UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

ANDRÉ SCHWAMBACH VIEIRA

"Propriedades funcionais do fator neurotrófico ciliar associado a um

domínio de translocação de proteína: Análise de seus efeitos sobre

regiões hipotalâmicas reguladoras do metabolismo energético"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Schuanhad ilina e aprovada pela Comissão, Julgadora. 12

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

Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone Co-Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

V673p	Vieira, André Schwambach Propriedades funcionais do fator neurotrófico ciliar associado a um domínio de translocação de proteína: análise de seus efeitos sobre regiões hipotalâmicas reguladoras do metabolismo energético / André Schwambach Vieira. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.
	Orientador: Francesco Langone. Co-orientador: Licio Augusto Velloso. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Fator neurotrófico ciliar. Peso corporal. Hipotálamo. Gordura - Metabolismo. Langone, Francesco. Velloso, Licio Augusto. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
	(rcdt/ib)

Título em inglês: Functional properties of the protein transduction domain associated ciliary neurotrophic factor: analysis of its effects on energy metabolism regulating hypothalamic regions. **Palavras-chave em inglês**: Ciliary neurotrophic factor; Body weight; Hypothalamus; Fat - Metabolism.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Francesco Langone, Roger Frigério Castilho, Carlos Amílcar Parada. Data da defesa: 31/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 31 de Agosto de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada

Prof. Dr. José Camillo Novelo

Dr. Fábio Rogério

a Assinatura Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Wilma e Castilho pelo irrestrito apoio, presença, carinho e dedicação durante todas as etapas de minha vida. Serão sempre o exemplo que seguirei.

Agradeço à Maria por sempre estar a meu lado durante esse período, pelo seu companheirismo, carinho e, sobretudo, pela paciência em relação às longas horas passadas no laboratório.

Agradeço ao professor Francesco Langone por acreditar no que inicialmente eram apenas potenciais e promessas. Agradeço-o também pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa e por sua sempre constante e essencial orientação em meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço ao professor Lício Augusto Velloso pela orientação na elaboração e execução deste projeto. A possibilidade de desenvolver etapas importantes dos experimentos em seu laboratório foi crucial para viabilidade desta dissertação.

Agradeço ao professor Alessandro Negro por fornecer das proteínas recombinantes CNTF e TAT-CNTF, sem as quais os experimentos contidos nesta dissertação seriam impossíveis.

Agradeço aos colegas de laboratório Alexandre, César, Cristiane, Fábio, Fernanda Hussein, Fernanda Pelágio e Gustavo pela amizade, convivência, companheirismo, apoio e sobretudo pela paciência com minha bagunça e diversas vidrarias quebradas ao longo destes dois anos!

Agradeço à Marciane, Talita, Cafu e todo o pessoal do laboratório do professor Lício e do professor Mário Saad pelo importante apoio e ajuda que me deram em todas as oportunidades em que estive na FCM. Agradeço especialmente a Patrícia por me ensinar os primeiros passos no mundo do "Western Blot".

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas por minha formação acadêmica e por estabelecer um ambiente de constante estímulo e apoio à pesquisa científica.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro concedido através de bolsa de mestrado (05/51335-3) e projeto de auxílio à pesquisa (05/052991-4), os quais foram imprescindíveis para o desenvolvimento desta dissertação.

INDÍCE

Resumo	vii
Abstract	viii
Abreviaturasi	ix
1- Introdução	1
2 - Objetivos	11
3 - Materiais e Métodos	12
3.1 - Animais	12
3.2 - Cirurgias	12
3.3 - Infusão i.c.v. por 4 dias consecutivos	13
3.4 - Análise da fragmentação do DNA nas gorduras marrom e branca	14
3.5 - Análise da apoptose por TUNEL	15
3.6 - Análise da expressão da UCP1 na gordura marrom interescapular	17
3.7 - Analise da fosforilação da STAT3 no hipotálamo	18
4 - Resultados	21
4.1 - Peso corporal	21
4.2 - Peso das gorduras marrom e brancas	23
4.3 - Análise da fragmentação do DNA nas gorduras marrom e branca	24
4.4 - Expressão da UCP1 no tecido adiposo marrom	30
4.5 - Fosforilação da STAT3 no hipotálamo	31
5 - Discussão	32
6 – Conclusões	41
7 - Bibliografia	42

RESUMO

O Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF) é uma neurocitocina com múltiplas atividades biológicas, sendo notável sua habilidade de proteger motoneurônios. Entretanto, a administração de CNTF leva à redução de peso corporal. Por outro lado, a administração do CNTF fusionado a um Domínio de Transdução de Proteínas (PTD), denominado TAT-CNTF, é capaz de proteger motoneurônios da medula espinhal axotomizados sem causar este efeito. O presente trabalho investigou se a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de TAT-CNTF produz os conhecidos efeitos catabólicos do CNTF. Para isso, ratos Wistar machos, com uma cânula crônicamente implantada no ventrículo lateral, foram distribuídos em quatro grupos: TAT-CNTF (2,5µg/8µl), CNTF (2,5µg/8µl), Leptina (LEP) (5µg/8µl) e PBS, que receberam uma infusão i.c.v. a cada 12h por 4 dias. O grupo tratado com TAT-CNTF apresentou menor perda de peso quando comparado aos grupos CNTF e LEP. As infusões i.c.v. de TAT-CNTF não reduziram o peso das gorduras retroperitonial (RP), epididimal (EP) e marrom interescapular (GM). O grupo CNTF apresentou redução do peso destas gorduras. Os grupos CNTF e LEP apresentaram aumento da fragmentação do DNA nas gorduras RP e EP. Por outro lado, o grupo TAT-CNTF não apresentou aumento da fragmentação do DNA nas amostras de RP, EP e GM. Um padrão de degradação internucleossomal do DNA e a presença de células TUNEL positivas foram detectados apenas nas gorduras dos animais dos grupos CNTF e LEP. Estes grupos também apresentaram aumento da expressão da UCP1 na GM, ao passo que o grupo TAT-CNTF não apresentou tal resultado. A análise da fosforilação da STAT3 no hipotálamo após uma única infusão i.c.v. de TAT-CNTF demonstrou, após 20 minutos, um efeito menor que o observado após infusão de CNTF. Em conclusão, nossos dados sugerem que o TAT-CNTF possui ação diferente do CNTF nas áreas hipotalâmicas envolvidas no controle da ingesta e do metabolismo.

ABSTRACT

The Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) is a neurocitokine with multiple biological activities, being notable its ability to protect lesioned motoneurons. However, administration of CNTF leads to reduction of body mass, while administration of CNTF fusioned with a Protein Transduction Domain (PTD), named TAT-CNTF, protects lesioned spinal motoneurons with no effects on body weight. In the present work, we investigated whether intracerebroventricular (i.c.v.) administration of TAT-CNTF would produce CNTF known catabolic effects. Male Wistar rats with a canula chronically implanted in the lateral ventricle were randomly assigned to four treatment groups: TAT-CNTF (2,5µg/8µl), CNTF (2,5µg/8µl), Leptin (LEP) (5µg/8µl) and PBS, that received an i.c.v. infusion every 12h for 4 days. TAT-CNTF treated group had a reduced weight loss when compared with CNTF and LEP groups. TAT-CNTF i.c.v. infusions did not reduce the weights of retroperitoneal (RP) and epididimal (EP) white adipose tissue, as well as interescapular brown adipose tissue (BAT) while CNTF i.c.v. administration reduced the weight of all these tissues. CNTF and LEP groups showed an increase of DNA fragmentation in RP and EP. On the other hand, TAT-CNTF group had no increase in DNA fragmentation in RP, EP and GM. A DNA ladder pattern and TUNEL positive cells could only be detected in adipose tissues from CNTF and LEP groups. CNTF and LEP treated groups had an increase in the expression of UCP1 in BAT, while TAT-CNTF treatment had no effects on UCP1 expression. An acute i.c.v. administration demonstrated that after 20 minutes TAT-CNTF induced less intense STAT3 phosphorilation in the hypothalamus when compared with CNTF acute infusions. In conclusion these data suggest that TAT-CNTF has a different action on hypothalamic areas involved in the control of food intake and energy metabolism.

ABREVIATURAS

- Bax Bcl2-associated X Protein (Proteína X associada a Bcl2)
- Bcl2 B-Cell Leukemia/Lymphoma 2 (Célula-B Leucemia/Linfoma 2)
- **bp** Base Pair (Par de Bases)

BSA – Bovine Serum Albumin (Albumina de Soro Bovino)

CNTF – Ciliary Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Ciliar)

CNTFR*α* - Ciliary Neurotrophic Factor Receptor Alfa (Receptor Alfa do Fator Neurotrófico Ciliar)

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

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 de Fibrilar Glial)

- gp130 Glycoprotein 130 (Glicoproteína 130)
- HIV Human Immunodeficience Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- i.c.v. Intracerebroventricular

i.p. – Intraperitonial

IL-6 – Interleucine 6 (Interleucina 6)

IL-6R - Interleucine 6 Receptor (Receptor da Interleucina 6)

JAK – Janus Kinase (Janus Quinase)

LIF – Leukemia Inhibitory Factor (Fator Inibidor de Leucemia)

LIFRB - Leukemia Inhibitory Factor Receptor Beta (Receptor Beta do Fator Inibidor de Leucemia)

ObR – Leptin Receptor (Receptor de Leptina)

PB – Phosphate Buffer (Tampão Fosfato)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

POMC – Pro-opiomelanocortina

- PTD Protein Transduction Domain (Domínio de Transdução de Proteína)
- **RNA** Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucléico)

s.c. – Subcutâneo

SDS – Sodium dodecyl sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription (Transdutora de Sinal e Ativadora de Transcrição)

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

Tat – Transactivator of Transcription (Transativador de Transcrição)

TBS – Tris Buffered Saline (Tampão Tris Salino)

TdT - Terminal deoxynucleotidyl transferase (Desoxinucleotidil transferase terminal)

TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling (Marcação

com dUTP de pontas terminais através da desoxinucleotidil transferase)

UCP1 – Uncoupling Protein 1 (Proteína Desacopladora 1)

1 - INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento embrionário os neurônios do gânglio ciliar de pintainhos dependem de interações com seus alvos para sobreviver (Alder e cols. 1979). Alder e colaboradores em 1979 observaram que, em embriões de pintainho, a maior parte da atividade trófica que extratos protéicos destes embriões exercem sobre os neurônios do gânglio ciliar provém de tecidos intraoculares inervados por tais células. Desta forma, havia evidências de que algum fator produzido pelas células alvo destes neurônios ganglionares possuiria atividade neurotrófica, sendo esta possível molécula nomeada como Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF – do inglês Ciliary Neurotrophic Factor) (Manthorpe e cols. 1980). Com sua posterior purificação e caracterização parcial, evidenciou-se que o CNTF extraído de tecidos intraoculares de embriões de pintainhos é uma macromolécula de natureza protéica, possuindo aproximadamente 20 Kd (Barbin e col. 1984).

Um importante avanço em relação ao estudo do CNTF ocorreu em 1989 quando Lin e colaboradores e Stockli e colaboradores clonaram, independentemente, o gene que codifica o CNTF. Desta forma, após a análise da seqüência de nucleotídeos deste gene, foi possível determinar que o CNTF não fazia parte das famílias de fatores neurotróficos até então caracterizadas. Posteriormente, por homologia, o CNTF foi incluído na família das citocinas estruturalmente e funcionalmente relacionadas que inclui a interleucina-6 (IL-6), a oncostatina M, o fator inibidor de leucemia (LIF), a interleucina-11 (IL-11) (Bazan, 1991; McDonald e Hendrickson, 1993). A clonagem do CNTF também permitiu caracterizar sua distribuição como sendo pós-natal e circunscrita às células de Schwann no sistema nervoso periférico (SNP), às células da glia do sistema nervoso central (SNC) e a alguns neurônios centrais (Stockli e cols. 1991; Friedman e cols., 1992; Rende e cols., 1992; Henderson e

cols., 1994a; Kirsch e Hofmann, 1994). Outra observação derivada da análise da seqüência que codifica o CNTF foi a constatação da ausência de qualquer sinalização conhecida para sua secreção celular, evidenciando-se assim a natureza citoplasmática deste peptídeo (Lin e cols., 1989; Stockli e cols. 1989; Negro e cols., 1991). Estes dados sugeriram que, ao contrário das suposições iniciais, o CNTF não é um fator neurotrófico derivado do alvo.

Além da ação neurotrófica sobre os neurônios do gânglio ciliar, diversos efeitos biológicos do CNTF foram descritos. Observou-se que este fator também é capaz de prover suporte trófico a neurônios do gânglio da raiz dorsal, neurônios do sistema nervoso simpático e a motoneurônios de embrião (Blottner e cols., 1989; Arakawa e cols., 1990; Thaler e cols., 1994). Outras notáveis propriedades observadas são sua capacidade de induzir a diferenciação de progenitores gliais em astrócitos tipo 2 e sua capacidade de inibir a diferenciação de progenitores do sistema nervoso simpático (Hughes e cols., 1988; Lillien e cols., 1988; Ernsberger e cols., 1989).

Próximo à época da clonagem do gene que codifica o CNTF foi evidenciada a existência de diversas células que expressam receptores de membrana capazes de se ligar a este fator neurotrófico (Squinto e cols., 1990). Subseqüentemente, o gene que codifica este receptor foi clonado e seqüenciado, sendo também determinada a sua distribuição regional (Davis e cols., 1991). Evidenciou-se que o receptor para o CNTF é um complexo trimérico, sendo este composto por uma subunidade alfa, o CNTFR α , e duas subunidades beta transdutoras de sinal, o gp130 e o LIFR β (Davis e cols., 1993a).

A seqüência de eventos que culmina com a mudança da expressão gênica em resposta ao CNTF tem início com a ligação deste ao CNTFRα. Esse complexo se liga, seqüencialmente, ao gp-130 e ao LIFRβ formando um heterodímero (Davis e cols., 1993a). A formação do complexo CNTF/CNTFRα/gp-130/LIFRβ aproxima as proteína-tirosinaquinases da classe das Janus Quinases (JAKs) que estão previamente associadas à porção citoplasmática dos componentes β. Esta aproximação desencadeia a autofosforilação das JAKs além da fosforilação de tirosinas das subunidades do complexo receptor (Wilks e cols., 1991; Stahl e cols., 1994a; Stahl e cols., 1994b). As tirosinas fosforiladas nas subunidades β servem como sítios de recrutamento de monômeros das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STATs) (Boulton e cols., 1994). Uma vez associadas ao complexo, as STATs são fosforiladas pelas JAKs, desencadeando assim a dimerização das primeiras e sua subseqüente translocação para o núcleo. As STATs dimerizadas atuam então como fatores de transcrição, regulando a expressão de diversos genes.

O CNTFR α é expresso durante todos os períodos de vida do organismo, predominantemente no sistema nervoso central, também podendo ser encontrado em quantidades significativas no músculo estriado esquelético (Davis e cols., 1991, Ip e cols., 1993). Experimentos de hibridização *in situ* para o RNA mensageiro que codifica o CNTFR α demonstraram que este receptor pode ser encontrado principalmente em neurônios do bulbo olfatório, córtex cerebral, hipotálamo, além de neurônios motores craniais e medulares (Lee e cols., 1997). A subunidade alfa do receptor do CNTF não possui domínio transmembrana, se encontrando ancorada à membrana plasmática por uma ponte de glicosilfosfatidilinositol (Davis e cols., 1991, 1993a). As subunidades beta, gp130 e LIFR β possuem ampla distribuição no organismo, sendo também componentes de complexos sinalizadores de outras citocinas da família do CNTF (Davis e cols., 1993a). Considerando-se a distribuição das subunidades β e a possibilidade destas de participarem de complexos sinalizadores de outras citocinas, é a subunidade alfa a responsável pelo reconhecimento específico do CNTF (IP e cols., 1993). Entretanto, é interessante destacar

que a ligação do CNTFR α à membrana pode ser quebrada pela fosfolipase-C, gerando uma forma solúvel deste receptor, sendo esta detectável no líquido cefalorraquidiano e soro (Davis e cols., 1993b). A forma solúvel do CNTFR α é capaz de, mediante ligação com o CNTF, ativar também células inicialmente responsivas apenas ao LIF, pois estas expressam LIFR β e gp130 (Davis e cols., 1993b, Ozog e cols., 2004). Notadamente a existência de receptores solúveis é comum a outras citocinas da família do CNTF tais como IL-6R, gp-130 e o LIFR β (Zhang e cols., 1998).

Em 1990, Sendtner e colaboradores demonstraram que a administração de CNTF possui ação protetora sobre motoneurônios em um modelo de secção de nervos periféricos em ratos neonatos. Posteriormente, tal ação neuroprotetora *in vivo* também foi demonstrada em modelos experimentais de doenças neurológicas motoras (Hagg e cols., 1992; Sendtner e cols., 1992a; Kuzis e Eckenstein., 1996). Paralelamente outros experimentos apontavam que a função fisiológica do CNTF seria o de agente neuroprotetor agudo, atuando imediatamente após a lesão. Por exemplo, as células de Schwann liberam para o meio extracelular o CNTF estocado em seu citoplasma após axotomia (Friedman e cols., 1992; Sendtner e cols., 1992b; Smith e cols., 1993). No sistema nervoso central também se observou que lesões mecânicas levam a um expressivo aumento do CNTF no local afetado a curto prazo (Asada e cols., 1995; Lee e cols., 2005).

Em conjunto, os dados referentes à neuroproteção mediada pelo CNTF despertaram grande interesse para o possível uso desta molécula em doenças neurodegenerativas humanas. Desta forma foram realizados testes clínicos para verificar a toxicidade, tolerabilidade e farmacocinética do CNTF em pacientes com esclerose lateral amiotrófica (Cedarbaum e cols., 1995). Estes testes revelaram efeitos colaterais importantes associados às diferentes doses e esquemas de tratamento. Particularmente, a administração de doses acima de 10µg/kg/dia nesses pacientes produziu anorexia, perda de peso, estomatite por herpes labial, tosse, aumento de secreções orais e fadiga. Consequentemente estes resultados geraram a interrupção dos testes clínicos, porém revelaram implicações importantes relacionadas à administração de CNTF (Sendtner e cols., 1994; Miller e cols., 1996a,b).

Experimentos realizados em modelos animais também demonstraram efeitos semelhantes aos observados nos testes clínicos em humanos (Shapiro e cols., 1993; Espat e cols., 1996; Martin e cols., 1996; Henderson e cols., 1996). Especialmente, os efeitos do CNTF relacionados à perda de peso foram observados em diversos modelos animais. (Henderson e cols., 1994b; Kwon e cols., 1994; Zhang e cols., 1995). Porém, notavelmente, o tratamento com CNTF também foi capaz de reduzir o peso corporal de animais ob-/ob-(Gloaguen e cols., 1997). Estes camundongos são obesos devido a uma mutação que impede a produção de leptina, uma citocina derivada do tecido adiposo que tem importante função fisiológica na regulação do volume das reservas energéticas do organismo (Pelleymounter e cols., 1995; Halaas e cols., 1995; Campfield e cols., 1995). Para desempenhar esta função a leptina liberada pelo tecido adiposo atua principalmente em neurônios do hipotálamo através da forma longa de seu receptor (ObR), ativando a via de sinalização JAK/STAT (Baumann e cols., 1996). Sendo ainda interessante notar que a forma longa do ObR possui grande homologia com o gp130 (Tartaglia e cols., 1995).

Estes dados iniciais relacionados à perda de peso despertaram o interesse de se utilizar o CNTF como tratamento para a obesidade. Neste sentido, experimentos subseqüentes demonstraram outras semelhanças entre a ação do CNTF e da Leptina, tais como a redução da ingesta, o aumento do gasto energético, a diminuição da expressão do neuropeptideo Y no hipotálamo, a indução de apoptose de adipócitos e o aumento da expressão da isoforma um da proteína desacopladora da cadeia respiratória (UCP1) no tecido adiposo marrom (BAT) (Xu e cols., 1998; Lambert e cols., 2001; Ott e cols., 2002; Duff e cols., 2004; Bluher e cols., 2004). Porém, a possibilidade do uso do CNTF no tratamento da obesidade foi impulsionada após a constatação de que ele é capaz de induzir a redução de peso corporal em condições nas quais a Leptina não o faz. Tais observações foram realizadas em camundongos obesos db/db, que não possuem a forma longa do ObR, e em camundongos cuja obesidade é induzida por dieta (Gloaguen e cols., 1997). Além disso, Lambert e colaboradores (2001) demonstraram que mesmo 3 dias após o tratamento com CNTF não há reaquisição do peso corporal perdido, ou seja, o CNTF possui efeitos que se estendem além do período de administração desta molécula.

Recentemente grandes avanços foram realizados no sentido de se determinar o mecanismo de ação do CNTF relacionado à perda de peso. Em 2005, Kokoeva e colaboradores demonstraram que a administração de CNTF desencadeia a proliferação de neurônios no hipotálamo, sendo que esta proliferação é determinante da ausência de reaquisição de peso corporal após o fim do tratamento com este fator neurotrófico. Tal correlação foi demonstrada por estes autores através da administração de bloqueadores mitóticos a animais tratados com CNTF. Com este procedimento, observou-se a não proliferação de células no hipotálamo e a correlata reaquisição normal de peso após o tratamento com CNTF. Janoschek e colaboradores (2006) também elucidaram outro importante mecanismo relacionado à perda de peso gerada pelo tratamento com CNTF. Estes autores realizaram experimentos envolvendo a geração de camundongos que possuíam a ablação do gene que codifica o receptor gp130 especificamente em células que expressam pro-opiomelanocortina (POMC). Posteriormente, outros experimentos demonstraram que estes animais não apresentaram redução do peso corporal e da ingesta 24

horas após tratamento i.c.v. com CNTF. Pode-se concluir a partir destes dados que a ação do CNTF sobre o peso corporal é dependente de sua atuação sobre as células que expressam POMC.

As células do núcleo arqueado do hipotálamo que expressam POMC participam do controle da ingesta e do metabolismo principalmente através de suas projeções para o núcleo paraventricular hipotalâmico, área hipotalâmica lateral e para neurônios do sistema nervoso simpático na medula espinhal (Elmquist, 2001). Sabe-se que neurônios do núcleo paraventricular controlam a atividade secretória da hipófise anterior relacionada ao metabolismo através da liberação do fator liberador da corticotropina (CRH) e do fator liberador do hormônio estimulante da tireóide (TRH) (Legradi e cols., 1998). Por sua vez, a área hipotalâmica lateral projeta-se difusamente para regiões corticais cerebrais que participam da complexa regulação dos comportamentos de fome e saciedade (Elias e cols., 1999). Finalmente, os neurônios do sistema nervoso simpático da coluna lateral da medula espinhal são responsáveis, dentre várias outras funções autonômicas, pelo controle do metabolismo energético e termogênese (Elias e cols., 1998).

A dissociação dos efeitos do CNTF sobre o metabolismo energético daqueles relacionados à sua importante ação neurotrófica é muito desejável. Diversas vias alternativas de administração desta citocina já foram testadas obtendo-se resultados pouco satisfatórios (Tan e cols., 1996; Aebischer e cols., 1996; Penn e cols., 1997; Haase e cols., 1999; Bachoud-Levi e cols., 2000). Uma estratégia muito promissora consiste no emprego de CNTF recombinante modificado pela adição de um domínio de transdução de proteínas (PTD) na sua região N-terminal. Este domínio pode ser formado por uma seqüência de 15 aminoácidos derivados da proteína Tat do HIV-1. Proteínas que possuem esse domínio são capazes de cruzar a membrana celular através de mecanismos independentes de receptores

específicos (Schwarze e cols., 1999; Schwarze e Dowdy, 2000;Becker-Hapak e cols., 2001).

A transdução ou translocação de proteínas para o interior de células foi descrita, independentemente, por Green e Loewenstein e por Frankel e Pabo, em 1988, com a descoberta de que a proteína Tat do vírus HIV poderia atravessar membranas celulares e transativar o genoma viral. Green e Loewenstein (1988) também demonstraram que esta propriedade da Tat era conferida por um domínio deste peptídeo que contém vários aminoácidos básicos. Posteriormente demonstrou-se que proteínas heterólogas conjugadas a uma sequência de 36 aminoácidos correspondentes a este domínio básico da Tat, também denominado PTD da Tat (do inglês Protein Transduction Domain), são capazes de serem translocadas para o interior de células (Fawell e cols., 1994). A partir de então tal fenômeno foi observado em relação a diversas proteínas conjugadas a um domínio PTD, sendo aplicada em vários tipos celulares em cultura (Nagaharae cols., 1998; Lissy e cols., 1998, Ho e cols., 2001). Experimentos realizados in vivo demonstraram que a seqüência PTD da Tat, quando conjugada a proteínas relativamente grandes, permite que estas atravessem a barreira hematoencefálica a se transloquem para o interior de células do SNC (Schwarze e cols., 1999; Schwarze e Dowdy, 2000; Cao e cols., 2002; Kilic e cols., 2003). Em acordo com estas observações Kilic e colaboradores (2003) demonstraram que o GDNF conjugado ao PTD da Tat é capaz não só de atravessar a barreira hematoencefálica, como também proteger células do SNC após indução de isquemia.

O CNTF conjugado ao domínio PTD da Tat do HIV1 (TAT-CNTF) foi gerado em um vetor de expressão heteróloga de CNTF em E. coli. Para tal, realizou-se na região codificante da porção N-terminal do CNTF, uma fusão "in frame" de uma seqüência de nucleotídeos que codifica os 15 aminoácidos do PTD da TAT (Langone e cols., 2004).

Demonstrou-se que o TAT-CNTF é capaz de se internalizar rapidamente em células ovarianas de hamster chinês (CHO) em cultura, além de ser capaz de prover suporte trófico a neurônios de gânglios da raiz dorsal de embrião de pintainho *in vitro* (Langone e cols., 2004). Outra propriedade desta molécula é a de promover a sobrevivência de 70% dos motoneurônios axotomizados após administração subcutânea (s.c.), no modelo de secção do nervo ciático em ratos neonatos (Rezende, 2005). Porém de forma surpreendente, neste modelo experimental, a aplicação de TAT-CNTF não gerou a depleção de triglicérides dos adipócitos da gordura marrom, além de também não gerar o baixo crescimento corporal observados após tratamento s.c. com CNTF.

Tais observações experimentais levantam importantes questões sobre as características farmacocinéticas do TAT-CNTF, bem como sobre seu mecanismo de ação. Primeiramente, talvez esta molécula não modificou o ganho de peso de animais neonatos por não ter alcançado concentrações mínimas nas regiões hipotalâmicas responsáveis pelo controle do metabolismo. Ou seja, uma redução da disponibilidade do TAT-CNTF no sistema nervoso central (SNC) pode ter ocorrido pelo fato de o mesmo ser capaz de atravessar de maneira inespecífica a membrana plasmática das células que compõem os diferentes compartimentos corporais, ficando assim retido nestes locais. Além disso, sabe-se que o ingresso do CNTF no SNC se deve a um mecanismo de transporte específico e saturável através da barreira hematoencefálica (Pan e cols., 1999). A adição do domínio PTD ao CNTF poderia ter dificultado/impedido seu reconhecimento por esses transportadores. Outra hipótese a ser considerada é que, mesmo atingido a região hipotalâmica, a adição do domínio PTD ao CNTF poderia ter modificado sua capacidade de atuar nas células hipotalâmicas.

Para tentar elucidar algumas destas questões estudamos no presente trabalho os efeitos metabólicos produzidos pela ação do CNTF e TAT-CNTF no SNC através da administração destas moléculas por via intracerebroventricular (i.c.v) em ratos adultos.

2 - OBJETIVOS

Gerais

Investigar os efeitos da adição do PTD da Tat do HIV1 ao CNTF sobre suas as propriedades funcionais.

Específicos

Analisar os efeitos produzidos pela administração intracerebroventricular de CNTF ou de TAT-CNTF sobre a fosforilação da STAT3 no hipotálamo de ratos adultos.

Avaliar os efeitos da administração intracerebroventricular de CNTF ou de TAT-CNTF sobre o peso corporal e das gorduras branca retroperitonial, branca epididimal e marrom interescapular.

Investigar a ocorrência de apoptose de adipócitos das gorduras marrom e branca provocada pela administração intracerebroventricular de CNTF ou de TAT-CNTF.

Investigar a expressão de UCP1 na gordura marrom interescapular induzida pela administração intracerebroventricular de CNTF ou de TAT-CNTF.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com 3 meses de idade (250-300g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Os animais foram acomodados em caixas plásticas em uma estante ventilada (Alesco modelo 9902.001). Estes foram mantidos sob condições de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e de temperatura (21°C) controladas, tendo livre acesso à água e a ração (Protocolo CEEA-UNICAMP 878-2).

3.2 - Cirurgias

Para a realização das administrações i.c.v uma cânula guia foi implantada em cada animal de acordo com os seguintes procedimentos: os animais foram anestesiados com uma solução 1:1 (v/v) de cloridrato de ketamina (11,6 mg/ml) e cloridrato xilazina (23 mg/ml), na dosagem de 1,2 ml/kg de massa corporal (i.p.). Após tricotomia do dorso da cabeça, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico. Após assepsia com álcool 70%, foi realizada uma incisão de aproximadamente 20mm na pele, para a exposição da calota craniana, seguida de remoção do periósteo. A seguir, com auxílio de uma broca odontológica, o crânio foi perfurado nas coordenadas 0,8 mm posterior ao bregma e 1,5 mm lateral à linha média. Uma cânula-guia (23 G), com 15 mm de comprimento, foi então implantada através desse orifício, atingindo a profundidade de 3,8 mm ventral ao bregma. Esta foi mantida em posição com auxílio de um parafuso metálico e resina acrílica autopolimerizante. Um fio de náilon de 15mm de comprimento, e espessura igual a espessura interna da cânula, foi introduzido na cânula guia para que a mesma permanecesse obliterada até o momento da administração das substâncias. Ao final destes procedimentos os animais retornaram para suas gaiolas por um período de seis dias de recuperação.

Na manhã do sexto dia após o implante das cânulas, para verificar-se o correto posicionamento da cânula guia, a comida foi removida das gaiolas e 2µl de angiotensina II (10 µg/ml em tampão fosfato salino - PBS) foram infundidos através da mesma utilizando-se uma agulha de infusão (32G) de 16mm. Após os animais serem recolocados na gaiola, o consumo de água foi monitorado. Aqueles que consumiram água continuamente por mais de 1 minuto foram utilizados nas demais etapas do experimento (Carvalheira e cols., 2005).

3.3 - Infusão i.c.v. por 4 dias consecutivos

No sétimo dia após a cirurgia de implante de cânulas um lote de 22 animais selecionados no teste com angiotensina II foi dividido aleatoriamente em quatro grupos. O primeiro recebeu 8 aplicações i.c.v. de 8µl de TAT-CNTF (CRIBI, Universidade de Padova, Itália – 0,3mg/ml; n=7) em intervalos de 12h, sendo realizada a medida do peso corporal dos animais após cada aplicação. O mesmo protocolo foi utilizado para o segundo, terceiro e quarto grupos, diferindo apenas no uso de CNTF (CRIBI, Universidade de Padova, Itália – 0,3mg/ml; n=5), Leptina (Calbiochem, La Jola, EUA – 0,625 mg/ml; n=5) e PBS (n=5), respectivamente.

No intervalo de 24h após a última infusão das substâncias os animais foram sacrificados em uma câmara de CO₂. Subseqüentemente, foram dissecadas e pesadas a gordura marrom interescapular e as gorduras branca retroperitoneal e branca epididimal.

Amostras de aproximadamente 50mg da gordura marrom e 200mg das gorduras brancas foram armazenadas a -80 °C para posterior análise da fragmentação do DNA. Outras amostras de aproximadamente 50mg da gordura marrom foram também armazenada a –80 °C para análise da expressão da proteína UCP1. O restante dos tecidos foi fixado em paraformaldeído (pH 7,4) para posterior análise por TUNEL.

Os valores de peso corporal e peso das gorduras foram comparados utilizando-se teste estatístico ANOVA e pós-teste Student-Newman-Keuls, sendo considerada diferença estatisticamente significativa p<0,05.

3.4 - Análise da fragmentação do DNA nas gorduras marrom e branca

Para a extração de DNA, as amostras previamente estocadas de gordura branca retroperitonial, branca epididimal e gordura marrom interescapular, foram picotadas e homogeneizadas à 4°C em 750 µl de um tampão contendo 50 mM Tris-Cl, pH 8,1; 10 mM EDTA; 1% Triton X-100, utilizando-se um gerador 20s Politron PTA (Modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY) em velocidade mínima por 30 segundos. O material homogeneizado foi mantido por 20 minutos a 4°C e então centrifugado a 14.000g por 15min a 4°C, sendo o sobrenadante coletado. O material precipitado foi ressuspendido em 500 µl de um tampão contendo 50 mM Tris-Cl, pH 8,1; 10 mM EDTA; 1% SDS e incubado a 37°C por 30 minutos. O DNA fragmentado contido no sobrenadante, obtido na primeira centrifugação, e o DNA genômico contido no pellet ressuspendido em tampão contendo SDS foram extraídos com um volume igual de uma mistura de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção 25:24:1), seguido de uma nova extração utilizando-se um volume igual de clorofórmio. Após ser adicionado 1 µg de RNAse A (Sigma), as amostras

14

foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A concentração de DNA da fração fragmentada e da fração genômica foi determinada utilizando-se o kit PicoGreen (Invitrogen). A porcentagem de fragmentação do DNA de cada amostra foi expressa como: quantidade de DNA fragmentado / (quantidade de DNA fragmentado + quantidade de DNA genômico) X 100 (Gullicksen e cols., 2004). Após a quantificação, em 500 µl de cada amostra foram adicionados 5 µl de carreador poliacril, 50 µl de acetato de sódio 2M e 550 µl de álcool isopropílico. Após 2 horas a -20°C as amostras foram centrifugadas a 14.000g, 4°C por 20 minutos. O pellet de DNA foi lavado 3 vezes com álcool 70% e seco à temperatura ambiente antes de ser ressuspendido em tampão contendo 10 mM Tris-Cl, pH 8,1; 1mM EDTA. Foi então realizada a eletroforese do DNA fragmentado, em gel de agarose 2%, para análise do possível padrão de bandas resultantes de clivagem internucleossomal do DNA, uma característica apresentada por células em apoptose (Qian e cols., 1998).

Os valores de porcentagem de fragmentação de DNA das gorduras foram comparados utilizando-se teste estatístico ANOVA e pós-teste Student-Newman-Keuls, sendo considerada diferença estatisticamente significativa p<0,05.

3.5 - Análise da apoptose por TUNEL

O material previamente fixado em paraformaldeído 4% (PB 0,1M; pH 7,4), por 48h passou pelo procedimento histológico padrão para inclusão em parafina. Os blocos referentes às gorduras marrom e brancas foram cortados em séries de 6 cortes de 6 µm de espessura com intervalos de 60 µm entre cada corte de uma série. As lâminas foram desparafinizadas com xilol e re-hidratadas numa série decrescente de etanol. Subseqüentemente o material foi processado para detecção de células apoptóticas

empregando-se o kit QIA33[®] (Oncogene[®]), sendo todos os procedimentos realizados à temperatura ambiente, com exceção da reação com nucleotídeos e enzima TdT. Inicialmente, os cortes foram permeabilizados com proteinase K (20mg/ml; 1:100 em tampão Tris pH 8,0) por 3 minutos. Após lavagem com TBS, a peroxidase endógena foi inativada com H_2O_2 (3% em metanol) por 5 minutos. Os cortes foram novamente lavados com TBS, transferidos para câmara úmida, cobertos com tampão de equilíbrio (cacodilato de sódio 1,0M, Tris 0,15M, BSA 1,5mg/ml, CoCl₂ 3,75mM, pH 6,6) diluído 1:5 em água destilada, e incubados por 30 minutos. Em seguida, o tampão de equilíbrio foi substituído pela solução de reação (nucleotídeos biotinilados e enzima TdT; 10µl/corte) e os cortes foram cobertos com Parafilm® e incubados por 90 minutos a 37°C. Após esse período, foram lavados com TBS e cobertos com tampão contendo EDTA 0,5M (pH 8,0) por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram lavados com TBS, cobertos com tampão de bloqueio (4% BSA, PBS 10 mM, pH 7,4) e incubados por 10 minutos. Para detecção da reação, o tampão de bloqueio foi removido e cada corte recebeu 10µl da solução do conjugado estreptoavidina-peroxidase (1:50 em tampão de bloqueio). Os cortes foram então incubados por 30 minutos, lavados com TBS e cobertos com 10µl de solução de diaminobenzidina por 15 minutos. Finalmente, os cortes foram lavados em água destilada, contra-corados com Verde de Metila e montados em Permount[®] (Fisher). As laminas foram analisadas em microscópio de luz em campo claro.

3.6 - Análise da expressão da UCP1 na gordura marrom interescapular

As amostras de gordura marrom, previamente estocadas, foram picotadas e homogeneizadas em 750 µl de um tampão, contendo 50 mM Tris-Cl, pH 8,1; 10 mM EDTA; 1% coquetel inibidor de protease (Sigma); 1% Triton X-100 a 4°C, utilizando gerador 20s Politron PTA (Modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY) em velocidade máxima por 30 segundos. As proteínas contidas no homogenato foram então precipitadas com um volume igual de uma mistura de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção 25:24:1) e centrifugadas a 16.000g por 15 minutos à temperatura ambiente, sendo removida a fase aquosa. Para remoção da fase orgânica um volume igual de metanol foi adicionado às amostras, sendo estas centrifugadas a 12.000g por 15 minutos. A fase orgânica foi descartada, sendo o pellet lavado três vezes com 1 ml de metanol. As proteínas contidas no pellet foram, em seqüência, ressuspendidas em tampão contendo 50 mM PB pH 7,4, 5% β-mercaptoetanol, 10 mM EDTA, 1% coquetel inibidor de protease (SIGMA), 1% SDS. A concentração de proteínas foi então determinada pelo método de "Bradford" (Bradford, 1976), sendo estas normalizadas de modo que todas as amostras possuíssem igual concentração de proteínas. Esta normalização foi ainda confirmada através da coloração das membranas eletrotransferidas utilizando-se corante Ponceau S. A cada amostra foi então adicionado um igual volume de tampão de amostra Laemmli (Laemmli, 1970). Subsequentemente, as amostras foram mantidas por 5 min em banho-maria (95 °C). O equivalente a $3\mu g$ de proteínas totais foram submetidas a eletroforese, com SDS, em gel de 12% de poliacrilamida. As proteínas contidas no gel foram eletrotransferidas por 90 min a 120V para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) (Towbin e cols., 1979). 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, 0,05% Tween 20 (PBS-tween+leite). A membrana foi subseqüentemente incubada com anticorpo anti-UCP1 (sc-6529, Santa Cruz) diluído 1:500 em 10ml de tampão PBS-tween contendo 3% BSA, por 12h a 4°C. A nitrocelulose foi então lavada por 15min com solução PBS-tween e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Zymax – Zymed Laboratories) diluída 1:1000 em 10ml de PBS-tween+3% leite desnatado em pó, por 2h em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada uma nova lavagem com PBS-tween e as bandas imunorreativas foram detectadas por autoradiografia em um filme Kodak GBX2 utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce).

Os valores de densidade ótica relativa ao controle foram comparados utilizando-se teste t pareado comparando-se o grupo controle aos demais gurpos. Considerou-se diferença estatisticamente significativa p<0,05.

3.7 - Analise da fosforilação da STAT3 no hipotálamo

No sétimo dia após a cirurgia de implante de cânulas um lote de 28 animais selecionados no teste com angiotensina II foi dividido aleatoriamente em quatro grupos. O primeiro recebeu uma aplicação i.c.v. de 8µl de TAT-CNTF (CRIBI, Universidade de Padova, Itália – 0,3mg/ml). O mesmo protocolo foi utilizado para o segundo, terceiro e quarto grupos, diferindo apenas no uso de rhCNTF (CRIBI, Universidade de Padova, Itália – 0,3mg/ml), Leptina (Calbiochem, La Jola, EUA – 0,625 mg/ml) e PBS, respectivamente.

Nos intervalos de 5 e 20 minutos após a aplicação de TAT-CNTF, CNTF e Leptina e 20 minutos após aplicação de PBS foi realizada a craniotomia e dissecação do hipotálamo dos

animais. Estas amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C até o uso. Para a extração de proteínas totais dos hipotálamos armazenados estes foram homogeneizadas em tampão de extração (1% Triton X-100, 50 mM PB pH 7.4, 1 mM pirofosfato de sódio, 1 mM sódio fluorido, 5 mM EDTA, 1 mM Vanadato de sódio, 1% coquetel inibidor de protease P8340 Sigma, 7 M Uréia, 2 M 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 por 30 segundos. As amostras foram subsequentemente centrifugadas a 12.000g/4°C por 15 min, sendo retirado 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 a eletroforese, com SDS, em gel de 8% de poliacrilamida. As proteínas contidas no gel foram eletrotransferidas por 90 minutos a 120V para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) (Towbin e cols., 1979). 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 anti-fosfo-STAT3 (Tyr705, Cell Signaling) 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 3 vezes por 5 minutos com PBS-tween, sendo as bandas

imunorreativas detectadas por autoradiografia 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 15 minutos em solução 0,2M de glicina-HCL pH 2,7 para a eluição dos anticorpos utilizados. Em seguida as mesmas membranas passaram pelos mesmos procedimentos acima descritos substituindo-se apenas o anticorpo anti-fosfo-STAT3 por um anticorpo anti-STAT3 (Santa Cruz).

A densidade óptica das bandas imunorreativas foi determinada por densitometria digital (Scion Image Software).

Os valores de densidade ótica relativa ao controle foram comparados utilizando-se teste t pareado comparando-se o grupo controle aos demais gurpos. Considerou-se diferença estatisticamente significativa p<0,05.

4 - RESULTADOS

4.1 - Peso corporal

O efeito da administração i.c.v. de CNTF, Leptina, TAT-CNTF e PBS sobre o peso corporal dos animais pode ser observado na Figura 1. Lembrando que este tratamento correspondeu a 8 infusões i.c.v. em intervalos de 12 horas (4 dias). Note-se que 12 horas após a primeira infusão os animais de todos os grupos apresentaram queda de peso corporal. Contudo, este efeito foi particularmente expressivo nos animais tratados com CNTF, sendo significativamente maior que nos animais que receberam PBS (p<0,05). Doze horas após a segunda infusão continuou havendo queda do peso corporal em todos os grupos, embora não houvesse diferença significativa entre eles. Por outro lado, após a terceira infusão apenas o grupo tratado com CNTF continuou a exibir queda do peso corporal, enquanto que nos demais não houve variação significativa em relação ao período anterior. Interessantemente, este fenômeno continuou a ocorrer nos tempos subseqüentes. Ou seja, os grupos tratados com Leptina, TAT-CNTF ou PBS mantiveram seu peso corporal relativamente estável, enquanto que os animais que receberam CNTF continuaram a perder peso. Note-se ainda que o peso corporal dos animais controle (PBS) foi sempre superior ao dos tratados com Leptina ou TAT-CNTF. Além disso, os animais destes grupos exibiram peso corporal semelhante até o último tratamento. Contudo, 24 horas após a última infusão os ratos que receberam Leptina apresentaram significativa queda do peso corporal quando comparados aos animais do grupo TAT-CNTF. Note-se, porém, que a comparação do peso corporal dos animais 24 horas após a última infusão revela que aqueles que receberam CNTF apresentaram a maior perda de peso em relação grupo controle,

apresentando também uma diferença significativa em relação àqueles tratados com TAT-CNTF (Tabela 1).



	Tratamento					
	PBS	LEPTINA	CNTF	TAT-CNTF		
Tempo (horas)						
12	96,59% ± 0,89 a	94,34% ± 0,56 ac	93,17% ± 0,41 bc	95,45% ± 0,39 a		
24	94,77% ± 1,71 a	92,14% ± 1,20 a	91,02% ± 0,57 a	93,1% ± 0,23 a		
36	95,15% ± 1,62 a	92,39% ± 1,38 ab	88,85% \pm 0,63 b	92,13% ± 0,68 ab		
48	94,62% ± 1,29 a	91,46% ± 1,09 b	87,41% ± 0,83 c	91,29% ± 0,57 b		
60	95,58% ± 1,56 a	92,23% ± 0,88 a	86,51% ± 1,16 b	91,97% ± 0,64 a		
72	94,51% ± 1,17 a	91,29% ± 1,07 a	85,63% ± 1,37 b	91,45% ± 0,58 a		
84	95,55% ± 0,82 a	$90{,}95\%\pm1{,}38~\textbf{b}$	85,39% ± 1,49 c	91,44% ± 0,79 b		
108	95,04% ± 0,64 a	88,51% ± 1,06 b	83,76% ± 1,25 c	91,91% ± 1,04 d		

Tabela 1. Variação percentual do peso dos animais em relação à primeira infusão i.c.v.. Valores da mesma linha que não contem letra em comum apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA p < 0.05).

4.2 - Peso das gorduras marrom e brancas

A análise do peso das gorduras marrom, branca retroperitonial e branca epididimal permitiu observar que o grupo tratado com TAT-CNTF não apresentou qualquer redução de peso das gorduras marrom e branca quando comparado ao grupo PBS. Ao passo que o tratamento com CNTF levou a uma redução do peso das gorduras marrom e branca quando comparado ao dos animais controle (PBS). Por sua vez, os animais tratados com Leptina apresentaram redução do peso da gordura marrom similar ao observado no grupo CNTF. O peso das gorduras brancas retroperitonial e epididimal no grupo Leptina se mostrou semelhante ao do grupo controle (PBS). Contudo, houve uma tendência à redução considerando-se que esses valores se aproximaram dos registrados no grupo CNTF.



Figura 2. Peso das gorduras marrom (GM), branca retroperitonial (GR) e branca epididimal (GE) após 4 dias de tratamento i.c.v. Os valores correspondem a média±e.p.m. Ausência de letra comum entre as barras indica diferença estatisticamente significativa (ANOVA p<0,05). PBS, n=5; Leptina, n=5; CNTF, n=5; TAT-CNTF, n=7.

4.3 - Análise da fragmentação do DNA nas gorduras marrom e branca

A análise do percentual de fragmentação do DNA extraído da gordura branca retroperitonial e epididimal permitiu observar um aumento da relação DNA fragmentado/DNA total nos animais tratados i.c.v. com CNTF ou Leptina (Figura 3). Por sua vez, os animais tratados com TAT-CNTF não apresentaram aumento do percentual de DNA fragmentado. A mesma análise realizada nas amostras de gordura marrom não evidenciou qualquer diferença no percentual de fragmentação de DNA entre os grupos.

A separação do DNA fragmentado extraído das gorduras retroperitonial e epididimal, em gel de agarose, permitiu observar um padrão de degradação internucleossomal composto por fragmentos múltiplos de aproximadamente 180bp nos animais tratados com CNTF (Figuras 4 e 5). Padrão semelhante, embora menos evidente, foi observado nos animais tratados com Leptina. Notadamente, tal padrão não foi observado nos animais controle e nos animais tratados como TAT-CNTF. O DNA extraído da gordura marrom, quando separado em gel de agarose, não evidenciou qualquer padrão de fragmentação internuclessomal do DNA (Figura 6).

A detecção de fragmentação de DNA em lâminas histológicas através da reação de TUNEL evidenciou a presença de núcleos apoptóticos nas gorduras brancas epididimal e retroperitonial de ratos tratados via i.c.v. com CNTF ou Leptina (Figuras 7 e 8). As características morfológicas de núcleo deslocado para a periferia, citoplasma escasso e grande vacúolo central, sugerem que tais células marcadas são adipócitos. Não foram detectadas células TUNEL positivas na gordura marrom de qualquer um dos grupos analisados (Figura 9).

24



Figura 3. Porcentagem de fragmentação do DNA na gordura marrom e gorduras brancas retroperitonial e epididimal após 4 dias de tratamento i.c.v.. Os valores correspondem a média±e.p.m. Ausência de letra comum entre as barras indica diferença significativa (ANOVA p<0,05). PBS (n=4), TAT-CNTF (n=4), CNTF (n=4), Leptina (n=4)



Figura 4. Gel de agarose (2%) do DNA fragmentado extraído da gordura retroperitonial demonstrando degradação internucleossomal do DNA no grupo tratado i.c.v. com CNTF. Gel corado com SybrGreen. Setas indicam bandas de DNA fragmentado múltiplo de 180bp.



Figura 5. Gel de agarose (2%) do DNA fragmentado extraído da gordura epididimal demonstrando degradação internucleossomal do DNA nos grupos tratado i.c.v. com CNTF e Leptina. Gel corado com SybrGreen. Setas indicam bandas de DNA fragmentado múltiplo de 180bp.



Figura 6 Gel de agarose (2%) do DNA fragmentado extraído da gordura marrom. Não se evidencia degradação internucleossomal do DNA. Gel corado com SybrGreen.



Figura 7. Cortes histológicos de gordura retroperitonial de ratos tratados com TAT-CNTF, CNTF, PBS ou Leptina (i.c.v.) por 4 dias. Os cortes foram processados pela técnica de TUNEL e contra-corados com verde de metila. Setas indicam células TUNEL positivas nos grupos Leptina e CNTF. Em maior aumento núcleo marcado indicado pela seta. Objetiva 40X: Barra = 20μ m. Objetiva 100X: Barra = 7μ m.



Figura 8. Cortes histológicos de gordura epididimal de ratos tratados com TAT-CNTF, CNTF, PBS ou Leptina (i.c.v.) por 4 dias. Os cortes foram processados pela técnica de TUNEL e contra-corados com verde de metila. Setas indicam células TUNEL positivas nos grupos Leptina e CNTF. Em maior aumento - núcleo marcado indicado pela seta. Objetiva 40X: Barra = 20μ m. Objetiva 100X: Barra = 7μ m.



Figura 9. Cortes histológicos de gordura marrom de ratos tratados com TAT-CNTF, CNTF, PBS ou Leptina (i.c.v.) por 4 dias. Os cortes foram processados pela técnica de TUNEL e contra-corados com verde de metila. Ausência de células TUNEL positivas em todos os tratamentos. Objetiva 40X: Barra = 20μ m.

4.4 - Expressão da UCP1 no tecido adiposo marrom

A análise da expressão da UCP1 na gordura marrom evidenciou um aumento de até 50% desta proteína nos grupos tratados com CNTF ou Leptina, quando comparados ao grupo controle (PBS). Notadamente, o grupo de animais tratados com TAT-CNTF não apresentou alterações na expressão da UCP1 com relação ao controle.



Figura. 10. Expressão da UCP1 após 4 dias de tratamento i.c.v. com PBS, Leptina, CNTF ou TAT-CNTF. Os valores correspondem à densidade óptica dividida pela densidade óptica do grupo PBS (média±e.p.m). Asterisco indica diferença significativa (Teste T pareado, P<0,05 contra PBS). Aumento da expressão da UCP1 nos grupos CNTF e Leptina. Notar que o grupo TAT-CNTF não apresenta aumento da UCP1. Abaixo do gráfico são apresentadas as bandas representativas para cada grupo (n=4).

4.5 - Fosforilação da STAT3 no hipotálamo

A indução da fosforilação da STAT3 no hipotálamo após administração i.c.v. de CNTF, Leptina, TAT-CNTF ou PBS é observada na figura 11. Apenas os ratos que receberam CNTF apresentaram um significativo aumento da fosforilação da STAT3 após cinco minutos. Este efeito foi fortemente intensificado após vinte minutos. Os animais que receberam TAT-CNTF ou Leptina mantiveram níveis de STAT3 fosforilada semelhante ao controle após 5 minutos. Por outro lado, após vinte minutos estes grupos exibiram níveis de STAT3 fosforilada maiores que o grupo controle, porém semelhante ao apresentado pelo grupo CNTF após cinco minutos.



Figura. 11. Fosforilação da STAT3 induzida 5 e 20 minutos após administração i.c.v. de PBS, Leptina, CNTF ou TAT-CNTF. Os valores correspondem à densidade óptica dividida pela densidade óptica do grupo PBS (média±e.p.m). Asterisco indica diferença significativa (Teste T pareado, P<0,05 contra PBS). Notar expressiva fosforilação de STAT3 no grupo CNTF. Grupos TAT-CNTF e Leptina também apresentam significativa fosforilação da STAT3 20 minutos após administração i.c.v., porém menor do que a observada no grupo CNTF. Abaixo do gráfico são apresentadas as bandas representativas para cada grupo (n=4).

5 – DISCUSSÃO

Nossas observações referentes à administração i.c.v. de TAT-CNTF sugerem que a adição de um domínio de translocação de proteína ao CNTF modificou a ação desta molécula nos centros hipotalâmicos relacionados ao controle da ingesta e do metabolismo.

A perda de peso corporal gerado pela administração de CNTF ou Leptina se dá principalmente através da ação destas moléculas em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo (Elmquist e cols., 1999; Schwartz e cols., 2000; Lambert e cols., 2001; Anderson e cols., 2003) Destacando-se nesta região as células que expressam proopiomelanocortina (POMC) como fundamentais mediadoras destes efeitos (Elmquist, 2001; Janoschek e cols., 2006). Considerando o papel destas células, nossos resultados sugerem que a menor redução do peso corporal observada no grupo TAT-CNTF, quando comparada ao grupo CNTF, seja devido a uma diferente atuação destas moléculas sobre os neurônios do núcleo arqueado que expressam POMC.

Nossos dados relativos à perda de peso corporal após administrações i.c.v. de CNTF ou Leptina são semelhantes àqueles da literatura. Outros autores também observaram uma perda de aproximadamente 16% e 11% do peso corporal após quatro dias de administrações diárias de 5µg de CNTF ou 10µg de Leptina via i.c.v. respectivamente (Qian e cols., 1998; Pu e cols., 2000; Duff e cols., 2004). A maior redução do peso nos primeiros dias de tratamento com CNTF ou Leptina observada em nossos experimentos é semelhante a dados reportados previamente por Pu e colaboradores (2000) e Duff e colaboradores (2004).

A redução do peso das gorduras marrom e branca, observada em resposta às administrações i.c.v. de CNTF ou Leptina, também é semelhante a dados já reportados por

outros autores (Qian e cols., 1998; Gullicksen e cols., 2003; Duff e cols., 2004). Entretanto, esses autores demonstraram uma redução da gordura retroperitonial maior do que a observada em nossos experimentos. Tal diferença poderia ser atribuída às características das linhagens empregadas. Em nossos experimentos utilizamos ratos Wistar ao passo que os dados da literatura se baseiam em experimentos realizados em ratos da linhagem Sprague-Dawley.

De qualquer forma, a ausência de diferenças de peso das gorduras entre o grupo controle (PBS) e o grupo tratado com TAT-CNTF parece indicar que neste último, apesar da redução do peso corporal, não houve significativa mobilização de triglicérides estocados nos tecidos adiposos. Neste sentido, nossos dados referentes à expressão de UCP1 na gordura marrom indicam que os grupos tratados com CNTF ou Leptina apresentaram um aumento do gasto energético, ao passo que os animais que receberam TAT-CNTF não apresentaram tal mudança.

Bluher e colaboradores (2004) demonstraram que o aumento da expressão da UCP1, quando acompanhado da inibição da ingesta, é um importante elemento responsável pela perda de peso ocasionada pela ação do CNTF. Estes autores realizaram experimentos envolvendo a administração de CNTF via i.p. em camundongos com obesidade induzida por dieta ou com obesidade gerada pela não expressão da UCP1 (UCP1-toxina da difteria A - UCP1-DTA). Como controle do efeito metabólico dos tratamentos, estes autores utilizaram grupos "pair-fed", ou seja, animais que recebiam a mesma quantidade de comida consumida pelos animais tratados com CNTF. Assim, verificou-se que camundongos com obesidade induzida por dieta tratados com CNTF apresentavam perda de peso corporal superior a animais de um grupo "pair-fed". Por outro lado, os animais UCP1-DTA tratados com CNTF apresentaram perda de peso igual àquela observada no grupo "pair fed". Considerando-se estes fatos, nossos dados referentes à ausência de aumento da expressão de UCP1 no grupo tratado com TAT-CNTF sugerem que o eventual aumento do gasto energético nestes animais teve reduzida importância na perda de peso.

A capacidade do CNTF de aumentar a expressão da UCP1 no tecido adiposo marrom e sua relação direta com a termogênese já foi demonstrada em outros modelos experimentais (Ott e cols., 2002; Bluher e cols., 2004). Entretanto, nossos dados são os primeiros a mostrar que o aumento da expressão da UCP1 na gordura marrom pode ser induzido pela administração i.c.v. de CNTF. Embora não possamos excluir a possível atuação direta do CNTF sobre a gordura marrom, tal constatação sugere que o CNTF atue diretamente sobre neurônios hipotalâmicos relacionados com a inervação simpática da gordura marrom.

Neste mesmo sentido, Scarpace e Matheny (1998) mostraram que o aumento da UCP1 na gordura marrom induzido pela administração sistêmica de Leptina é dependente da inervação simpática deste tecido. Considerando que as regiões hipotalâmicas ativadas pelo CNTF e pela Leptina são semelhantes, e que estas possuem conexões com as vias simpáticas centrais, pode-se propor que o aumento da expressão da UCP1 na gordura marrom ocorra pela ativação de vias neurais e mecanismos análogos. De fato, sabe-se que as células que expressam POMC no núcleo arqueado projetam-se diretamente para neurônios do sistema nervoso simpático na coluna lateral da medula (Elias e cols., 1998). Por outro lado, a ausência de efeito da administração i.c.v. de TAT-CNTF sobre a expressão da UCP1 permite supor que a adição do PTD tenha modificado o modo de atuação desta molécula sobre os neurônios que expressam POMC.

O consumo das reservas energéticas armazenadas nos adipócitos em condições de inibição da ingesta, em contraposição ao que ocorre durante a simples restrição de acesso ao alimento, leva à apoptose destas células (Qian e cols., 1998; Gullicksen e cols, 2003;

Duff e cols., 2004). Neste sentido, observamos nos grupos tratados com CNTF ou Leptina um aumento da quantidade de DNA fragmentado nas gorduras brancas retroperitonial e epididimal. Além disso, também detectamos a presença de um padrão de degradação do DNA característico de atividade de endonucleases. Estas observações indicam a ocorrência de apoptose nestes tecidos, sendo estes dados semelhantes àqueles observados por outros autores (Gullicksen e cols, 2003; Duff e cols., 2004). Embora qualitativos, nossos dados referentes à localização in situ de células apoptóticas através da técnica de TUNEL confirmam a ocorrência de morte celular nas gorduras brancas de animais dos grupos CNTF e Leptina. Semelhante ao observado por Qian e colaboradores (1998), nossas observações sugerem que são adipócitos as células em apoptose nestes tecidos. Entretanto, o mecanismo responsável pela morte de adipócitos provocada pelo consumo de suas reservas lipídicas ainda não é conhecido. Além disso, este efeito não foi demonstrado em outras situações em que ocorre aumento de consumo energético que não as desencadeadas pela administração exógena de Leptina ou CNTF. De qualquer forma, em virtude da ausência de perda de peso das gorduras nos grupos tratados com PBS ou TAT-CNTF, era esperada a não detecção de morte dos adipócitos destes grupos.

Assim como em outros experimentos envolvendo administrações i.c.v. de CNTF ou Leptina, não detectamos morte celular na gordura marrom (Qian e cols., 1998; Gullicksen e cols, 2003; Duff e cols., 2004). O aumento da atividade simpática neste tecido desencadeada pelos tratamentos com CNTF ou Leptina poderia explicar a ausência de apoptose. Neste sentido, vários autores demonstraram que após um aumento da atividade simpática ocorre elevação da relação Bcl2/Bax e redução da morte dos adipócitos da gordura marrom por apoptose (Briscini e cols., 1998; Lindquist e Rehnmark, 1998). Além disso, sabe-se que tais efeitos podem ser observados também após a adição de

noradrenalina a adipócitos em cultura. (Briscini e cols., 1998; Lindquist e Rehnmark, 1998). Neste contexto, é interessante notar que a gordura marrom não é um mero reservatório de triglicérides, mas, devido à expressão da UCP1 por seus adipócitos, ela tem como principal função a termogênese independente de tremor muscular (Nedergaard e cols., 2001). Além disso, vale ressaltar também a função crucial deste órgão no controle da temperatura corporal de pequenos mamíferos e animais neonatos. Assim, é plausível supor que, mesmo após a exaustão de seus vacúolos lipídicos, estas células não entram em apoptose pelo fato de ainda desempenharem sua função consumindo triglicérides mobilizados de outros tecidos.

Nossos dados referentes à fosforilação de STAT3 no hipotálamo em resposta a administração i.c.v. de CNTF ou Leptina são semelhantes ao observado por outros autores (Carvalheira e cols., 2005, Steinberg e cols., 2006). Como apenas os tempos de 5 e 20 minutos após a infusão foram avaliados, não é possível afirmar que o máximo de fosforilação de STAT3 tenha sido alcançado em 20 minutos. Ainda assim, o padrão temporal observado em nossos dados é compatível com a cinética da ação do complexo receptor ativado pela ligação com o CNTF (Kaur e cols., 2002).

As observações relativas aos ratos tratados com TAT-CNTF demonstram uma menor fosforilação da STAT3 neste grupo quando comparado àquele tratado com CNTF. Esses dados podem ser explicados por uma menor quantidade de neurônios ativados pelo TAT-CNTF ou por uma menor resposta destas células. Uma possível explicação para esta diferença seria a ampla difusão do TAT-CNTF pelo tecido nervoso, com sua conseqüente internalização em diversas células. Assim, a concentração do TAT-CNTF no hipotálamo não alcançaria níveis semelhantes ao do CNTF. Neste sentido, Cashman e colaboradores (2003) demonstraram que, uma vez internalizadas, proteínas conjugadas a domínios PTD se deslocam para o núcleo e dificilmente difundem novamente para fora da célula. Outra possibilidade é sugerida pelas observações de Hakansson e colaboradores (2001) ao mostrarem que peptídeos conjugados a domínios PTD possuem alta afinidade por moléculas de heparan-sulfato da porção externa da membrana celular. Desta forma, podemos supor que o TAT-CNTF permaneceria aderido a estas moléculas, não alcançando neurônios hipotalâmicos responsivos ao CNTF. Por outro lado, os dados de Rezende (2005) demonstraram que o TAT-CNTF administrado s.c. por cinco dias em ratos neonatos é capaz de proteger motoneurônios axotomizados sem determinar alteração de peso corporal, observada após o tratamento CNTF. Neste caso, é plausível supor que concentrações efetivas de TAT-CNTF conseguiram alcançar os motoneurônios lesiados protegendo-os da morte por apoptose.

A capacidade do TAT-CNTF de conferir proteção a motoneurônios sem gerar perda de peso corporal observada por Rezende (2005) fornece indícios de que os mecanismos pelos quais o CNTF gera estas duas ações sejam distintos. Uma possibilidade seria a de que a proteção de motoneurônios mediada pelo CNTF se daria pela ativação do CNTFR α ancorado á membrana, ao passo que a atuação nos neurônios POMC do núcleo arqueado se daria principalmente através de ativação do CNTFR α solúvel. O CNTF necessita de um complexo receptor trimérico na membrana para atuar em uma célula. Assim, uma célula que não expresse o CNTFR α , por exemplo, não seria responsiva ao CNTF. Entretanto o CNTFR α possui uma forma solúvel que mediante ligação com o CNTF atua em células que expressam apenas as subunidades β do complexo receptor (Davis e cols., 1993). Considerando-se que moléculas conjugadas a um PTD rapidamente são internalizadas, ou ficam aderidas a proteoglicanos da membrana celular, é possível supor que poucas moléculas de TAT-CNTF se liguem à forma solúvel do CNTFR α . (Chauhan e cols., 2006).

Apesar de Lee e colaboradores (1997) terem demonstrado a existência de células que expressam CNTFR α no hipotálamo, não há dados específicos sobre a expressão deste receptor nas células POMC do núcleo arqueado. Assim, caso estas células não sejam CNTFR α positivas, o TAT-CNTF teria reduzida capacidade de atuação nas mesmas. Por sua vez, IP e colaboradores (1993) demonstraram que motoneurônios expressam CNTFR α , sendo, portanto, mais responsivos ao TAT-CNTF que as células POMC hipotalâmicas.

Reforçando esta hipótese, Rezende (2005) também verificou que a administração de CNTF em ratos neonatos que tiveram o nervo ciático seccionado gera um difuso aumento da expressão de GFAP na medula espinhal. Porém, os animais tratados com TAT-CNTF apresentaram padrão de expressão de GFAP semelhante ao dos animais controle. É importante ressaltar que não há dados sobre a expressão de CNTFR α em astrócitos não reativos (Squinto et al., 1990; MacLennan et al.,1996; Kordower et al., 1997; Kahn e cols., 1997). Desta forma, a ação neuroprotetora do TAT-CNTF sobre motoneurônios e a eventual ausência de CNTFR α nos astrócitos não reativos permite supor que sua atuação sobre os primeiros se fez através de CNTFR α ancorado na membrana e que o CNTF atuou sobre os astrócitos via CNTFR α solúvel.

A possível diferença entre a atividade biológica do CNTF mediada por seu receptor solúvel e aquela mediada por seu receptor ancorado à membrana já foi demonstrada para um outro membro desta família de citocinas, a Interleucina-6 (IL6). Jostock e colaboradores (2001) demonstraram que a forma solúvel do receptor gp130 (sgp130) bloqueia especificamente respostas mediadas pela forma solúvel do IL-6R (sIL-6R), ao passo que não interfere naquelas mediadas pelo IL-6R ancorado à membrana. Posteriormente, outros estudos verificaram que a administração de sgp130 bloqueia algumas ações da IL-6, tais como a proteção de linfócitos T contra apoptose em colites experimentais e o recrutamento

de leucócitos em um modelo de artrite auto-imune experimental (Atreya e cols., 2000; Nowell e cols., 2003). Em relação à ação do CNTF, nenhum trabalho explorou a possibilidade de que a forma solúvel do gp130 tenha alguma função na modulação da atividade desta molécula tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Por sua vez, Di Marco e colaboradores (1997) verificaram que o complexo receptor para o CNTF ancorado na membrana é capaz de mediar a ação de variantes do CNTF com menor afinidade pelo componente alfa, ao passo que tal mediação é menos eficaz quando o complexo é formado a partir da interação com o CNTFR α solúvel. Assim, é possível que a adição de um PTD ao CNTF tenha reduzido a afinidade desta molécula pelo CNTFR α solúvel, o que poderia explicar a menor capacidade do TAT-CNTF de atuar em células que não expressam CNTFR α .

Monville e colaboradores (2001) demonstraram que o CNTF é capaz de atuar sobre astrócitos em cultura que não expressam CNTFRα. Em particular, estes autores verificaram que astrócitos maduros respondem a concentrações de CNTF superiores a 250 ng/ml e que a coadministração de um bloqueador parcial do LIFRβ reduziu sua ação nestas células. Evidenciou-se assim que a ação do CNTF se daria através de uma ligação direta com o LIFRβ. É possível que em nosso modelo experimental a atuação do CNTF nas células POMC no hipotálamo esteja ocorrendo também através de sua ligação direta ao LIFRβ. A adição de um domínio PTD pode ter reduzido a capacidade do CNTF para atuar diretamente sobre o LIFRβ, explicando assim os menores efeitos produzidos pelo TAT-CNTF.

A possibilidade de o CNTF atuar *in vivo* através do CNTFRα solúvel, ou através de ligação direta ao LIFRβ, também pode ser alicerçada nas observações de Anderson e colaboradores (2003). Estes autores mostraram a indução da fosforilação de STAT3 em

astrócitos de camundongos normais 90 minutos após a administração s.c. de CNTF. Vale lembrar que não há evidências da expressão de CNTFRα em astrócitos não reativos. Assim, tais observações nos permitem supor que a atuação do CNTF no hipotálamo possa ocorrer via receptor solúvel ou através sua ligação direta ao LIFRβ.

Em conjunto, nossos dados mostram, pela primeira vez, que a adição de um PTD pode modular a ação de uma molécula que atua via receptor de membrana. Desta forma, abremse novas perspectivas para possíveis empregos do domínio TAT do HIV-1, além da sua conhecida capacidade de transdução de grandes moléculas através de membranas celulares. O presente trabalho também apresenta indícios de que existem mecanismos de ação do CNTF sobre os neurônios hipotalâmicos envolvidos no controle do metabolismo distintos daqueles relacionados a seus efeitos neurotróficos/neuroprotetores. Avanços neste sentido permitirão um uso mais eficiente do CNTF tanto para o tratamento de doenças neurodegenerativas, quanto para o tratamento da obesidade.

6 - CONCLUSÕES

A associação de um PTD ao CNTF modificou as propriedades funcionais desta molécula a sua atuação no hipotálamo.

A menor ativação da via de sinalização JAK/STAT induzida pelo TAT-CNTF no hipotálamo comparativamente à induzida pelo CNTF correlaciona-se com a menor perda de peso corporal por ele gerada.

A atuação do TAT-CNTF no hipotálamo não induziu alterações funcionais e morfológicas no tecido adiposo branco e marrom, contrariamente ao produzido pelo CNTF.

Tais observações suportam a hipótese da existência de mecanismos de ação do CNTF sobre os neurônios hipotalâmicos envolvidos no controle do metabolismo possivelmente distintos daqueles relacionados a seus efeitos neurotróficos/neuroprotetores.

7 – BIBLIOGRAFIA

ADLER R, LANDA KB, MANTHORPE M, VARON S. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. **Science**, **204**(**4400**):1434-1436, 1979.

AEBISCHER P, SCHLUEP M, DEGLON N, JOSEPH JM, HIRT L, HEYD B, GODDARD M, HAMMANG JP, ZURN AD, KATO AC, REGLI F, BAETGE EE. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. **Nat Med.**, **2**(6):696-699, 1996.

ANDERSON KD, LAMBERT PD, CORCORAN TL, MURRAY JD, THABET KE, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ. Activation of the hypothalamic arcuate nucleus predicts the anorectic actions of ciliary neurotrophic factor and leptin in intact and gold thioglucose-lesioned mice. J Neuroendocrinol., 15(7):649-660, 2003.

ARAKAWA Y, SENDTNER M, THOENEN H. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. **J Neurosci.**, **10**(11):3507-3515 1990.

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.

ATREYA R, MUDTER J, FINOTTO S, MÜLLBERG J, JOSTOCK T, WIRTZ S, SCHÜTZ M, BARTSCH B, HOLTMANN M, BECKER C, STRAND D, CZAJA J, SCHLAAK JF, LEHR HA, AUTSCHBACH F, SCHÜRMANN G, NISHIMOTO N, YOSHIZAKI K, ITO H, KISHIMOTO T, GALLE PR, ROSE-JOHN S, NEURATH MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. **Nat Med.**, **6**(5):583-588, 2000.

BACHOUD-LEVI AC, DEGLON N, NGUYEN JP, BLOCH J, BOURDET C, WINKEL L, REMY P, GODDARD M, LEFAUCHEUR JP, BRUGIERES P, BAUDIC S, CESARO P, PESCHANSKI M, AEBISCHER P.Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. **Hum Gene Ther.**, **11**(12):1723-1729, 2000.

BARBIN G, MANTHORPE M, VARON S. Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. **J Neurochem.**, **43**(5):1468-1478 1984.

BAUMANN H, MORELLA KK, WHITE DW, DEMBSKI M, BAILON PS, KIM H, LAI CF, TARTAGLIA LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **93**(16):8374-8378, 1996.

BAZAN JF. Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. **Neuron**, **7**(**2**):197-208 1991. BECKER-HAPAK M, MCALLISTER SS, DOWDY SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. **Methods. 24**(**3**):247-256, 2001.

BLOTTNER D, BRUGGEMANN W, UNSICKER K Ciliary neurotrophic factor supports targetdeprived preganglionic sympathetic spinal cord neurons. **Neurosci Lett.**, **105**(**3**):316-320 1989. BLUHER S, MOSCHOS S, BULLEN J JR, KOKKOTOU E, MARATOS-FLIER E, WIEGAND SJ, SLEEMAN MW, MANTZOROS CS. Ciliary neurotrophic factorAx15 alters energy homeostasis, decreases body weight, and improves metabolic control in diet-induced obese and UCP1-DTA mice. **Diabetes**, **53**(11):2787-2796, 2004.

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.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem. 72**:248-254, 1976.

BRISCINI L, TONELLO C, DIONI L, CARRUBA MO, NISOLI E. Bcl-2 and Bax are involved in the sympathetic protection of brown adipocytes from obesity-linked apoptosis. **FEBS Lett.**, **431**(1):80-84, 1998.

CAMPFIELD LA, SMITH FJ, GUISEZ Y, DEVOS R, BURN P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, **269**(**5223**):475-476, 1995.

CAO G, PEI W, GE H, LIANG Q, LUO Y, SHARP FR, LU A, RAN R, GRAHAM SH, CHEN J. In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. **J Neurosci. 22(13)**:5423-5431, 2002.

CASHMAN SM, MORRIS DJ, KUMAR-SINGH R. Evidence of protein transduction but not intercellular transport by proteins fused to HIV tat in retinal cell culture and in vivo. **Mol Ther.**, **8**(1):130-142, 2003.

CARVALHEIRA JB, TORSONI MA, UENO M, AMARAL ME, ARAÚJO EP, VELLOSO LA, GONTIJO JA, SAAD MJ. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. **Obes Res**. 13(1):48-57, 2005.

CEDARBAUM JM, CHAPMAN C, CHARATAN M, STAMBLER N, ANDREWS L, ZHAN C, RADKA S, MORRISEY D, LAKINGS D, BROOKS BR, SANJAK M, PESTRONK A, FLORENCE J, MITSUMOTO H, SZIRONY K, BITTLE L, NEVILLE H, RINGEL S, BRINKMANN J, WITTES J. A phase-I study of recombinant human Ciliary Neurotrophic Factor (rhCNTF) in patients with amyotrophic-lateral-sclerosis. **CLINICAL NEUROPHARMACOLOGY, 18 (6)**: 515-532, 1995.

CHAUHAN A, TIKOO A, KAPUR AK, SINGH M. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. **J Control Release.**, **117**(**2**):148-162, 2007. DAVIS S, ALDRICH TH, IP NY, STAHL N, SCHERER S, FARRUGGELLA T, DISTEFANO PS, CURTIS R, PANAYOTATOS N, GASCAN H, et al. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. **Science**, **259**(**5102**):1736-1739 1993b.

DAVIS S, ALDRICH TH, STAHL N, PAN L, TAGA T, KISHIMOTO T, IP NY, YANCOPOULOS GD. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. **Science**, **260**(**5115**):1805-1808 1993a.

DAVIS S, ALDRICH TH, VALENZUELA DM, WONG VV, FURTH ME, SQUINTO SP, YANCOPOULOS GD. The receptor for ciliary neurotrophic factor. **Science**, **253**(**5015**):59-63 1991.

DI MARCO A, GLOAGUEN I, DEMARTIS A, SAGGIO I, GRAZIANI R, PAONESSA G, LAUFER R. Agonistic and antagonistic variants of ciliary neurotrophic factor (CNTF) reveal functional differences between membrane-bound and soluble CNTF alpha-receptor. J Biol Chem., 272(37):23069-23075, 1997.

DUFF E, LI CL, HARTZELL DL, CHOI YH, DELLA-FERA MA, BAILE CA. Ciliary neurotrophic factor injected icv induces adipose tissue apoptosis in rats. **Apoptosis**, **9**(5):629-634, 2004.

ELIAS CF, ASCHKENASI C, LEE C, KELLY J, AHIMA RS, BJORBAEK C, FLIER JS, SAPER CB, ELMQUIST JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**, **23**(4):775-786, 1999.

ELIAS CF, LEE C, KELLY J, ASCHKENASI C, AHIMA RS, COUCEYRO PR, KUHAR MJ, SAPER CB, ELMQUIST JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. **Neuron**, **21**(6):1375-1385, 1998.

ELMQUIST JK, ELIAS CF, SAPER CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. **Neuron**, **22**(**2**):221-232, 1999.

ELMQUIST JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. Int J Obes Relat Metab Disord., 25 Suppl 5:S78-82, 2001.

ERNSBERGER U, SENDTNER M, ROHRER H. Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: effects of ciliary neurotrophic factor. **Neuron**, **2**(3):1275-1284 1989.

ESPAT NJ, AUFFENBERG T, ROSENBERG JJ, ROGY M, MARTIN D, FANG CH, HASSELGREN PO, COPELAND EM, MOLDAWER LL. Ciliary neurotrophic factor is catabolic and shares with IL-6 the capacity to induce an acute phase response. Am J Physiol. 271(1 Pt 2):R185-190, 1996.

FAWELL S, SEERY J, DAIKH Y, MOORE C, CHEN LL, PEPINSKY B, BARSOUM J. Tatmediated delivery of heterologous proteins into cells. **Proc Natl Acad Sci USA. 91(2)**:664-668, 1994.

FRANKEL AD, PABO CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell. 55(6)**:1189-1193, 1988.

FRIEDMAN B, SCHERER SS, RUDGE JS, HELGREN M, MORRISEY D, MCCLAIN J, WANG DY, WIEGAND SJ, FURTH ME, LINDSAY RM, et al. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. **Neuron, Aug;9(2)**:295-305 1992.

GLOAGUEN I, COSTA P, DEMARTIS A, LAZZARO D, DI MARCO A, GRAZIANI R, PAONESSA G, CHEN F, ROSENBLUM CI, VAN DER PLOEG LH, CORTESE R, CILIBERTO G, LAUFER R. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. **Proc Natl Acad Sci USA 94(12)**:6456-6461, 1997.

GREEN M, LOEWENSTEIN PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. **Cell 55(6)**:1179-1188, 1988.

GULLICKSEN PS, HAUSMAN DB, DEAN RG, HARTZELL DL, BAILE CA. Adipose tissue cellularity and apoptosis after intracerebroventricular injections of leptin and 21 days of recovery in rats. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, **27**(**3**):302-312, 2003.

HAASE G, PETTMANN B, BORDET T, VILLA P, VIGNE E, SCHMALBRUCH H, KAHN A. Therapeutic benefit of ciliary neurotrophic factor in progressive motor neuronopathy depends on the route of delivery. **Ann Neurol.**, **45**(3):296-304, 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):145-158, 1992.

HAKANSSON S, JACOBS A, CAFFREY M. Heparin binding by the HIV-1 tat protein transduction domain. **Protein Sci.**, **10**(10):2138-2139, 2001.

HALAAS JL, GAJIWALA KS, MAFFEI M, COHEN SL, CHAIT BT, RABINOWITZ D, LALLONE RL, BURLEY SK, FRIEDMAN JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, **269**(**5223**):543-546, 1995.

HENDERSON JT, MULLEN BJ, RODER JC. Physiological effects of CNTF-induced wasting. Cytokine, 8(10):784-793, 1996.

HENDERSON JT, SENIUK NA, RICHARDSON PM, GAULDIE J, RODER JC. Systemic administration of ciliary neurotrophic factor induces cachexia in rodents. J Clin Invest., 93(6):2632-2638, 1994b.

HENDERSON JT, SENIUK NA, RODER JC. Localization of CNTF immunoreactivity to neurons and astroglia in the CNS. **Brain Res Mol Brain Res.**, **22**(1-4):151-165 1994a.

HO A, SCHWARZE SR, MERMELSTEIN SJ, WAKSMAN G, DOWDY SF. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. **Cancer Res. 61(2):**474-7, 2001.

HUGHES SM, LILLIEN LE, RAFF MC, ROHRER H, SENDTNER M. Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. **Nature**, **335**(6185):70-73 1988.

IP NY, MCCLAIN J, BARREZUETA NX, ALDRICH TH, PAN L, LI Y, WIEGAND SJ, FRIEDMAN B, DAVIS S, YANCOPOULOS GD. The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. **Neuron**, **10**(1):89-102, 1993.

JANOSCHEK R, PLUM L, KOCH L, MÜNZBERG H, DIANO S, SHANABROUGH M, MÜLLER W, HORVATH TL, BRÜNING JC. gp130 signaling in proopiomelanocortin neurons mediates the acute anorectic response to centrally applied ciliary neurotrophic factor. **Proc Natl** Acad Sci U S A, 103(28):10707-10712, 2006.

JOSTOCK T, MÜLLBERG J, OZBEK S, ATREYA R, BLINN G, VOLTZ N, FISCHER M, NEURATH MF, ROSE-JOHN S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. **Eur J Biochem.**, **268**(1):160-167, 2001.

KAHN MA, ELLISON JA, CHANG RP, SPEIGHT GJ, DE VELLIS J. CNTF induces GFAP in a S-100 alpha brain cell population: the pattern of CNTF-alpha R suggests an indirect mode of action. **Brain Res Dev Brain Res**, **98**(2):221-233, 1997.

KAUR N, WOHLHUETER AL, HALVORSEN SW. Activation and inactivation of signal transducers and activators of transcription by ciliary neurotrophic factor in neuroblastoma cells. Cell Signal., 14(5):419-429, 2002.

KILIC U, KILIC E, DIETZ GP, BAHR M. Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. **Stroke 34(5):**1304-10, 2003.

KIRSCH M, HOFMANN HD. Expression of ciliary neurotrophic factor receptor mRNA and protein in the early postnatal and adult rat nervous system. **Neurosci Lett.**, **180(2)**:163-166 1994. KOKOEVA MV, YIN H, FLIER JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. **Science**, **310**(**5748**):679-683, 2005.

KORDOWER JH, YAPING-CHU, MACLENNAN AJ. Ciliary neurotrophic factor receptor alphaimmunoreactivity in the monkey central nervous system. **J Comp Neurol.**, **377**(**3**):365-380, 1997. KUZIS K, ECKENSTEIN FP. Ciliary neurotrophic factor as a motor neuron trophic factor. **Perspect Dev Neurobiol.**, **4**(1):65-74, 1996.

KWON YW, GURNEY ME. Systemic injections of ciliary neurotrophic factor induce sprouting by adult motor neurons. **Neuroreport.**, **5**(7):789-792, 1994.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature. 227(5259)**:680-685, 1970.

LAMBERT PD, ANDERSON KD, SLEEMAN MW, WONG V, TAN J, HIJARUNGURU A, CORCORAN TL, MURRAY JD, THABET KE, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. **Proc Natl Acad Sci USA**, **98**(8):4279-4281, 2001.

LANGONE F, REZENDE ACS, ROGÉRIO F, CASTILHO R, PERONI D, SKAPER SD, NEGRO A. Ciliary neurotrophic factor fused with protein transduction domain has neuroprotective action without side effects. **Society for Neuroscience Abstracts**, **944.18**, 2004.

LEE MY, HOFMANN HD, KIRSCH M. Expression of ciliary neurotrophic factor receptor-alpha messenger RNA in neonatal and adult rat brain: an in situ hybridization study. **Neuroscience**, **77(1)**:233-246 1997.

LEE N, NEITZEL KL, DI MARCO A, LAUFER R, MACLENNAN AJ. Penetrating brain injury leads to activation of ciliary neurotrophic factor receptors. **Neurosci Lett.**, **374**(**3**):161-165, 2005.

LEGRADI G, EMERSON CH, AHIMA RS, RAND WM, FLIER JS, LECHAN RM. Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Neuroendocrinology**, **68**(2):89-97, 1998.

LILLIEN LE, SENDTNER M, ROHRER H, HUGHES SM, RAFF MC. Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1 astrocytes. **Neuron, 1(6)**:485-494 1988.

LIN LF, MISMER D, LILE JD, ARMES LG, BUTLER ET 3RD, VANNICE JL, COLLINS F. Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). Science, 246(4933):1023-1025 1989.

LINDQUIST JM, REHNMARK S. Ambient temperature regulation of apoptosis in brown adipose tissue. Erk1/2 promotes norepinephrine-dependent cell survival. J Biol Chem., 273(46):30147-30156, 1998.

LISSY NA, VAN DYK LF, BECKER-HAPAK M, VOCERO-AKBANI A, MENDLER JH, DOWDY SF. TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point. **Immunity. 8(1):**57-65, 1998.

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)**:621-630, 1996.

MANTHORPE M, SKAPER S, ADLER R, LANDA K, VARON S. Cholinergic neuronotrophic factors: fractionation properties of an extract from selected chick embryonic eye tissues. J Neurochem., 34(1):69-75, 1980.

MARTIN D, MERKEL E, TUCKER KK, MCMANAMAN JL, ALBERT D, RELTON J, RUSSELL DA. Cachectic effect of ciliary neurotrophic factor on innervated skeletal muscle. Am J Physiol., 271(5 Pt 2):R1422-1428, 1996.

MCDONALD NQ, HENDRICKSON WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. **Cell**, **73**(**3**):421-424 1993.

MILLER RG, BRYAN WW, DIETZ MA, MUNSAT TL, PETAJAN JH, SMITH SA, GOODPASTURE JC. Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology**, **47**(**5**):1329-1331, 1996b.

MILLER RG, PETAJAN JH, BRYAN WW, ARMON C, BAROHN RJ, GOODPASTURE JC, HOAGLAND RJ, PARRY GJ, ROSS MA, STROMATT SC. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. **Ann Neurol.**, **39**(2):256-260, 1996a.

MONVILLE C, COULPIER M, CONTI L, DE-FRAJA C, DREYFUS P, FAGES C, RICHE D, TARDY M, CATTANEO E, PESCHANSKI M. Ciliary neurotrophic factor may activate mature astrocytes via binding with the leukemia inhibitory factor receptor. **Mol Cell Neurosci., 17(2)**:373-384, 2001.

NAGAHARA H, VOCERO-AKBANI AM, SNYDER EL, HO A, LATHAM DG, LISSY NA, BECKER-HAPAK M, EZHEVSKY SA, DOWDY SF. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. **Nat Med.**, **4**(12):1449-1452, 1998.

NEDERGAARD J, GOLOZOUBOVA V, MATTHIAS A, ASADI A, JACOBSSON A, CANNON B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. **Biochim Biophys Acta. 1504(1)**:82-106, 2001.

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):289-294 1991.

NOWELL MA, RICHARDS PJ, HORIUCHI S, YAMAMOTO N, ROSE-JOHN S, TOPLEY N, WILLIAMS AS, JONES SA. Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. **J Immunol.**, **171**(6):3202-3209, 2003.

OTT V, FASSHAUER M, DALSKI A, KLEIN HH, KLEIN J. Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis. J Endocrinol., 173(2):R1-8, 2002.

OZOG MA, BERNIER SM, BATES DC, CHATTERJEE B, LO CW, NAUS CC. The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. **Mol Biol Cell.**, **15**(11):4761-4774 2004.

PAN W, KASTIN AJ, MANESS LM, BRENNAN JM. Saturable entry of ciliary neurotrophic factor into brain. **Neurosci Lett.**, **263**(1):69-71, 1999.

PELLEYMOUNTER MA, CULLEN MJ, BAKER MB, HECHT R, WINTERS D, BOONE T, COLLINS F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, **269**(**5223**):540-543, 1995.

PENN RD, KROIN JS, YORK MM, CEDARBAUM JM. Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). **Neurosurgery**, **40**(1):94-99; discussion 99-100, 1997.

PU S, DHILLON H, MOLDAWER LL, KALRA PS, KALRA SP. Neuropeptide Y counteracts the anorectic and weight reducing effects of ciliary neurotropic factor. **J Neuroendocrinol.**, **12**(9):827-832, 2000.

QIAN H, AZAIN MJ, COMPTON MM, HARTZELL DL, HAUSMAN GJ, BAILE CA. Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis. **Endocrinology**, **139**(2):791-794, 1998.

RENDE M, MUIR D, RUOSLAHTI E, HAGG T, VARON S, MANTHORPE M. Immunolocalization of ciliary neuronotrophic factor in adult rat sciatic nerve. **Glia**, **5**(1):25-32 1992.

REZENDE, ACS. Estudo comparativo da ação neurotrófica do CNTF e Tat-CNTF sobre motoneurônios de ratos neonatos após axotomia periférica. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, IB, UNICAMP, Campinas. 2005.

SCARPACE PJ, MATHENY M. Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. **Am J Physiol.**, **275**(**2 Pt 1**):E259-264, 1998.

SCHWARTZ MW, WOODS SC, PORTE D, SEELEY RJ, BASKIN DG. Central nervous system control of food intake. **Nature**, **404**(**6778**):661-671, 2000.

SCHWARZE SR, DOWDY SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. **Trends Pharmacol Sci. 21(2):**45-48, 2000.

SCHWARZE SR, HO A, VOCERO-AKBANI A, DOWDY SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. **Science. 285(5433)**:1569-1572, 1999.

SENDTNER M, DITTRICH F, HUGHES RA, THOENEN H. Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. J Neurol Sci., 124 Suppl:77-83, 1994.

SENDTNER M, KREUTZBERG GW, THOENEN H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. **Nature**, **345**(6274):440-441, 1990.

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):502-504, 1992a.

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):139-148, 1992b.

SHAPIRO L, ZHANG XX, RUPP RG, WOLFF SM, DINARELLO CA. Ciliary neurotrophic factor is an endogenous pyrogen. **Proc Natl Acad Sci USA 90(18)**:8614-8618, 1993.

SMITH GM, RABINOVSKY ED, MCMANAMAN JL, SHINE HD. Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury. **Exp Neurol.**, **121**(2):239-247, 1993.

SQUINTO SP, ALDRICH TH, LINDSAY RM, MORRISSEY DM, PANAYOTATOS N, BIANCO SM, FURTH ME, YANCOPOULOS GD. Identification of functional receptors for ciliary neurotrophic factor on neuronal cell lines and primary neurons. **Neuron**, **5**(**6**):757-766 1990.

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.

STEINBERG GR, WATT MJ, FAM BC, PROIETTO J, ANDRIKOPOULOS S, ALLEN AM, FEBBRAIO MA, KEMP BE. Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. **Endocrinology**, **147(8)**:3906-39014, 2006.

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**):447-459 1991.

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)**:920-923 1989.

TAN SA, DEGLON N, ZURN AD, BAETGE EE, BAMBER B, KATO AC, AEBISCHER P. Rescue of motoneurons from axotomy-induced cell death by polymer encapsulated cells genetically engineered to release CNTF. **Cell Transplant.**, **5**(5):577-587, 1996.

TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X, DENG N, CULPEPPER J, DEVOS R, RICHARDS GJ, CAMPFIELD LA, CLARK FT, DEEDS J, MUIR C, SANKER S, MORIARTY A, MOORE KJ, SMUTKO JS, MAYS GG, WOOL EA, MONROE CA, TEPPER RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, **83**(7):1263-1271, 1995.

THALER CD, SUHR L, IP N, KATZ DM. Leukemia inhibitory factor and neurotrophins support overlapping populations of rat nodose sensory neurons in culture. **Dev Biol., 161(2)**:338-344 1994. 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.

TOWBIN H, STAEHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A 76(9)**:4350-4354, 1979.

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):5865-5869, 1995.

XU B, DUBE MG, KALRA PS, FARMERIE WG, KAIBARA A, MOLDAWER LL, MARTIN D, KALRA SP. Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotropic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin. **Endocrinology**, **139**(2):466-473, 1998.

ZHANG F, RICHARDSON PM, HOLLAND DP, GUO Q, TATTON WG. CNTF or (-)-deprenyl in immature rats: survival of axotomized facial motoneurons and weight loss. J Neurosci Res., 40(4):564-570, 1995.

ZHANG JG, ZHANG Y, OWCZAREK CM, WARD LD, MORITZ RL, SIMPSON RJ, YASUKAWA K, NICOLA NA. Identification and characterization of two distinct truncated forms of gp130 and a soluble form of leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain in normal human urine and plasma. **J Biol Chem.**, **273**(17):10798-10805 1998.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de mestrado intitulada <u>Propriedades funcionais do fator neurotrófico ciliar associado a um domínio</u> de translocação de proteína: Análise de seus efeitos sobre regiões hipotalâmicas reguladoras do metabolismo energético_:

() não se enquadra no Artigo 1°, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº_____), intitulado

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo n° 878-2).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo n°_____).

Aluno AMBACH VIEIRA ANDOS Orientador

Prof. FRANCESCO LANGONE

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

 (χ) Deferido () Indeferido

Nome: Função:

Profa-Dra. ANA MARIA A. GUARALDO Presidente Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/IB - UNICAMP

51