Physiol.** **582(3)**:1141-61, 2007.
- MORALES P, FIEDLER JL, ANDRÉS S, BERRIOS C, HUAIQUÍN P, BUSTAMANTE D, CARDENAS S, PARRA E, HERRERA-MARSCHITZ M. Plasticity of hippocampus following perinatal asphyxia: effects on postnatal apoptosis and neurogenesis. **J Neurosci Res**, **86(12)**:2650-62, 2008.
- MÜLLER A, HAUKE TG, LEIBINGER M, MARIENFELD R, FISCHER D. Exogenous CNTF stimulates axon regeneration of retinal ganglion cells partially via endogenous CNTF. **Mol Cell Neurosci.** **41(2)**:233-46, 2009.
- MURRAY M, WANG SD, GOLDBERGER ME, LEVITT P. Modification of astrocytes in the spinal cord following dorsal root or peripheral nerve lesions. **Exp Neurol.** **110(3)**:248-57, 1990.
- NAKAGAWA S, KIM JE, LEE R, MALBERG JE, CHEN J, STEFFEN C, ZHANG YJ, NESTLER EJ, DUMAN RS. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. **J Neurosci.** **1;22(9)**:3673-82, 2002.
- NAKAMURA M, BREGMAN BS. Differences in neurotrophic factor gene expression profiles between neonate and adult rat spinal cord after injury. **Exp Neurol.**, **169(2)**:407-15, 2001.
- NEGRO A, CORONA G, BIGON E, MARTINI I, GRANDI C, SKAPER SD, CALLEGARO L. Synthesis, purification, and characterization of human ciliary neuronotrophic factor from E. coli. **J. Neurosci. Res.**, **29(2)**:251-60, 1991a.

NEGRO A, TOLOSANO E, SKAPER SD, MARTINI I, CALLEGARO L, SILENGO L, FIORINI F, ALTRUDA F. Cloning and expression of human ciliary neurotrophic factor. **Eur. J. Biochem.**, **201(1)**:289-94, 1991b.

NEUMANN, S, WOOLF, CJ. Regeneration of dorsal column fibres into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. **Neuron** **23**: 83–91, 1999.

NEUMANN S, BRADKE F, TESSIER-LAVIGNE M, BASBAUM AI. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. **Neuron** **34**: 885–893, 2002.

NIKULINA E, TIDWELL, J L, DAI H N, BREGMAN B S, FILBIN MT. The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. **Proc Natl Acad Sci USA** **101(23)**:8786-90, 2004.

OLIVEIRA AL, RISLING M, NEGRO A, LANGONE F, CULLHEIM S. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. **J. Comp. Neurol.**, **447(4)**:381-93, 2002.

PARK K, LUO JM, HISHEH S, HARVEY AR, CUI Q. Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells. **J Neurosci.**, **24(48)**:10806-15, 2004.

PEARSE DD, PEREIRA FC, MARCILLIO AE, BATES ML, BERROCAL YA, FILBIN MT, BUNGE MB. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. **Nat Med.**, **10**: 610-616, 2004.

PUN S, SANTOS AF, SAXENA S, XU L, CARONI P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. **Nat Neurosci.** **9(3)**:408-19, 2006.

QIU J, CAI D, DAI H, MCATEE M, HOFFMAN PN, ET AL. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. **Neuron.** **34**: 895-903, 2002.

QIU J, CAFFERTY WB, MCMAHON SB, THOMPSON SW. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. **J Neurosci.** **25**: 1645-1653, 2005.

RAKOWICZ WP, STAPLES CS, MILBRANDT J, BRUNSTROM JE, JOHNSON EM JR. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival of early postnatal spinal motor neurons in the lateral and medial motor columns in slice culture. **J Neurosci.**, **22(10)**:3953-62, 2002.

RANA OR, SCHAUERTE P, HOMMES D, SCHWINGER RH, SCHRÖDER JW, HOFFMANN R, SAYGILI E. Mechanical stretch induces nerve sprouting in rat sympathetic neurocytes. **Auton Neurosci.** [Epub ahead of print], 2010.

REHEN SK, VARELLA MH, FREITAS FG, MORAES MO, LINDEN R. Contrasting effects of protein synthesis and of cyclic AMP on apoptosis in the developing retina. **Development**, **122**: 1439-1448, 1996.

RENDE M, HAGG T, MANTHORPE M, VARON S. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in neurons of the normal adult rat spinal cord and its modulation after peripheral nerve lesions. **J. Comp. Neurol.**, **319(2)**:285-98, 1992.

REZENDE AC, VIEIRA AS, ROGÉRIO F, REZENDE LF, BOSCHERO AC, NEGRO A, LANGONE F. Effects of systemic administration of ciliary neurotrophic factor on Bax and Bcl-2 proteins in the lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection. **Braz J Med Biol Res.**, **41(11)**:1024-8, 2008.

- REZENDE AC, PERONI D, VIEIRA AS, ROGERIO F, TALAISYS RL, COSTA FT, LANGONE F, SKAPER SD, NEGRO. A Ciliary neurotrophic factor fused to a protein transduction domain retains full neuroprotective activity in the absence of cytokine-like side effects. **J Neurochem.**, **109(6)**:1680-90, 2009.
- RIBOTTA MG, MENET V, PRIVAT A. Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice. **Acta Neurochir Suppl.** **89**:87-92, 2004.
- RICHARDSON, PM, VERGE, VMK. Axonal regeneration in dorsal spinal roots is accelerated by peripheral axonal transection. **Brain Res.** **411**: 406–408, 1987.
- RICHARDSON PM. Ciliary neurotrophic factor: a review. **Pharmacol. Ther.**, **63(2)**:187-98, 1994.
- ROBINSON GA, BUTCHEWR RW, SUTHERLAND EW. Cyclic AMP. **Annu Rev Biochem.** **37**: 149-174, 1968.
- RODBELL M. The complex regulation of receptor-coupled G-proteins. **Adv Enzyme Regul.**, **37**: 427-435, 1997.
- RODRIGUES MC, OBESO JA, OLANOW CW. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. **Ann Neurol.**, **44(3 Suppl)**:S175-88, 1998.
- ROGERIO F, DE SOUZA QUEIROZ L, TEIXEIRA SA, OLIVEIRA AL, DE NUCCI G, LANGONE F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. **Brain Res.**, **926(1-2)**:33-41, 2002.
- ROGERIO F, TEIXEIRA AS, REZENDE ACS, COFIÑO R, QUEIROZ LS, DE NUCCI G, MUSCARÁ MN, LANGONE F. Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment. **Dev. Brain Res.**, **154(2)**: 217-225, 2005.
- ROISEN FJ, MURPHY RA, PICHICHERO ME, BRADEN WG. Cyclic adenosine monophosphate stimulation of axonal elongation. **Science.**, **175(17)**:73-4, 1972.
- RUDGE JS, ALDERSON RF, PASNIKOWSKI E, MCCLAIN J, IP NY, LINDSAY RM. Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. **Eur J Neurosci.**, **4(6)**:459-471, 1992.
- SAKURAI M, ABE K, ITOYAMA Y, TABAYASHI K. Induction of Phosphorylated BAD in Motor Neurons After Transient Spinal Cord Ischemia in Rabbits **Adv in Underst Aortic Diseases (3)**: 271-275, 2009.
- SCHMALBRUCH H. Motoneuron death after sciatic nerve section in newborn rats. **J Comp. Neurol.**, **224**:252-258, 1984.
- SCHMALBRUCH H. The number of neurons in dorsal root ganglia L4-L6 of the rat. **Anat. Rec.**, **219(3)**:315-22, 1987a.
- SCHMALBRUCH H. Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in the rat. **Anat. Rec.**, **219(3)**:323-9, 1987b.
- SCHMALBRUCH H. The effect of peripheral nerve injury on immature motor and sensory neurons and on muscle fibres. Possible relation to the histogenesis of Werdnig-Hoffmann disease. **Rev. Neurol.**, **144(11)**:721-9, 1988.

- SCHMALBRUCH H. Growth and denervation response of skeletal muscle fibers of newborn rats. **Muscle Nerve**, **13**(5):421-32, 1990.
- SCHUBERT P, OGATA T, MARCHINI C, FERRONI S, RUDOLPHI K. Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. **Ann N Y Acad Sci**. **15**;825:1-10, 1997.
- SCHWEIZER U, GUNNERSEN J, KARCH C, WIESE S, HOLTMANN B, TAKEDA K, AKIRA S, SENDTNER M. Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. **J Cell Biol.**;156(2):287-97, 2002.
- SEGAL RA, GREENBERG ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. **Annu Rev Neurosci.**, **19**: 463-489, 1996.
- SELBIE LA, HILL SJ. G protein-coupled-receptor cross-talk: the fining-tune of multiplereceptor-signaling pathways. **Trends Pharmacol Sci.**, **19**(3): 87-93, 1998.
- SENDTNER M., KREUTZBERG GW, THOENEN H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. **Nature**, **345**:4401, 1990.
- SENDTNER M, HOLTMANN B, KOLBECK R, THOENEN H, BARDE YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. **Nature**, **360**(6406):757-9, 1992a.
- SENDTNER M, SCHMALBRUCH H, STOCKLI KA, CARROLL P, KREUTZBERG GW, THOENEN H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. **Nature**, **358**(6386):502-4, 1992b.
- SENDTNER M, STOCKLI KA, THOENEN H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. **J. Cell Biol.**, **118**(1):139-48, 1992c.
- SENDTNER M, GOTZ R, HOLTMANN B, THOENEN H. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. **J. Neurosci.**, **17**(18):6999-7006, 1997.
- SENDTNER M, GOTZ R, HOLTMANN B, THOENEN H. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. **J. Neurosci.**, **17**(18):6999-7006, 1997.
- SILVEIRA MS, LINDEN R. Neuroprotection by cAMP: another brick in the wall. **Adv Med Exp Biol**. **557**:164-176, 2005.
- SILVER J, MILLER JH. Regeneration beyond the glial scar. **Nat Rev Neurosci**. **5**(2):146-56, 2004.
- SIMON R, THIER M, KRUTTGEN A, ROSE-JOHN S., WEIERGRABER O, HEINRICH PC, SCHRODER JM, WEIS J. Human CNTF and related cytokines: effects on DRG neurone survival. **NeuroReport** **29**: 153–157, 1995.
- SMITH GM, RABINOVSKY ED, MCMANAMAN JL, SHINE HD. Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury. **Exp. Neurol.**, **121**(2):239-47, 1993.
- SNIDER WD, ELLIOT JL, YAN D. Axotomy-induced neuronal death during development. **J. Neurobiol.**, **23**:1231-1246, 1992
- SOFRONIEW MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**. **32**(12):638-47, 2009.

- SONG HJ, MING GL, POO MM. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. **Nature.**, **388(6639)**:275-9. Erratum in: *Nature* 1997, **389(6649)**:412, 1997.
- SPENCER T, FILBIN MT A role for cAMP in regeneration of the adult mammalian CNS. **J Anat.**, **204(1)**:49-55, 2004.
- STAHL N, BOULTON TG, FARRUGGELLA T, IP NY, DAVIS S, WITTHUHN BA, QUELLE FW, SILVENNOINEN O, BARBIERI G, PELLEGRINI S, et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. **Science**, **263(5143)**:92-95, 1994a.
- STAHL N, YANCOPOULOS GD. The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. **J Neurobiol.**, **25(11)**:1454-1466 1994b.
- STOCKLI KA, LOTTSPEICH F, SENDTNER M, MASIAKOWSKI P, CARROLL P, GOTZ R, LINDHOLM D, THOENEN H. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. **Nature**, **342(6252)**:920-3, 1989.
- STOCKLI KA, LILLIEN LE, NAHER-NOE M, BREITFELD G, HUGHES RA, RAFF MC, THOENEN H, SENDTNER M. Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. **J. Cell Biol.**, **115(2)**:447-59, 1991.
- THOENEN H. The changing scene of neurotrophic factors. **Trends Neurosci.**, **14(5)**:165-70, 1991.
- TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A** **6(9)**:4350-4354, 1979.
- TRIPATHI RB, MCTIGUE DM. Chronically increased ciliary neurotrophic factor and fibroblast growth factor-2 expression after spinal contusion in rats. **J Comp Neurol.** **510(2)**:129-44, 2008.
- VARELLA MH, CORREA DF, CAMPOS CBL, CHIARINI LB, LINDEN R. Protein kinases selectively modulate apoptosis in the developing retina in vitro. **Neurochem Int.**, **31**: 217-227, 1997.
- VARON S, MANTHORPE M, ADLER R. Cholinergic neuronotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. **Brain Res.**, **173(1)**:29-45, 1979.
- VEJSADA R, SAGOT Y, KATO AC. Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. **Eur. J. Neurosci.**, **7(1)**:108-15, 1995.
- VERGANI L, DI GIULIO AM, LOSA M, ROSSONI G, MULLER EE, GORIO A. Systemic administration of insulin-like growth factor decrease motor neuron cell death and promotes muscle reinnervation. **J. Neurosci. Res.**, **54**:840-847, 1998.
- VIEIRA AS, REZENDE AC, GRIGOLETTO J, ROGÉRIO F, VELLOSO LA, SKAPER SD, NEGRO A, LANGONE F. Ciliary neurotrophic factor infused intracerebroventricularly shows reduced catabolic effects when linked to the TAT protein transduction domain.. **J Neurochem** **110(5)**:1557-66, 2009.
- WALIKONIS RS, PODUSLO JF. Activity of cyclic AMP phosphodiesterases and adenylyl cyclase in peripheral nerve after crush and permanent transection injuries. **J Biol Chem.**, **273**: 9070-9077, 1998.
- WANNER IB, DEIK A, TORRES M, ROSENDAHL A, NEARY JT, LEMMON VP, BIXBY JL. A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth. **Glia.** **56(15)**:1691-709, 2008.

- WHITAKER CM, BEAUMONT E, WELLS MJ, MAGNUSON DS, HETMAN M, ONIFER SM. Rolipram attenuates acute oligodendrocyte death in the adult rat ventrolateral funiculus following contusive cervical spinal cord injury. **Neurosci Lett.**, **438(2)**:200-4, 2008.
- WILKS AF, HARPUR AG, KURBAN RR, RALPH SJ, ZURCHER G, ZIEMIECKI A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. **Mol Cell Biol.**, **11(4)**:2057-2065, 1991.
- WINTER CG, SAOTOME Y, LEVISON SW, HIRSH D. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92(13)**:5865-9, 1995.
- WU D, ZHANG Y, BO X, HUANG W, XIAO F, ZHANG X, MIAO T, MAGOULAS C, SUBANG MC, RICHARDSON PM. Actions of neurotrophic cytokines and cyclic AMP in regenerative conditioning of rat primary sensory neurons. **Exp Neurol.**, **204(1)**: 66-76, 2007.
- XU JJ, CHEN EY, LU CL, HE C. Recombinant ciliary neurotrophic factor promotes nerve regeneration and induces gene expression in silicon tube-bridged transected sciatic nerves in adult rats. **J. Clin. Neurosci.**, **16(6)**:812-7, 2009.
- YAN Q, ELLIOTT J, SNIDER WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. **Nature**, **360(6406)**:753-5, 1992.
- YAO XL, LIU J, LEE E, LING GS, MCCABE JT. Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. **J Neurotrauma**, **22(6)**:656-68, 2005.
- Yetiser S, Kahraman E. An analysis of time-dependent changes of neurotrophic factors (BDNF, CNTF) in traumatic facial nerve injury of a nerve-cut and nerve-crush model in rats. **Otol Neurotol.**, **29(3)**:392-6, 2008.
- YU F, SUGAWARA T, MAIER CM, HSIEH LB, CHAN PH. Akt/Bad signaling and motor neuron survival after spinal cord injury. **Neurobiol Dis.**, **20(2)**:491-9, 2005.
- ZHANG J, LINEAWEAVER WC, OSWALD T, CHEN Z, CHEN Z, ZHANG F. Ciliary neurotrophic factor for acceleration of peripheral nerve regeneration: an experimental study. **J Reconstr Microsurg.**, **20(4)**:323-7, 2004.