



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANDRÉ SCHWAMBACH VIEIRA

**Papel da Janus Quinase 2 expressa em tecido nervoso na
hiperalgesia inflamatória**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
André Schwambach Vieira
C. Amilcar Parada
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V673p Vieira, André Schwambach, 1982-
Papel da Janus Quinase 2 expressa em tecido nervoso na hiperalgesia inflamatória / André Schwambach Vieira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Carlos Amilcar Parada.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hiperalgesia. 2. Inflamação. 3. Janus Quinase 2.
4. Dinoprostona. I. Parada, Carlos Amilcar, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Role of neural tissue expressed Janus Kinase 2 in inflammatory hyperalgesia

Palavras-chave em Inglês:

Hyperalgesia

Inflammation

Janus Kinase 2

Dinoprostone

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Luana Fisher

Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

Fábio Papes

Fábio Rogério

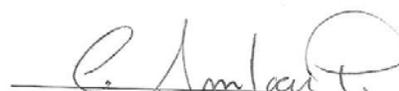
Data da defesa: 30-03-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 30 de Março de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Luana Fischer


Assinatura

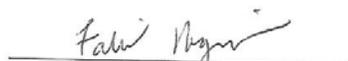
Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues


Assinatura

Prof. Dr. Fabio Papes


Assinatura

Prof. Dr. Fábio Rogério


Assinatura

Profa. Dra. Maria Claudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Assinatura

Profa. Dra. Yara Cury

Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Assinatura

Agradecimentos

Agradeço ao professor Francesco Langone, a quem devo grande parte de minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Um grande amigo que nos deixou cedo demais.

Agradeço à Maria, por sempre estar ao meu lado, por seu apoio essencial nos momentos mais difíceis. E também por compartilhar as realizações e alegrias durante estes anos.

Agradeço a meus pais e meu irmão pelo apoio incondicional, pelo amor e pelo carinho.

Agradeço ao professor Parada pelo acolhimento, ajuda, orientação que eu e todos os ex-alunos do professor Francesco recebemos em um momento tão difícil. Sem sua ajuda, seguir em frente teria sido muito mais difícil.

Agradeço a Elayne e a Dionéia pela enorme força que deram nesta tese, a convivência, o carinho e o companheirismo.

Agradeço aos ex-alunos do professor Francesco, Alexandre, César, Fábio, Gustavo, Carlos Vinícius, Raffinha, Karina e Janice pelo apoio mútuo, amizade e convivência.

Agradeço os colegas de laboratório Fipo, Maria Claudia, Juliana, Ivan, Paulinha pela convivência, amizade e companheirismo.

INDÍCE

Resumo	1
Abstract.....	2
Abreviaturas	3
Introdução.....	4
Manuscrito submetido para publicação “ <i>Role of nervous tissue expressed janus kinase 2 in inflammatory hyperalgesia</i> ”	12
Discussão	31
Conclusões.....	39
Bibliografia.....	40
Anexo	45

Resumo

A hiperalgesia inflamatória resulta da sensibilização de nociceptores aferentes periféricos induzida por mediadores inflamatórios. A prostaglandina E2 (PGE2) é uma das principais moléculas sinalizadoras envolvidas na hiperalgesia, sendo capaz de agir diretamente em nociceptores, induzindo mudanças nas propriedades de transdução sensorial destas células. A Janus Quinase 2 (JAK2) é uma molécula sinalizadora intracelular geralmente associada ao mecanismo de ação de citocinas, sendo que sua atividade pode ser induzida em nociceptores após uma inflamação periférica. Entretanto, não existem evidências do envolvimento direto da JAK2 na sensibilização de nociceptores mediada pela PGE2. Assim o objetivo deste trabalho foi de explorar o possível papel da JAK2 na sensibilização mediada pela PGE2. Em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) em cultura foi observado que a PGE2 altera o influxo de cálcio induzido pela capsaicina, e a pré-incubação das células com o inibidor seletivo da JAK2, AG490, foi capaz de bloquear este efeito. Adicionalmente, a administração intratecal de AG490 em ratos reduziu a hiperalgesia induzida pela administração subcutânea e local de PGE2 ou carragenina. A administração intratecal de AG490 também bloqueou a ativação da PKCepsilon induzida no DRG L5 ipsilateral após inflamação na pata. Em conclusão o presente trabalho demonstra que a JAK2 expressa no DRG pode possuir um papel na sensibilização de nociceptores induzida por um evento inflamatório periférico. Desta forma a inibição da JAK2 pode ser um novo alvo farmacológico para o controle da hiperalgesia inflamatória.

Abstract

Inflammatory hyperalgesia results from the sensitization of peripheral afferent nociceptors by inflammatory mediators. Prostaglandin E2 (PGE2) is one of the major signaling molecules involved in hyperalgesia, being able to act directly on nociceptors, inducing sensitization. The Janus Kinase 2 (JAK2) is an intracellular signaling molecule generally associated with cytokines signaling pathway, and its activity can be increased in nociceptors after peripheral inflammation. However, there are no evidences about the role JAK2 directly plays in PGE2-induced sensitization of nociceptors. Therefore, the aim of the present study was to explore a possible role for JAK2 in PGE2 mediated sensitization. The data of this study showed in cultured dorsal root ganglion (DRG) neurons, that the administration of PGE2 alters capsaicin-induced calcium transients, and the pre-incubation of the cells with the JAK2 selective inhibitor AG490 blocks this effect. In addition, the intrathecal administration of AG490 in rats reduces the hyperalgesia induced by local administration of PGE2 or carrageenan in the hindpaw. AG490 intrathecal administration also blocks PKCepsilon activation in the ipsilateral L5 DRG induced by inflammation of peripheral tissue. In conclusion, the present study indicates that the JAK2 expressed in the DRG may have a role in the sensitization of nociceptors by a peripheral inflammatory event. Moreover, the inhibition of JAK2 may be a possible novel pharmacological target for the control of the inflammatory hyperalgesia.

Abreviaturas

COX, Ciclooxygenase;

DAG, 1,2-diacil-glicerol

DRG, Gânglio da Raiz Dorsal

EP, Receptor para prostaglandina

IP3, 1,4,5-trifosfato de inositol

IRS, Substrato do receptor de insulina

JAK2, Janus quinase 2;

NSAID, anti-inflamatórios não esteroidais;

PDK1, Proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítídeo 1

PGE2, Prostaglandina E2;

PI3K, fosfoinosítídeo 3 quinase

PKA, Proteína quinase A;

PKC, Proteína quinase C;

STAT3, Transdutor de sinal e ativador de transcrição (*Signaling Transducer and Activator of Transduction 3*)

TRP, Potencial receptor transitório (*Transient Receptor Potential*)

TRPV1, Canal potencial receptor transitório vaniloide 1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*)

Introdução

Introdução

A inflamação consiste em um padrão de resposta estereotipado do organismo a uma lesão ou processo infeccioso. Já no século I DC, o médico romano Celsus descreveu o processo inflamatório como contendo quatro sinais cardinais: *rubor* (vermelhidão), *tumor* (inchaço), *calor* (aumento local de temperatura) e *dolor* (dor). Em meados do século 19 um quinto sinal cardinal da inflamação passou a ser incorporado nesta descrição por Rudolf Virchow: *Functio laesa* (perda de função da região ou órgão afetado pelo processo inflamatório). Três dos sinais cardinais da inflamação; vermelhidão, inchaço e aumento de temperatura; derivam do aumento de fluxo sanguíneo e da permeabilidade da vasculatura. Ao passo que o sinal cardinal dor está relacionado a mudanças no sistema sensorial relacionado a esta percepção (Ferreira, 1972; Libby, 2007).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial” ou ainda como “uma experiência sensorial e emocional que pode ser descrita em termos de tal dano”. Já a nocicepção pode ser definida como o processamento neural de estímulos nociceptivos, aqueles capazes de, ou que possuem potencial de causar dano a um tecido normal (<http://www.iasp-pain.org>).

A divisão sensorial somática e visceral do sistema nervoso contém neurônios periféricos, pseudo-unipolares, cujos corpos celulares se encontram nos gânglios da raiz dorsal, próximos à medula espinhal, e nos gânglios dos nervos cranianos. Estes neurônios possuem um prolongamento central, que faz contato com neurônios do sistema nervoso central e um prolongamento periférico que irá inervar a pele ou as vísceras. Os prolongamentos destes neurônios sensoriais possuem ampla variação de calibre e

velocidade de condução de impulsos nervosos, podendo ser encontradas fibras de grande calibre e mielinizadas, possuindo alta velocidade de condução (A β), fibras de pequeno calibre e mielinizadas, possuindo velocidade de condução intermediária (A δ) e ainda fibras de pequeno calibre e amielínicas, possuindo baixa velocidade de condução (C). As terminações periféricas destas células são capazes de realizar a transdução de estímulos sensoriais térmicos, mecânicos e nociceptivos na pele e nas vísceras, ou seja, são capazes de converter estes estímulos sensoriais em sinais elétricos. Os estímulos nociceptivos são transduzidos por neurônios que possuem prolongamentos do tipo A δ e C, sendo estas células denominadas nociceptores (Millan 1999).

A capacidade dos nociceptores de realizar a transdução de estímulos nociceptivos se deve ao fato de estas células expressarem nos seus terminais periféricos canais iônicos sensíveis a estímulos mecânicos e térmicos de alta intensidade, além de canais sensíveis a alterações de pH, e sensíveis a algumas moléculas exógenas como a formalina (Eid e Cortright 2009). Uma importante família de canais iônicos envolvidos na transdução de estímulos nociceptivos é a dos canais potencial receptor transitório (TRPs, do inglês *Transient Receptor Potential*). Os canais TRPs são normalmente canais catiônicos não seletivos, que uma vez abertos permitem grande influxo de sódio e cálcio, resultando em despolarização dos neurônios que os contém (Eid e Cortright 2009). Um exemplo da participação de proteínas da família TRP na transdução de estímulos nociceptivos pode ser ilustrado pelos canais potencial receptor transitório vaniloide 1 (TRPV1, do inglês *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*). Os canais TRPV1 são expressos nos terminais periféricos dos nociceptores e se abrem em consequência de um aumento de temperatura, superior a 40°C, ou redução do pH do meio extracelular, gerando assim um grande influxo de sódio e cálcio, despolarizando o neurônio e elevando os níveis intracelulares de cálcio

(Caterina e cols., 1997). É interessante notar que algumas moléculas exógenas ao organismo podem se ligar e ativar canais TRP, sendo um exemplo disso a capsaicina, composto presente nas pimentas do gênero *Capsicum* responsável pela sensação de ardência típica. A capsaicina se liga ao receptor TRPV1, desencadeando sua abertura e conseqüente despolarização e influxo de cálcio nos neurônios que expressam este receptor (Caterina e cols., 1997). Diversos outros canais TRP também são expressos em nociceptores e compartilham com o TRPV1 mecanismos semelhantes de transdução sensorial (Eid e Cortright 2009). Porém estes outros canais podem ser sensíveis a diferentes tipos estímulos nociceptivos como temperaturas muito baixas (TRPM8) ou a presença de moléculas exógenas irritantes como a formalina (TRPA1) (Eid e Cortright 2009).

Os estímulos nociceptivos são convertidos em potenciais receptores pelos canais iônicos presentes nos terminais periféricos dos nociceptores. Canais de sódio sensíveis a voltagem próximos a estes terminais são responsáveis por gerar potenciais de ação que são conduzidos no nociceptor até sua sinapse com um neurônio de segunda ordem presente na medula espinhal, no caso de nociceptores presentes nos gânglios da raiz dorsal, ou um neurônio de segunda ordem presente no tronco encefálico, no caso de nociceptores presentes nos gânglios dos nervos cranianos. As informações nociceptivas acabam sendo integradas em circuitos locais na medula e no tronco encefálico, participando, por exemplo, de reflexos de retirada de membro frente a um estímulo nocivo. Além disso, os neurônios de segunda ordem, que recebem sinapses diretamente dos nociceptores, se projetam para: estruturas do tronco encefálico envolvidas no controle descendente do processamento nociceptivo como a substância cinzenta periaquedutal; a formação reticular no tronco encefálico, sendo esta informação integrada principalmente no controle do nível de atenção e vigília; o tálamo, estrutura a partir da qual a informação nociceptiva é retransmitida para o

córtex sensorial primário, sendo o processamento da informação nesta região importante para a discriminação e localização do estímulo nociceptivo, e para estruturas do sistema límbico envolvidos no processamento do componente afetivo associado ao estímulo nociceptivo (Millan 1999).

Uma característica importante do sistema neural envolvido no processamento da informação nociceptiva é a alteração do seu padrão de atividade quando há uma inflamação. Durante um processo inflamatório os nociceptores, principalmente aqueles que são classificados morfológicamente como fibras C, são sensibilizados, passando a responder mais intensamente a estímulos nociceptivos. Além disso, estes neurônios também apresentam, nesta situação, uma redução no seu limiar de ativação, ou seja, passam a responder a estímulos sensoriais de menor intensidade, incluindo estímulos não nociceptivos. O conjunto destas alterações desencadeadas pelo processo inflamatório, e que resulta em uma sensibilização dos nociceptores, é evidenciado pela hiperalgesia inflamatória (Ferreira 1972, Millan 1999).

Para a expressão de todas as características relacionadas ao processo inflamatório, diversas células do tecido afetado e do sistema imune são recrutadas, ou necessitam atuar em coordenação. Assim a orquestração dos diversos participante do processo inflamatório está associada com a síntese e liberação de uma grande e variada quantidade de moléculas sinalizadoras, tais como citocinas, aminas simpatomiméticas e prostanóides (Narumiya S. e cols., 1999; Serhan e Savill 2005).

Dentre estas diversas classes de moléculas sinalizadoras é possível destacar os prostanóides, grupo de moléculas constituído pelas prostaglandinas e pelos tromboxanos. Os prostanóides são sintetizados a partir de ácidos graxos não saturados de 20 carbonos por uma reação catalizada pela enzima ciclooxigenase (COX), sendo o ácido araquidônico o

precursor de prostanóides mais abundante em diversos mamíferos (Narumiya e cols., 1999). Especificamente em relação à hiperalgesia, diversos modelos experimentais demonstram que a administração de prostanóides é capaz de desencadear a sensibilização de nociceptores, sendo o maior efeito biológico apresentado pela PGE1, PGE2 e PGI2 (Narumiya S, e cols., 1999). Além disso, a inibição da atividade da COX, o que resulta em um bloqueio na produção de prostaglandinas, é capaz de inibir a hiperalgesia inflamatória, sendo este mecanismo a forma como atuam diversos fármacos antiinflamatórios, como a aspirina (Ferreira 1972, Millan 1999).

A PGE2 é capaz de atuar diretamente nos nociceptores, ativando vias de sinalização celular que resultam na mudança do padrão de resposta destes neurônios à estimulação sensorial (Martin e cols., 1987; Lopshire e cols., 1998; Cunha e cols., 2005). O receptor para a PGE2 é uma proteína transmembrana que está associada a uma proteína G. Este receptor possui quatro isoformas, EPs 1, 2, 3 e 4, sendo todas encontradas nos nociceptores primários (Donaldson e cols., 2001). O receptor EP1 está associado a uma proteína G da classe G_q , assim a ativação deste receptor leva à estimulação da fosfolipase C gerando a produção dos segundo mensageiros 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) e 1,2-diacil-glicerol (DAG). Os receptores EP2 e EP4 por sua vez estão associados a uma proteína G da classe G_s , resultando que a ativação destes receptores desencadeia a estimulação da adenilato ciclase, induzindo assim o aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico. Finalmente, o receptor EP3 está associado a um proteína G da classe G_i , desta forma a ativação deste receptor leva à inibição da adenilato ciclase, reduzindo assim os níveis intracelulares de AMP cíclico (Kedzie e cols., 1998).

A ação da PGE2 nos nociceptores, através de seus receptores EP1, 2 e 4, acaba resultando no aumento dos níveis dos segundo mensageiros intracelulares AMP cíclico, IP3

e DAG. O aumento dos níveis de AMP cíclico desencadeia a ativação das proteínas quinase A (PKA), ao passo que o aumento dos níveis de DAG desencadeia a ativação, nos nociceptores, da isoforma epsilon da proteína quinase C (PKCepsilon) (Southall e Vasko 2001; Aley e cols., 2000). Nos nociceptores, a ativação da PKA e PKCepsilon resulta na fosforilação de canais iônicos envolvidos na transdução de sinais sensoriais, resultando em uma redução no limiar de abertura de tais canais. Um exemplo deste fenômeno é a fosforilação do TRPV1 e a conseqüente redução de seu limiar de abertura para temperaturas próximas a 37°C (Bhave e cols., 2003). A PKA e PKCepsilon também são capazes de fosforilar canais iônicos envolvidos na geração e propagação de potenciais de ação, como canais de sódio e potássio dependentes de voltagem, resultando assim em uma redução no limiar de geração de potenciais de ação e aumento na frequência de potenciais gerados frente a um mesmo estímulo sensorial (Cang e cols., 2009; Nicol e cols., 1997).

Outra classe de moléculas sinalizadoras relacionadas ao processo inflamatório são as citocinas da família da interleucina-6 (IL6). Estas citocinas pró-inflamatórias são peptídeos hidrossolúveis que se ligam a um receptor específico presente na membrana celular, sendo este receptor normalmente conjugado a uma quinase intracelular. A Janus Quinase 2 (JAK2) é um exemplo de quinase intracelular comumente associada aos receptores para citocinas da família da IL-6, e uma vez ativada, a JAK2 é capaz de se associar, e fosforilar, uma proteína da classe das Sinalizadoras de Transdução e Ativadoras de Transcrição (STATs) como a STAT3. A STAT3 por sua vez, é capaz de migrar para o núcleo da célula, podendo então regular a expressão de diversos genes (Stahl e cols., 1994; Boulton e cols., 1995). A JAK2 também é capaz de, após ativação, fosforilar outros substratos, induzindo a ativação de outras vias de sinalização intracelular como a via das kinases ativadas por mitógenos (MAPKs) ou das fosfoinositídeos 3 quinases (PI3K). A ativação de tais vias de

sinalização também são capazes de alterar, através de fosforilação, a função de diversas proteínas intracelulares, bem como são capazes de alterar o padrão de expressão gênica (Rane e Reddy 2000).

No contexto da hiperalgesia, a ativação da via de sinalização JAK2/STAT3 pode ser observada no gânglio da raiz dorsal após a inflamação do tecido periférico (Tamura e cols., 2005). Em modelos experimentais que envolvem a lesão de nervos periféricos, a ativação da via JAK2/STAT3 é observada em células gliais da medula espinhal, e está associada com a indução de hiperalgesia na região inervada pelo nervo afetado pela lesão. Além disso, nestes experimentos, o bloqueio da via de sinalização JAK2/STAT3 utilizando-se um inibidor seletivo da JAK2, o composto AG490, foi capaz de reduzir a hiperalgesia associada à lesão do nervo periférico (Dominguez et al, 2008; Dominguez et al., 2010).

Até o presente momento, não existem evidências que associem diretamente a JAK2 na sensibilização de nociceptores mediado pela PGE2. O pico da sensibilização induzida pela administração subcutânea de PGE2 em ratos ocorre após 3 horas, ao passo que o pico de fosforilação da STAT3 no gânglio da raiz dorsal é observado apenas 24 horas após uma inflamação periférica (Tamura et al., 2005). Considerando-se que a JAK2 é expressa no tecido nervoso que contém nociceptores e que sua ativação é observada em algumas situações em que há a hiperalgesia, o objetivo do presente trabalho foi explorar um possível papel da JAK2 na sensibilização induzida pela PGE2. Para este fim foi utilizado um inibidor seletivo da JAK2, o AG490, em células do gânglio da raiz dorsal em cultura e através de administração intratecal em ratos.

Manuscrito submetido para publicação no periódico PAIN

Neuronal Janus Kinase 2 activation participates of Prostaglandin E₂-induced hyperalgesia

André Schwambach Vieira^a, Dionéia Araldi^a, Elayne Vieira Dias^a, Filipe César do Prado^a,
Claudia Herrera Tambeli^a, Carlos Amilcar Parada^{a,*}

^aDepartamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Number of pages: 19

* Corresponding author:

Carlos Amilcar Parada

Department of Physiology & Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Phone.: +55 19 35216195; Fax: +55 19 35216185

e-mail address: caparada@unicamp.br

1. Introduction

Tissue inflammation is associated with the synthesis and release of different signaling molecules, such as cytokines, sympathetic amines and prostanoids [25]. Many of these molecules act on nociceptors inducing hyperalgesia, an increase in the response to noxious stimulus [19]. Prostaglandin E2 (PGE₂) is considered one of the major inflammatory mediators involved in hyperalgesia and the inhibition of its production is the mechanism of action of many non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) [9]. NSAIDs, like aspirin, inhibit the activity of Cyclooxygenase enzymes (COX), which synthesize PGE₂, therefore reducing the synthesis of this inflammatory mediator [9].

PGE₂ acts directly on primary afferent nociceptors, triggering signaling pathways that result in sensitization and the subsequent hyperalgesia [14,16]. The receptor for PGE₂ is a G-protein coupled transmembrane protein that has four different isoforms, EPs 1, 2, 3 and 4, all of which are expressed in primary afferent neurons [8]. PGE₂-induced hyperalgesia depends on PKA and PKCε signaling pathways downstream of EP receptor activation [1,26]. In primary afferent neurons, the activation of PKA and PKCε results in phosphorylation of ion channels involved in signaling transduction, such as the capsaicin sensitive vanilloid receptor TRPV1 [2], and ion channels involved in action potential generation and conduction, such as sodium and potassium voltage gated channels [4,20].

The Janus Kinase 2 (JAK2) is an intracellular kinase that is associated with pro-inflammatory cytokines receptors complexes, such as Interleukine 6 [27]. Once activated, JAK2 associates to, and phosphorylates, many substrates such as the Signaling Transducer

and Activator of Transduction 3 (STAT3) that migrate to the nucleus, changing gene expression [3]. In primary afferent neurons, the activation of JAK2/STAT3 signaling pathway is observed after peripheral inflammation [28], and nerve injury, in which it has been associated with the induction of a neuropathic phenotype [6,7].

To date, there are no evidences of any JAKs directly participating in PGE2 mediated sensitization of primary afferent neurons. Since JAK family of kinases members, such as JAK2, are expressed and have a functional role in primary afferent neurons, the aim of the present study was to explore a possible role for JAKs in PGE2 mediated sensitization through the use of the JAK inhibitor AG490 in cultured dorsal root ganglion cells and by dosing AG490 via intrathecal administration to adult Wistar rats..

2. Experimental Procedures

2.1. Animals

Fifty ten-week-old male Wistar rats weighting about 300 g and three twenty-one-days-old male Wistar rats were obtained from the University of Campinas Multidisciplinary Center for Biological Investigation in Laboratory Animal Science (CEMIB). Rats were housed in plastic cages in a ventilated rack (Alesco model 3 9902.001) with a 12 h light–dark cycle at $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Animals had ad libitum access to standard rodent chow and water throughout. All experiments were conducted in accordance with the principles and procedures described by the NIH Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals, also in accordance to the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP, and were

approved by the State University of Campinas Committee of Animal Care (Protocols CEEA-UNICAMP 2396-1).

2.2. DRG cultures

For DRG cultures, 21-days-old male Wistar rats were anaesthetized with xylazine (27 mg/kg, i.p.) and ketamine (100 mg/kg, i.p.), after deep anesthesia was confirmed by absence of corneal and pedal reflex, rats were perfused transcardially with modified ice-cold Hank's balanced salt solution – HBSS (Na₂HPO₄ 0.338 mM; NaCl 137,93 mM; NaHCO₃ 4,17 mM; KH₂PO₄ 0,441 mM; KCl 5,33 mM; no calcium and no magnesium, buffered with 10mM HEPES to pH 7.4). Subsequently a laminectomy was done and 20 DRGs were carefully dissected and placed in the same ice-cold Hank's solution used in the transcardial perfusion. DRGs were incubated for 1h in 0.5% Type 2 Collagenase (Sigma, USA - C6885) diluted in HEPES buffered HBSS at 37°C (Na₂HPO₄ 0.338 mM; NaCl 137,93 mM; NaHCO₃ 4,17 mM; KH₂PO₄ 0,441 mM; KCl 5,33 mM; MgSO₄ 0,8 mM; CaCl₂ 1,26 mM), followed by 10 minutes incubation in 0.1% Trypsin (Sigma, USA - T0303) diluted in HEPES buffered HBSS at 37°C. DRGs were resuspended in 1ml of DMEM containing 10% Fetal Calf Serum and mechanically dispersed using fire polished glass pipets (0.5 mm internal diameter). Cellular debris were removed by centrifugation in a Percoll gradient [15]. Cells were plated in Mattek 35mm glass bottom dishes (Mattek, Germany) pre-coated with laminin and poly-d-lysine and kept in a CO₂ incubator at 37°C, 5% CO₂ atmosphere for at least 12h prior to calcium experiments.

2.3. Calcium imaging

DRG cells were incubated for 1h at 37°C in hepes buffered HBSS containing 100µM AG490 (stock solution in DMSO, final DMSO concentration in HBSS 0.1%) or 0.1% DMSO. DRG cell were than incubated for 30 minutes, at room temperature, in HBSS containing 5µM Fluo4-AM (Invitrogen, USA), 1% powerload (Invitrogen, USA) and 100uM AG490 or 0.1% DMSO. Subsequently, cells were incubated for 30 minutes at room temperature, in HBSS containing 100µM AG490 or 0.1% DMSO. A perfusion chamber (Warner Instrument, USA) was inserted in the 35mm plate containing the DRG cells and were moved to an inverted microscope (Leica DMI6000) equipped with eppifluorescence illumination (480nm excitation, 527/30nm supression filters) and a digital camera (Leica, Germany). A computer controlled valve system (Warner Instruments, USA) was used for cell perfusion with different drugs and the flow rate was of 5 ml/minute (complete change of chamber volume every 2 seconds). Images were taken at the rate of 1 image per second and data is composed of cell relative fluorescence over time. Results were also expressed as the ratio between the second and the first capsaicin induced fluorescence peak.

2.4. Behavioral experiments

Ten-weeks-days-old male Wistar rats were briefly anesthetized by isoflurane inhalation. For intrathecal administration the technique described by Mestre et al., 1994 [17], was employed. Rats received an intrathecal administration of 1µg of AG490 diluted in saline (final DMSO concentration 1%) or saline containing 1% DMSO. For the measurement of mechanical hyperalgesia, the method electronic pressure-meter test for rats was used as

described by Vivancos et al. 2004 [29]. Twenty minutes after the intrathecal administration, the basal mechanical withdraw threshold of the right hind paw was determined. Subsequently rats received, in the right hind paw, an intraplantar administration of 100ng of PGE2 or 100µg of carrageenan, all drugs diluted in 0.9% sodium chloride solution. The mechanical withdraw threshold was measured again three hours after the intraplantar administration. The magnitude of hyperalgesia was expressed as the difference between the baseline values from the ones measured three hours after carrageenan injection. Immediately after the behavioral procedures, rats were killed by decapitation and the right and left L5 DRGs were carefully removed and frozen in liquid nitrogen for further use.

2.5. Analysis of PKCepsilon translocation by western blot

For the analysis of PKCepsilon translocation to a membrane enriched fraction, the protocol described by Young et al., 2002, [31] was employed with minor modifications. Previously stored L5 DRG samples were homogenized with an ultrasonic homogenizer (Sonic Corporation, USA), in a buffer containing 50 mM Phosphate Buffer, pH 7.4, 0.32 M sucrose, 1mM EDTA, 1% complete protease inhibitor cocktail (Sigma, USA - P8340), at 4°C. The homogenate was centrifuged at 100g for 5 minutes, at 4°C. The resulting supernatant was transferred to a new tube and was centrifuged at 20,000g for 30 minutes, at 4°C. The supernatant was removed, and the pellet, that consisted in a membrane enriched fraction, was resuspended in a buffer containing 1% Triton X-100, 50 mM Phosphate Buffer, pH 7.4, 0.32 M sucrose, 1mM EDTA, 1% complete protease inhibitor cocktail (Sigma, USA - P8340), at 4°C. After 20 minutes incubation at 4°C, the membrane enriched

fraction was centrifuged at 12,000g for 15 minutes at 4°C, and the resulting supernatant was transferred to a new tube. Protein concentration was determined by the Bradford method, and 35µg of total proteins from each sample were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes according to standard techniques. Membranes were stained with Ponceau S, and digital images were acquired for the control of protein loading by densitometric analysis [23]. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk solution in PBS containing 0,1% tween-20, and incubated overnight with anti-PKCepsilon (1:1000 Santa Cruz, USA – sc-214), followed by HRP conjugated secondary antibody (Zymed, 1:10000). Reactive bands were detected with the SuperSignal West Pico chemiluminescent kit. Results are expressed as the ratio between PKCepsilon and the corresponding Ponceau S optical densities.

2.6. Statistical analysis

On calcium imaging experiments, an ANOVA followed by a Student-Newman-Keul's post-hoc test was used to analyze the effect of AG490 on the ratio between the second and the first capsaicin induced fluorescence peak. On behavioural experiments, an unpaired student T test was used to analyze the effect of intrathecal AG490 on the magnitude of carrageenan induced mechanical hyperalgesia. On western blot experiments, an ANOVA followed by a Student-Newman-Keul's post-hoc test was used to analyze the effect of AG490 on PKCepsilon translocation to a DRG membrane enriched fraction. Results are expressed as mean±S.E.M and the level of significance was considered $p < 0.05$.

3. Results

3.1. AG490 blocks PGE2 induced sensitization of cultured DRG nociceptors

The administrations of capsaicin (300nM 15s), a selective agonist of the TRPV1 receptor, to cultured DRG neurons induces a rise in intracellular calcium levels. In our experimental conditions, a second administration of capsaicin, after an interval of 5 minutes, leads to a reduced response due to desensitization of TRPV1 receptors (fig 1A). The administration of PGE2 (1 μ M) during the 5 minutes interval between the capsaicin administrations reverse this reduction followed by a second capsaicin administration (fig 1B). The pre-incubation of DRG cells with AG490 (100 μ M) blocked PGE2 effect on the capsaicin responsive cells (fig 1C). Population data is shown in figure 1D (n = 15 cells for each group).

3.2. Intrathecal administration of AG490 reduces inflammatory hyperalgesia

Three hours after the subcutaneous intraplantar administration of the inflammatory mediators PGE2 (100ng - Fig 2A, n = 10) or the inflammatory agent carrageenan (100 μ g – Fig 2B, n = 15) we observed a reduction in the rat paw withdraw threshold, as measured in the Electronic Von Frey test. The intrathecal administration of 1 μ g of AG490 twenty

minutes before the intraplantar administration of the tested drugs reduces the mechanical hyperalgesia.

3.3. Intrathecal administration of AG490 blocks PKCepsilon translocation in primary afferent neurons induced by inflammation in the peripheral tissue.

The analysis of PKCepsilon translocation to a membrane enriched fraction of the DRG demonstrates that the subcutaneous intraplantar administration of the inflammatory agent carrageenan (100µg) induces, after three hours, an increase in the amount of PKCepsilon present in this fraction. The intrathecal administration of 1µg of AG490 twenty minutes before the intraplantar administration of carrageenan blocked this increase in PKCepsilon present in the membrane enriched fraction (Fig3, n = 4).

4. Discussion

Inflammatory hyperalgesia results from plastic changes in nociceptors that are triggered by inflammatory mediators. A better understanding of the signaling pathways involved in this process may indicate novel pharmacological targets for the treatment of hyperalgesia. In the present study we demonstrate for the first time that the activity of nervous tissue expressed JAK2 is important for PGE2 mediated induction of hyperalgesia.

The pre-incubation of cultured DRG neurons with the JAK2 selective inhibitor AG490 blocked the ability of PGE2 to induce an increase of capsaicin evoked calcium transients. Capsaicin causes the opening of TRPV1 channels present in the cellular membrane, resulting in a great influx of sodium and calcium. Furthermore only small diameter primary sensory neurons that are involved in nociceptive transduction express TRPV1 [5]. Therefore we can assume that our *in vitro* assay has included exclusively TRPV1 expressing nociceptors. The use of two subsequent capsaicin administrations, and comparison of the peak to peak calcium transient relation, was necessary due to the variability in the magnitude of capsaicin responses of individual cultured neurons. With this strategy individual neurons are their own controls, reducing interneuron variability in the response to capsaicin.

Concerning PGE2 action on nociceptors, this prostanoid acts via a specific EP receptor, a G protein coupled receptor present in the cell membrane [8]. The activation of an EP receptor, coupled to a G_q containing G protein, by PGE2 increases intracellular levels of cAMP, which in turn activates PKA [26]. Furthermore, the actions of PGE2 also depend on the activity of PKCepsilon [1, 24]. In nociceptors, these kinases phosphorylate substrates like ion channels, that lead to PGE2 mediated sensitization [2, 4].

The PGE2 signaling pathway is not thought to be related with JAK2, however the inhibition of JAK2 reduces the activity of the PI3K [13]. It is noteworthy that the inhibition of PI3K reduces peripheral inflammation induced hyperalgesia [30]. Furthermore PI3K does associate and induces the activation of PKCepsilon [10]. Therefore, the reduction on JAK2 activity in the present study, may result in a reduction in PI3K, and as a consequence, in PKCepsilon activities.

Further supporting the above proposed mechanism, we demonstrate that the intrathecal administration of AG490 reduces hyperalgesia and is associated with a reduction of peripheral inflammation induced PKCepsilon translocation in the DRG. Others have demonstrated that the inhibition of PKCepsilon with selective antagonists is able to reduce inflammatory hyperalgesia [1,24,11]. Furthermore, PKCepsilon induces the phosphorylation of diverse substrates, such as ion channels involved in signaling transduction and channels involved in action potential generation and conduction, resulting in changes on nociceptors transduction of sensorial information [2, 4, 20]. Consequently, it is likely that the mechanism responsible for AG490 mediated reduction hyperalgesia after intrathecal administration is the inhibition of PKCepsilon activity on DRG cells, blocking the development of changes on nociceptors response pattern.

A possible concern regarding the present data is the selectivity of AG490 in the concentrations used in the *in vitro* and *in vivo* experiments. Initially AG490 was considered a specific inhibitor of JAK2 [18]. However, AG490 has some degree of inhibitory activity on other members of the Janus Kinase family, as JAK3 [12]. Even though the effects of AG490 observed in the present study could be attributed to the inhibition of other Janus Kinases, none of them are thought to be related with PGE2 signaling pathways.

It is worth mentioning that intrathecally administrated drugs act on the spinal cord and also on the DRG [21]. As a consequence we assume that the *in vivo* inhibition of JAK2 was restricted to these tissues. An inflammatory event in the periphery induces the local production of inflammatory mediators, such as PGE2, in the DRG and in the spinal cord [22]. It is conceivable that the activity of such mediators in the DRG ultimately leads to the activation and translocation PKCepsilon, which in turns induces the changes in nociceptors response [2, 4, 20]. Therefore, the inhibition of JAK2 activity in the DRG interfered with

these events, blocking the plastic changes that take place on the DRG, and that are necessary for the development of hyperalgesia.

In conclusion the present study indicates that the JAK2 expressed in the DRG plays a role in the sensitization of nociceptors in the peripheral tissue. Moreover, the inhibition of JAK2 may be a possible novel pharmacological target for the control of the inflammatory hyperalgesia.

5. Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq / Brazil. The authors declare to have no conflicts of interest.

6. References

- [1] Aley KO, Messing RO, Mochly-Rosen D, Levine JD. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J Neurosci* 2000;20:4680-4685.
- [2] Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12480-12485.
- [3] 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* 1995;92:6915-6919.
- [4] Cang CL, Zhang H, Zhang YQ, Zhao ZQ. PKCepsilon-dependent potentiation of TTX-resistant Nav1.8 current by neurokinin-1 receptor activation in rat dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain* 2009;5:33.
- [5] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-24.

- [6] Dominguez E, Mauborgne A, Mallet J, Desclaux M, Pohl M. SOCS3-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury. *Neurosci*. 2010;30:5754-5766.
- [7] Dominguez E, Rivat C, Pommier B, Mauborgne A, Pohl M. JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J Neurochem* 2008;107:50-60.
- [8] Donaldson LF, Hmphyrey PS, Oldfield S, Giblett S, Grubb B. Expression and regulation of prostaglandin E receptor subtype mRNAs in rat sensory ganglia and spinal cord in response to peripheral inflammation. *Prostaglandins* 2001;63:109-122.
- [9] Ferreira SH. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol*. 1972;102:200-203.
- [10] Gao J, Chang Chua C, Chen Z, Wang H, Xu X, C Hamdy R, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, Chua BH. Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43:601-609.
- [11] Khasar SG, Gold MS, Levine JD. A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. *Neurosci Lett*. 1998 Oct 30;256(1):17-20.
- [12] Kirken RA, Erwin RA, Taub D, Murphy WJ, Behbod F, Wang L, Pericle F, Farrar WL. Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *J Leukoc Biol*. 1999;65(6):891-9.
- [13] Lin KL, Su JC, Chien CM, Chuang PW, Chang LS, Lin SR. Down-regulation of the JAK2/PI3K-mediated signaling activation is involved in Taiwan cobra cardiotoxin III-induced apoptosis of human breast MDA-MB-231 cancer cells. *Toxicon*. 2010;55:1263-1273.
- [14] Lopshire JC, Nicol GD. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci* 1998;18:6081-6092.
- [15] Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc*. 2007;2:152-160.
- [16] Martin HA, Basbaum AI, Kwiat GC, Goetzl EJ, Levine JD. Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C- and A-delta mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. *Neuroscience* 1987;2:651-659.
- [17] Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1994;32:197-200.

- [18] Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature*. 1996;379(6566):645-8.
- [19] Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999;57:1-164.
- [20] Nicol GD, Vasko MR, Evans AR. Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 1997;77:167-176.
- [21] Pettersson CA. Drainage of molecules from subarachnoid space to spinal nerve roots and peripheral nerve of the rat. A study based on Evans blue-albumin and lanthanum as tracers. *Acta Neuropathol*. 1993;86:636-644.
- [22] Pham-Marcou TA, Beloeil H, Sun X, Gentili M, Yaici D, Benoit G, Benhamou D, Mazoit JX. Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment. *Pain*. 2008;140:274-283.
- [23] Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*. 2010;401:318-320.
- [24] Sachs D, Villarreal C, Cunha F, Parada C, Ferreira SH. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. *Br J Pharmacol*. 2009;156:826-834.
- [25] Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005;12:1191-1197.
- [26] Southall MD, Vasko MR. Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4, mediate the prostaglandin E2-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. *J Biol Chem* 2001;276:16083-16091.
- [27] Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, Ihle JN, Yancopoulos GD. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 1994;263:92-95.
- [28] Tamura S, Morikawa Y, Senba E. Up-regulated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 and cyclic AMP-responsive element binding protein by peripheral inflammation in primary afferent neurons possibly through oncostatin M receptor. *Neuroscience*. 2005;133:797-806
- [29] Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:39139-9.

[30] Xu Q, Fitzsimmons B, Steinauer J, O'Neill A, Newton AC, Hua XY, Yaksh TL. Spinal phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling cascades in inflammation-induced hyperalgesia. *J Neurosci*. 2011;31(6):2113-24.

[31] Young E, Cesena T, Meiri KF, Perrone-Bizzozero NI. Changes in protein kinase C (PKC) activity, isozyme translocation, and GAP-43 phosphorylation in the rat hippocampal formation after a single-trial contextual fear conditioning paradigm. *Hippocampus*. 2002;12:457-464.

7. Figure legends

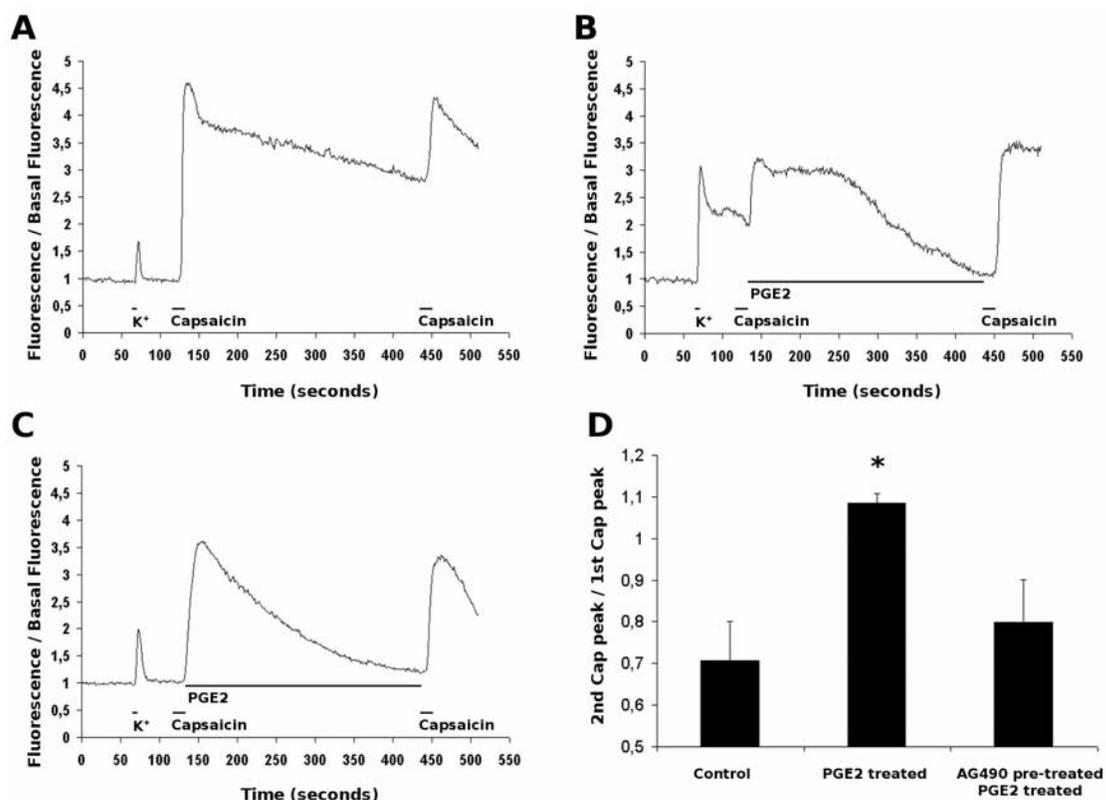


Figure 1: AG490 blocks PGE2 effect on capsaicin mediated calcium influx in DRG neurons. Two administration of capsaicin (300nM, 15 seconds) in an interval of 5 minutes leads to reduced calcium influx in the second administration due to desensitization of TRPV1 receptors (A). The administration of PGE2 (1 μ M) during the 5 minutes interval between capsaicin administration reverses de desensitization (B). Pre-incubation of DRG cells with AG490 (100 μ M) blocks PGE2 effect on the second capsaicin administration (C). Populational data is shown in D (n = 15 cells), data are Mean \pm SEM, * p<0,005 (ANOVA, Student-Newman-Keul's post-hoc test).

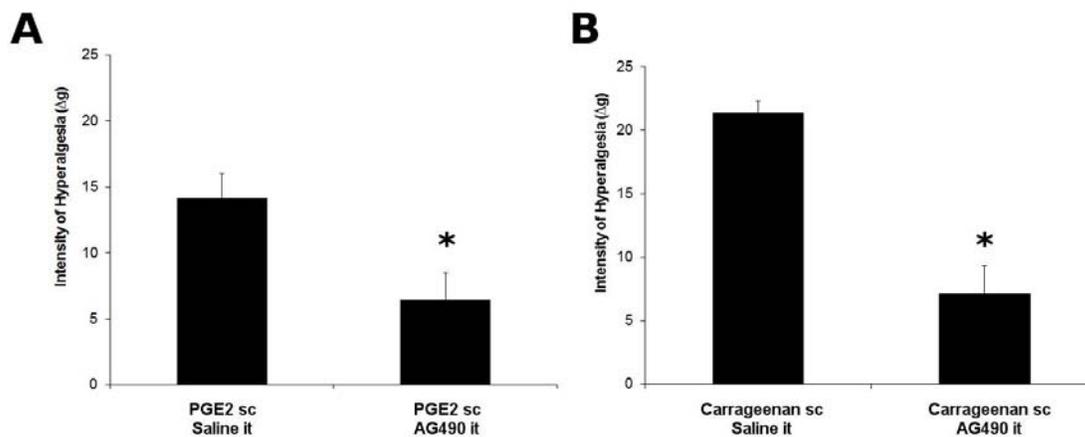


Figure 2: Intrathecal administration of AG490 reduces PGE2 and carrageenan induced hyperalgesia. Rats received an intrathecal administration of AG490 (1 μ g) 20 minutes before the intraplantar administration of PGE2 (100ng – A, n = 10) or carrageenan (100 μ g

– B, n = 15) in the right hindpaw. The mechanical withdraw threshold was measured, with an electronic paw pressure test, immediately before (baseline) and three hours after carrageenan administration. Data are expressed as mean \pm SEM of baseline mechanical withdraw threshold – third hour mechanical withdraw threshold (Δ g). * p < 0.05, unpaired student t test.

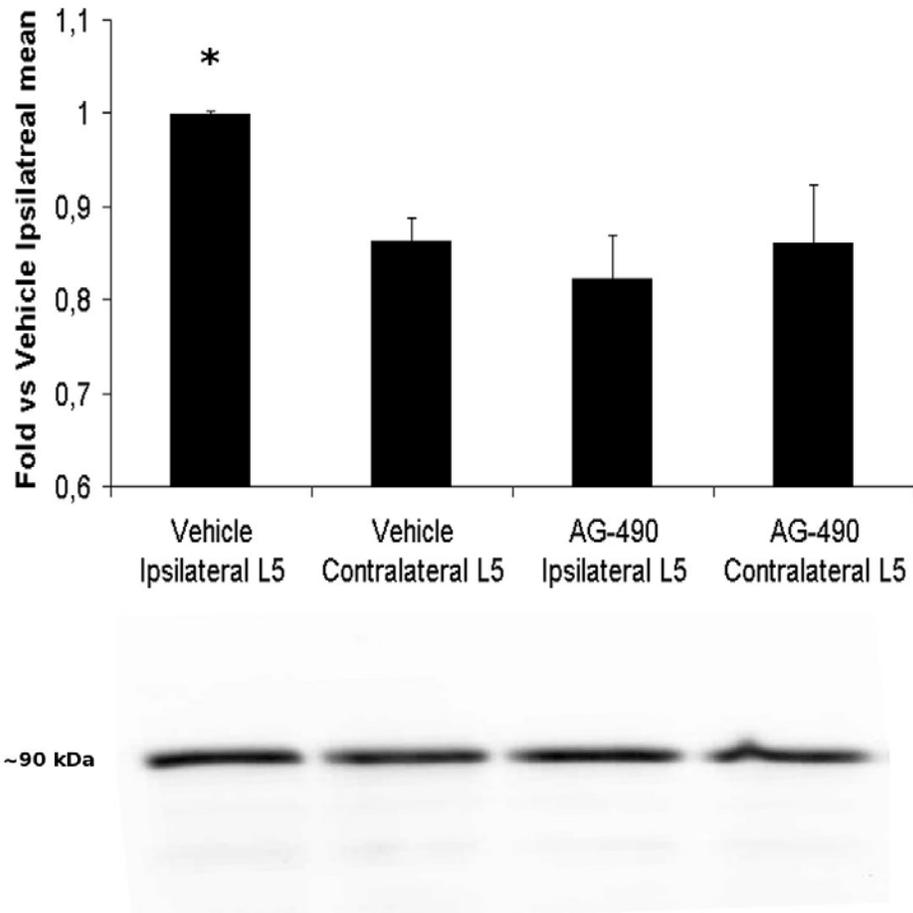


Figure 3: Intrathecal administration of AG490 reduces carrageenan induced PKCepsilon translocation to L5 DRG membrane enriched fraction. Inflammation in the hindpaw induced by carrageenan administration resulted in an increase in the presence of PKCepsilon in a membrane enriched fraction in the ipsilateral L5 DRG. This increase was blocked by intrathecal AG490 administration (n = 4). Data are expressed as mean±SEM. * p<0,005 (ANOVA, Student-Newman-Keul's post-hoc test).

Discussão

Um evento inflamatório em tecidos periféricos desencadeia mudanças plásticas nos nociceptores que resultam na hiperalgesia. Estas mudanças são induzidas por diversas moléculas capazes de ativar vias de sinalização intracelulares nos nociceptores. Neste trabalho demonstramos que a atividade da JAK2 expressa no tecido nervoso é importante para a indução de hiperalgesia.

A pré-incubação de neurônios do DRG em cultura com o inibidor seletivo da JAK2, o AG490, bloqueou a capacidade da PGE2 de induzir um aumento significativo da razão entre dois picos de influxo de cálcio induzidos pela capsaicina. A capsaicina induz a abertura de canais TRPV1 presentes na membrana celular, resultando assim em um grande influxo de íons de cálcio. Adicionalmente, apenas neurônios sensoriais nociceptivos de pequeno diâmetro expressam TRPV1 (Caterina e cols., 1997). Assim é possível assumir que os experimentos *in vitro* de cinética de cálcio englobaram exclusivamente nociceptores que expressam TRPV1. Neste trabalho, o uso de duas aplicações seqüenciais de capsaicina, sendo analisada a relação entre os picos de entrada de cálcio induzidas por estas aplicações, foi necessário devido a ampla variação na magnitude de resposta à capsaicina apresentada por células individuais. Utilizando esta estratégia, cada neurônio individual foi utilizado como seu próprio controle, normalizando assim esta variabilidade na resposta à capsaicina. O influxo de cálcio através do canal TRPV1 leva a uma elevação no nível intracelular deste íon, o que pode gerar uma dessensibilização dos canais TRPV1 (Szallasi e Blumberg, 1999). Este canal iônico possui diversos sítios de fosforilação na sua porção N-terminal, sendo que o estado de fosforilação desta região possui grande influência sobre as propriedades de condução de íons e sensibilidade do canal à temperatura e pH (Caterina e cols., 1997; Knotkova e cols., 2008). Assim, o aumento no nível intracelular de cálcio nos terminais que

expressam TRPV1 pode levar, por exemplo, à ativação de fosfatases como a calcineurina, que desfosforilam o receptor TRPV1, reduzindo sua atividade (Docherty e cols., 1996). Já mediadores inflamatórios como a PGE2 acabam induzindo nos nociceptores a ativação de proteínas quinase, como a PKC, que são capazes de fosforilar o TRPV1, aumentando a atividade deste canal (Bhave e cols., 2003). Desta forma, as sucessivas administrações de capsaicina, como realizado *in vitro* no presente trabalho, provavelmente resultaram em uma desfosforilação dos canais TRPV1, resultando em uma redução na razão entre picos de influxo de cálcio induzidos por capsaicina. Ao passo que a administração de PGE2 induziu uma ativação de proteínas quinase que fosforilam o TRPV1, resultando em um aumento significativo na relação entre picos de influxo de cálcio induzidos por capsaicina, contrabalanceando o possível efeito do cálcio sobre fosfatases que poderiam reduzir a atividade deste canal vaniloide.

Em relação ao modo de ação da PGE2 nos nociceptores, este prostanóide atua através de seus receptores EP específicos, isoformas 1, 2, 3 e 4, estando todas estas presentes na membrana celular dos nociceptores (Donaldson et al., 2001). Os receptores EP2 e EP4 estão associados a uma proteína G da classe G_s , resultando que a ativação destes receptores desencadeia a estimulação da adenilato ciclase, induzindo assim o aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico, por sua vez ativando a PKA (Southall and Vasko 2001). Nos nociceptores, esta quinase fosforila diversos substratos que resultam na sensibilização mediada pela PGE2. Entretanto, a atuação da PGE2 no receptor EP1 leva à estimulação da fosfolipase C, gerando a produção dos segundo mensageiros IP3 e DAG, pois este receptor está associado a uma proteína G da classe G_q (Kedzie e cols., 1998). O segundo mensageiro DAG permite que a PKCepsilon se transloque do citoplasma, onde se encontra inativa, para a membrana celular, desencadeando assim a atividade de quinase desta proteína. Vale

ressaltar que a isoforma epsilon da PKC, ao contrário de diversas isoformas desta quinase, não depende de aumento na concentração de íons cálcio para sua ativação (Duquesnes N e cols., 2011). A sensibilização dos nociceptores induzida pela PGE2 depende da ativação da PKCepsilon, principalmente a partir da terceira hora pós inflamação periférica, ao passo que o aumento da atividade da PKA estaria mais restrito ao período anterior à ativação da PKCepsilon (Aley et al, 2000; Sachs et al., 2009). Nos nociceptores, a PKCepsilon translocada para a membrana plasmática, fosforila substratos como canais de sódio sensíveis à voltagem e canais envolvidos na transdução sensorial, como o TRPV1, gerando modificações no padrão de resposta destas células que resultam na sensibilização induzida pela PGE2 (Bhave e cols., 2003; Cang e cols., 2009).

As vias de sinalização celular relacionadas à ação da PGE2 não são, a princípio, relacionadas com a JAK2, entretanto, a inibição desta quinase pode reduzir a atividade da PI3K (Lin e cols., 2010). Além disso, é observada uma relação entre as JAKs e a PI3Ks em células do sistema imune, epiteliais e cardiomiócitos (Huang e cols., 2007; Lu e cols., 2008; Choi e cols., 2012). A família das PI3Ks é composta por oito enzimas que podem ser agrupadas em três classes, sendo que as PI3Ks da classe I estão envolvidas na sobrevivência e proliferação celular, participando por exemplo, da sinalização induzida pela insulina. Estas quinases possuem duas sub-unidades, uma regulatória, p85, e uma catalítica, p110 (Foukasa e Okkenhaug 2003). Em relação ao mecanismo de interação entre JAK2 e PI3K, Duan e colaboradores em 2004, demonstraram que a JAK2 é capaz de se ligar e fosforilar os substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS1 e IRS2) via proteína adaptadora SH2-b. Os IRSs fosforilados se ligam por sua vez à subunidade p85 da PI3K, recrutando esta quinase para a membrana, tornando-a ativa. Desta forma estes autores demonstraram a interação entre JAK2 e PI3K através de um complexo JAK2-SH2b-IRSs-PI3K.

É interessante notar que a administração intratecal de Wortmannin, um inibidor da PI3K, é capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de carragenina. Além disso, uma inflamação periférica é capaz de aumentar a fosforilação de substratos da PI3K (Xu e cols., 2011). Em relação à PKCepsilon, Gao e colaboradores em 2007 demonstraram que a via de sinalização celular da PI3K é capaz de induzir a ativação desta isoforma da PKC. Estes autores observaram a ativação da PKCepsilon em cardiomiócitos em cultura quando tratados com resistina, um hormônio derivado do tecido adiposo. Sendo que esta ativação foi atenuada pelo tratamento destas células com inibidores via de sinalização PI3K/AKT. Adicionalmente o aumento da atividade da PI3K aumenta a atividade da proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítido 1 (PDK1), sendo que a PDK1 é capaz de fosforilar os sítios de regulação da PKCepsilon (Thr566 e Ser729), permitindo sua ligação ao DAG e consequente ativação (Cenni e cols., 2002).

Assim, uma possibilidade é que a redução da atividade da JAK2 pode resultar na redução da atividade da PI3K, sendo a consequência deste fenômeno a redução na atividade da PDK1, que por sua vez deixa de fosforilar os sítios de regulação da PKCepsilon, impedindo sua translocação para a membrana citoplasmática e ativação. Entretanto, experimentos complementares como a quantificação do nível atividade da PI3K, através da quantificação do estado de fosforilação de seus substratos, bem como a quantificação do estado de fosforilação da própria PKCepsilon nos resíduos Thr566 e Ser729 são necessários para explorar a possibilidade de que no DRG a PI3K/PDK1 seria o elo entre a atividade da JAK2 e da PKCepsilon.

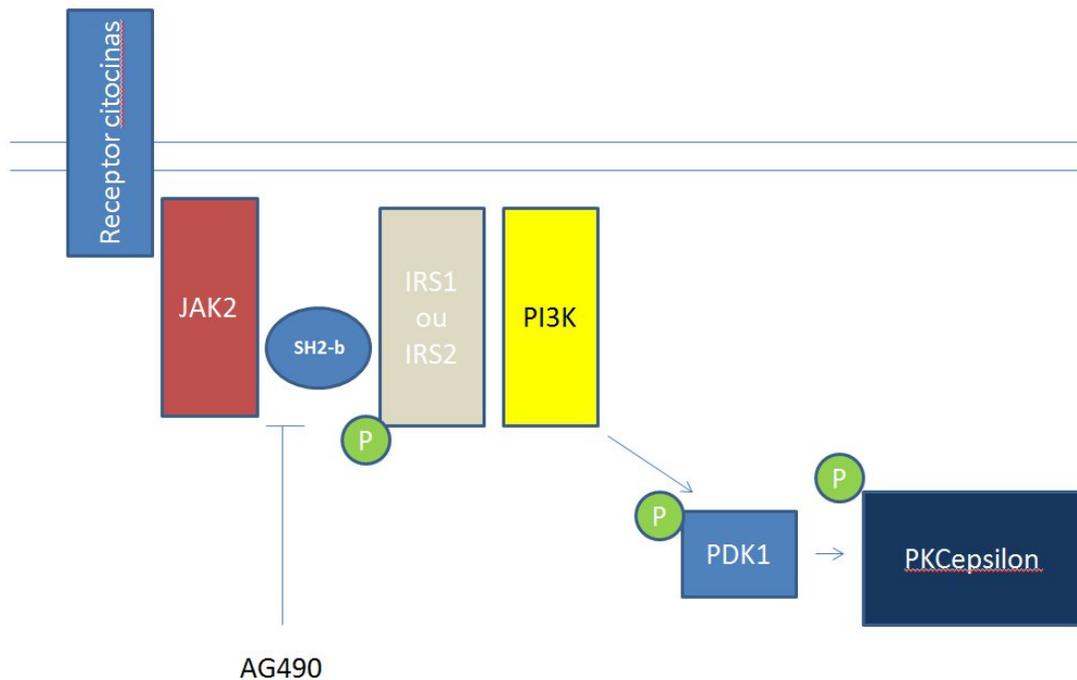


Figura 1 – Possível mecanismo de interação entre JAK2 e PKCepsilon.

Em acordo com o possível mecanismo proposto para a relação entre a JAK2 e a ação da PGE2, neste trabalho demonstramos que a administração intratecal de AG490 é capaz de reduzir a hiperalgesia e está associada com uma redução na ativação da PKCepsilon no DRG. Outros autores demonstraram que a inibição de PKCepsilon, utilizando antagonistas seletivos, é capaz de reduzir a hiperalgesia inflamatória (Aley e cols., 2000; Sachs e cols., 2009; Villarreal e cols., 2009). Além disso, a PKCepsilon induz a fosforilação de diversos substratos, tais como canais iônicos envolvidos na transdução de sinais sensoriais e canais iônicos envolvidos na geração e condução de potenciais de ação, resultando em modificações na modificação no padrão de transdução de informação sensorial dos

nociceptores (Nicol e cols., 1997; Bhave e cols., 2003; Cang e cols., 2009). Desta forma, é provável que o mecanismo responsável pela redução da hiperalgesia induzida pela administração intratecal de AG490 seja a inibição da translocação e ativação da PKCepsilon nas células do DRG devido a não fosforilação do sítio regulatório desta quinase, bloqueando assim o desenvolvimento de mudanças no padrão de resposta dos nociceptores.

Uma questão pertinente à interpretação dos dados do presente trabalho é a seletividade do inibidor AG490 nas concentrações utilizadas nos experimentos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Meydan e colaboradores, em 1996 afirmavam que o AG490 era um inibidor “específico” da JAK2. Entretanto, posteriormente verificou-se que este inibidor, assim como toda a ferramenta farmacológica, não é específico, mas sim seletivo. O AG490 possui, por exemplo, atividade inibitória sobre outros membros da família das Janus quinases, como a JAK3 (Kirken e cols., 1999). Como consequência, os efeitos do AG490 observados no presente trabalho também poderiam ser atribuídos a algum grau de inibição de outras Janus quinases, como a JAK3. Entretanto, vale ressaltar que não é descrito qualquer efeito do AG490 sobre quinases que não fazem parte da família Janus Quinase, mesmo em doses mais elevadas. Desta forma o efeito do AG490 sobre outras Janus Quinases não reduziriam a relevância das observações do presente trabalho, visto que até o presente momento não há o indício da participação de qualquer quinase desta família nas vias de sinalização envolvidas nos efeitos da PGE2 sobre os nociceptores.

É importante ressaltar que drogas administradas por via intratecal atuam na medula espinhal e no DRG (Pettersson e cols., 1993). Assim, neste trabalho assumimos que a inibição da JAK2 *in vivo* ocorre majoritariamente nestes tecidos. Um evento inflamatório em tecidos periféricos induz a produção de mediadores inflamatórios, como a PGE2, no

DRG, e possivelmente na medula espinhal (Pham-Marcou et al. 2008). É possível que atividade de tais mediadores inflamatórios no DRG leve a uma ativação da PKCepsilon, que por sua vez induza mudanças plásticas neste tecido. A inibição da atividade da JAK2 no DRG pode interferiu nestes eventos, bloqueando assim as mudanças plásticas necessárias para a indução da hiperalgesia.

Em conclusão o presente trabalho evidencia que a JAK2 expressa no DRG pode possuir um papel na sensibilização de nociceptores por um evento inflamatório periférico. Assim a inibição da JAK2 constituiria em um novo possível alvo farmacológico para o controle da hiperalgesia inflamatória.

Conclusões

A atividade da Janus Quinase 2 participa do mecanismo de ação da PGE2 em células do gânglio da raíz dorsal *in vitro*.

A atividade da Janus Quinase 2 expressa em tecido neural participa dos mecanismos responsáveis pela indução da hiperalgesia desencadeada pela ação de mediadores inflamatórios nos terminais periféricos dos nociceptores *in vivo*.

Bibliografia

Aley KO, Messing RO, Mochly-Rosen D, Levine JD. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J Neurosci* 2000;20:4680-4685.

Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12480-12485.

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* 1995;92:6915-6919.

Cang CL, Zhang H, Zhang YQ, Zhao ZQ. PKCepsilon-dependent potentiation of TTX-resistant Nav1.8 current by neurokinin-1 receptor activation in rat dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain* 2009;5:33.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-24.

Cenni V, Döppler H, Sonnenburg ED, Maraldi N, Newton AC, Toker A. Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *Biochem J*. 2002 1;363(Pt 3):537-45.

Choi B, Chun E, Kim SY, Kim M, Lee K, Kim SJ. Notch-Induced hIL-6 Production Facilitates the Maintenance of Self-Renewal of hCD34+ Cord Blood Cells Through the Activation of Jak-PI3K-STAT3 Pathway. *The American Journal of Pathology* 180(1), 2012, Pages 351–364.

Cunha TM, Verri Jr. WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1755-1760.

Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch*. 1996;431(6):828-37.

Dominguez E, Mauborgne A, Mallet J, Desclaux M, Pohl M. SOCS3-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury. *Neurosci*. 2010;30:5754-5766.

Dominguez E, Rivat C, Pommier B, Mauborgne A, Pohl M. JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J Neurochem* 2008;107:50-60.

Donaldson LF, Hmpfrey PS, Oldfield S, Giblett S, Grubb B. Expression and regulation of prostaglandin E receptor subtype mRNAs in rat sensory ganglia and spinal cord in response to peripheral inflammation. *Prostaglandins* 2001;63:109-122.

Duan C, Li M, Rui L. SH2-B promotes insulin receptor substrate 1 (IRS1)- and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to leptin. *J Biol Chem*. 2004 279(42):43684-91.

Duquesnes N, Lezoualc'h F, Crozatier B. PKC-delta and PKC-epsilon: foes of the same family or strangers? *J Mol Cell Cardiol*. 2011 51(5):665-73.

Eid SR, Cortright DN. Transient receptor potential channels on sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(194):261-81.

Ferreira SH. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol*. 1972;102:200-203.

Foukasa LC, Okkenhau K. Gene-targeting reveals physiological roles and complex regulation of the phosphoinositide 3-kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414(1) 2003, 13–18.

Gao J, Chang Chua C, Chen Z, Wang H, Xu X, C Hamdy R, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, Chua BH. Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43:601-609.

Huang F, Kao C, Wachi S, Thai F, Ryu J, Wu R. Requirement for Both JAK-Mediated PI3K Signaling and ACT1/TRAF6/TAK1-Dependent NF- κ B Activation by IL-17A in Enhancing Cytokine Expression in Human Airway Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 2007, 179, 6504 -6513.

Kedzie KM, Donello JE, Krauss HA, Regan JW, Gil DW. A single amino-acid substitution in the EP2 prostaglandin receptor confers responsiveness to prostacyclin analogs. *Mol Pharmacol*. 1998 Sep;54(3):584-90.

Kirken RA, Erwin RA, Taub D, Murphy WJ, Behbod F, Wang L, Pericle F, Farrar WL. Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *J Leukoc Biol*. 1999;65(6):891-9.

Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) Therapy for Pain Relief: Farewell or Revival? *Clinical Journal of Pain*. 2008;24(2):142-154.

Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev*. 2007 Dec;65(12 Pt 2):S140-6.

Lin KL, Su JC, Chien CM, Chuang PW, Chang LS, Lin SR. Down-regulation of the JAK2/PI3K-mediated signaling activation is involved in Taiwan cobra cardiotoxin III-

induced apoptosis of human breast MDA-MB-231 cancer cells. *Toxicol*. 2010;55:1263-1273.

Lopshire JC, Nicol GD. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci* 1998;18:6081-6092.

Lu Y, Zhou J, Xu C, Lin H, Xiao J, Wang Z, Yang B. JAK/STAT and PI3K/AKT Pathways Form a Mutual Transactivation Loop and Afford Resistance to Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 2008;21:305-314

Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc*. 2007;2:152-160.

Martin HA, Basbaum AI, Kwiat GC, Goetzl EJ, Levine JD. Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C- and A-delta mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. *Neuroscience* 1987;2:651-659.

Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1994;32:197-200.

Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature*. 1996;379(6566):645-8.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999;57:1-164.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1193-226.

Nicol GD, Vasko MR, Evans AR. Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 1997;77:167-176.

Pettersson CA. Drainage of molecules from subarachnoid space to spinal nerve roots and peripheral nerve of the rat. A study based on Evans blue-albumin and lanthanum as tracers. *Acta Neuropathol*. 1993;86:636-644.

Pham-Marcou TA, Beloeil H, Sun X, Gentili M, Yaici D, Benoit G, Benhamou D, Mazoit JX. Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment. *Pain*. 2008;140:274-283.

Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000; 19(49):5662-5679.

Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem.* 2010;401:318-320.

Sachs D, Villarreal C, Cunha F, Parada C, Ferreira Sh. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. *Br J Pharmacol.* 2009;156:826-834.

Szallasi, A, Blumberg, PM. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 1999;51;159–212

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005;12:1191-1197.

Southall MD, Vasko MR. Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4, mediate the prostaglandin E2-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. *J Biol Chem* 2001;276:16083-16091.

Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, Ihle JN, Yancopoulos GD. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 1994;263:92-95.

Tamura S, Morikawa Y, Senba E. Up-regulated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 and cyclic AMP-responsive element binding protein by peripheral inflammation in primary afferent neurons possibly through oncostatin M receptor. *Neuroscience.* 2005;133:797-806

Villarreal CF, Sachs D, Funez MI, Parada CA, de Queiroz Cunha F, Ferreira SH. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its Na(V)1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. *Biochem Pharmacol.* 2009;77:867-877.

Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:39139-9.

Xu Q, Fitzsimmons B, Steinauer J, O'Neill A, Newton AC, Hua XY, Yaksh TL. Spinal phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling cascades in inflammation-induced hyperalgesia. *J Neurosci.* 2011;31(6):2113-24.

Young E, Cesena T, Meiri KF, Perrone-Bizzozero NI. Changes in protein kinase C (PKC) activity, isozyme translocation, and GAP-43 phosphorylation in the rat hippocampal formation after a single-trial contextual fear conditioning paradigm. *Hippocampus.* 2002;12:457-464.

Anexo



UNICAMP



CEUA/Unicamp

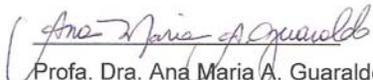
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

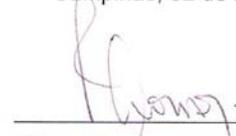
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Papel da Janus Quinase 2 na Hiperálgia Inflamatória" (protocolo nº 2396-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada / André Schwambach Vieira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 02 de maio de 2011.

Campinas, 02 de maio de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

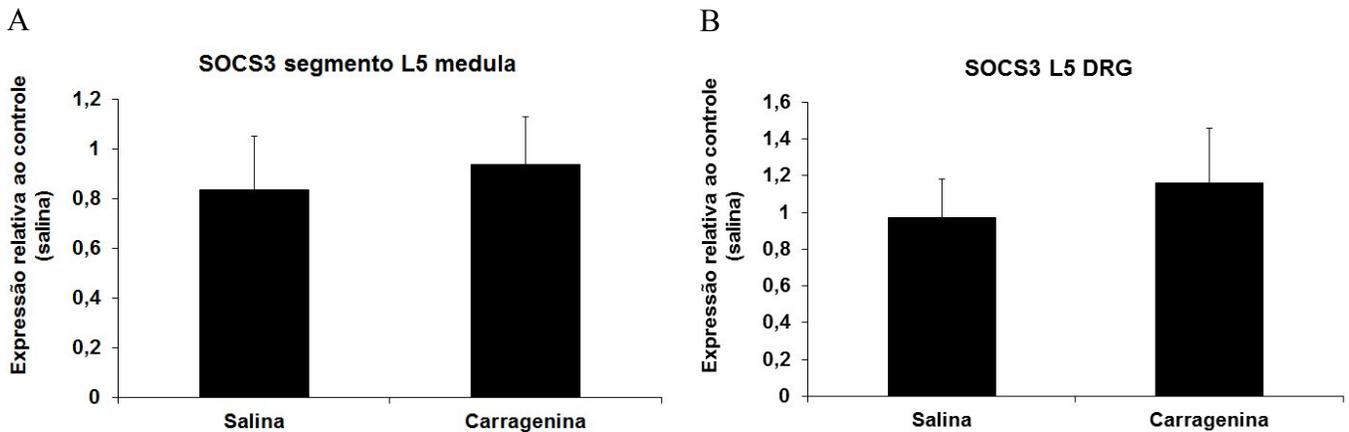


Figura S1. Análise da expressão de *socs3* por PCR em tempo real. A ativação da JAK2 pode induzir a fosforilação da STAT3, que por sua vez induz a expressão de SOCS3. Os animais receberam uma administração subcutânea na região plantar da pata traseira direita de Carragenina ou veículo de diluição. Na terceira hora pós-administração os animais foram sacrificados, sendo removido o segmento medular L5 e o DRG L5 direito. O RNA foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen, USA) e cDNA foi sintetizado a partir de RNA total utilizando-se kit High Capacity (Applied, USA). Uma reação de PCR em tempo real utilizando-se SybrGreen foi realizada para os controle endógenos GAPDH e TBP, e para o gene alvo SOCS3. Não foi possível observar qualquer diferença significativa na expressão de *socs3* entre os grupos ($p > 0,05$, teste T).

Projeto inicialmente apresentado para ingresso no programa de pós graduação em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em fisiologia.

**Investigação do efeito neuroprotetor da administração sistêmica do TAT-CNTF
sobre populações de neurônios do
estriado e do hipocampo de camundongos**

Orientador: Francesco Langone

- Introdução

O Fator Ciliar Neurotrófico (CNTF) foi inicialmente identificado como um produto dos tecidos intraoculares de embrião de pintainho capaz de promover a sobrevivência de neurônios do gânglio ciliar (Adler e cols., 1979). Posteriormente observou-se que o CNTF também é capaz de promover a sobrevivência de neurônios do gânglio da raiz dorsal, neurônios do sistema nervoso simpático e de motoneurônios de embrião (Blottner e cols., 1989; Arakawa e cols., 1990; Thaler e cols., 1994). Outras notáveis propriedades observadas foram suas capacidades de induzir a diferenciação de progenitores gliais em astrócitos tipo 2, de inibir a diferenciação de progenitores do sistema nervoso simpático e de aumentar a resistência de neurônios hipocámpais em cultura a estímulos excitotóxicos (Hughes e cols., 1988; Lillien e cols., 1988; Ernsberger e cols., 1989, Skaper e cols., 1992).

Em 1989 Lin e colaboradores e Stockli e colaboradores clonaram, independentemente, o gene que codifica o CNTF. A análise da seqüência de nucleotídeos deste gene permitiu determinar que o CNTF não fazia parte das famílias de fatores neurotróficos até então caracterizadas. Por homologia, o CNTF foi incluído na família das citocinas estrutural e funcionalmente relacionadas que inclui a interleucina-6 (IL-6), a oncostatina M, o fator inibidor de leucemia (LIF) e a interleucina-11 (IL-11) (Bazan, 1991; McDonald e Hendrickson, 1993). A determinação da distribuição espacial e temporal do RNA mensageiro que codifica o CNTF permitiu caracterizar sua expressão 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.

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 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 intracelulares gerados pelo CNTF tem início com a ligação deste ao CNTFR α . Esse complexo se liga ao gp-130 e ao LIFR β formando um heterodímero (Davis e cols., 1993a). A formação do complexo CNTF/CNTFR α /gp-130/LIFR β aproxima as proteína-tirosina-quinases 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 subsequente 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, hipocampo, hipotálamo, além de neurônios motores craniais e medulares (Lee e cols., 1997). A subunidade alfa do receptor do CNTF não possui domínio transmembrana e se encontra 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, 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 plasma sanguíneo (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 formas solúveis dos receptores é comum a outras citocinas da família do CNTF, tais como o IL-6 e o LIF (Zhang e cols., 1998).

Dentre as diversas propriedades do CNTF destacam-se suas ações *in vivo*. 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, efeitos similares também foram demonstrados 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 a de agente neuroprotetor agudo, atuando imediatamente após a lesão. Por exemplo, as células de Schwann liberariam para o meio extracelular o CNTF estocado em seu citoplasma após axotomia (Friedman e cols., 1992; Sendtner e cols., 1992b; Smith e cols., 1993). Neste sentido, Kirsch e colaboradores (2003) demonstraram que o CNTF é responsável pela indução da fosforilação de STAT3 em motoneurônios nas primeiras 12 horas após uma lesão periférica. No sistema nervoso central também se observou que lesões traumáticas do tecido nervoso levam a um rápido e expressivo aumento do CNTF no local afetado (Asada e cols., 1995; Lee e cols., 2005). Além disso Choi e colaboradores (2004) demonstraram um aumento de CNTFR α e de CNTF em neurônios do hipocampo de animais que sofreram lesão excitotóxica por ácido caínico.

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 sub-cutânea de doses acima de 10 μ g/kg/dia produziu nesses pacientes anorexia, perda de peso, estomatite por herpes labial, tosse, aumento de salivação e fadiga. Conseqüentemente, estes resultados

geraram a interrupção dos testes clínicos, ainda mais pelo fato que o número de óbitos foi maior entre os pacientes tratados com CNTF (Sendtner e cols., 1994; Miller e cols., 1996a,b).

Diversos trabalhos realizados em modelos animais também demonstraram efeitos caquetizantes semelhantes aos observados nos testes clínicos em humanos (Shapiro e cols., 1993; Henderson e cols.,1994b; Kwon e cols., 1994; Zhang e cols.,1995; Espat e cols., 1996; Martin e cols., 1996; Henderson e cols., 1996). Experimentos com camundongos portadores de ablação do gene que codifica o receptor gp130, especificamente em células que expressam pro-opiomelanocortina (POMC), demonstraram que estes animais não apresentaram redução do peso corporal e da ingesta 24 horas após tratamento i.c.v. com CNTF (Janoschek e cols., 2006). Pôde-se concluir a partir destes dados que a ação do CNTF sobre o peso corporal é majoritariamente 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 (Elmqvist, 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). O fato do CNTF interferir nestes circuitos neurais levou à investigação do seu possível emprego no tratamento de quadros de obesidade.

Contudo, 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 possível estratégia 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 ligadas a um PTD 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 seqüência de 36 aminoácidos correspondentes a este domínio básico da Tat, também denominado PTD da Tat (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 a vários modelos envolvendo células 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). Neste sentido, 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 utilizando-se 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 prover suporte trófico a neurônios de gânglios da raiz dorsal de embrião de pintainho in vitro e de promover a sobrevivência de 70% dos motoneurônios axotomizados após sua administração subcutânea (sc) em um modelo de secção do nervo ciático em ratos neonatos (Langone e cols., 2004, Rezende, 2005). Notavelmente a administração 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 sc com CNTF durante 5 dias (P2 a P7). Em ratos adultos, a administração intracerebroventricular (icv) de TAT-CNTF demonstrou que esta molécula é capaz de induzir a fosforilação de STAT3 no hipotálamo, porém com menor intensidade que o CNTF. Sucessivas administrações icv de TAT-CNTF resultaram em uma perda de peso nos animais, também significativamente menor do que aquela observada após tratamento similar com CNTF. Além disso, verificou-se que os animais que receberam

administrações icv não apresentaram mobilização de triglicérides armazenados nos tecidos adiposos, ao contrário do observado nos animais que recebem CNTF (Vieira e cols., 2007).

Considerando-se a capacidade do TAT-CNTF de induzir fosforilação de STAT3 no hipotálamo e a sua reduzida capacidade de induzir perda de peso corporal, torna-se importante determinar quais populações de neurônios são responsivas a esta molécula. Devido ao seu papel na perda de peso gerada pelo CNTF, é muito provável que os neurônios do hipotálamo que expressam POMC apresentem uma menor resposta ao TAT-CNTF do que ao CNTF.

Além de seu potencial uso no tratamento de doenças que afetam neurônios motores, o CNTF apresenta efeitos protetores em outras populações neuronais. O CNTF, por exemplo, é capaz de aumentar a resistência *in vitro* de neurônios hipocâmpais à excitotoxicidade, além de proteger tais células de lesão isquêmica *in vivo* (Skaper e cols., 1992; Wen e cols., 1995). Além destas células, o CNTF é capaz de proteger também neurônios do estriado da lesão excitotóxica induzida por ácido quinolínico *in vivo* (Anderson e cols., 1996; Emerich e cols., 1996). Entretanto, os efeitos metabólicos do CNTF também desencorajaram o uso de aplicações sistêmicas desta molécula para o tratamento de lesões hipocâmpais e de doenças neurodegenerativas que afetam neurônios estriatais, tais como a doença de Huntington. Considerando nossos dados sobre a capacidade neuroprotetora do TAT-CNTF dissociada dos efeitos metabólicos do CNTF (Langone e cols. 2004, Vieira e cols., 2007), esta proteína pode ser uma alternativa para o tratamento de doenças neurodegenerativas que envolvem neurônios estriatais e hipocâmpais.

O objetivo deste trabalho é investigar se a administração sistêmica do TAT-CNTF produz efeitos neuroprotetores sobre neurônios do estriado e do hipocampo e se os mesmos

podem ser dissociados de possíveis efeitos metabólicos derivados de sua atuação sobre neurônios hipotalâmicos.

- Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, com 6 semanas de idades, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Os camundongos foram divididos em grupos de 5 animais, 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), de temperatura (21oC) e de umidade (50%) controladas, tendo livre acesso à água e ração.

Administração subcutânea

Um volume de 0,1 ml de TAT-CNTF (25 nmol/kg, Centro di Ricerche in Biotenologie Innovative-CRIBI da Universidade de Padova, Itália) ou CNTF (25 nmol/kg, Centro di Ricerche in Biotenologie Innovative-CRIBI da Universidade de Padova, Itália) ou PBS foi administrado via subcutânea. Esta via de administração foi utilizada para verificar a distribuição de células pSTAT3 no cérebro após administração sistêmica de TAT-CNTF. Os tempos que foram utilizados em nossos procedimentos se baseiam no dados de Lambert e cols. (2001). Estes autores verificaram a presença de células pSTAT3 positivas no cérebro de camundongos 90 minutos após administração iv de CNTF.

Após os intervalos de 20 ou 90 minutos os animais foram anestesiados com uma solução de tribromoetanol (12,5 mg/ml) na dose de 250mg/kg (ip) e perfundidos através do ventrículo esquerdo com PBS até a completa remoção do sangue. Em seguida foram perfundidos com solução fixadora contendo 4% de formaldeído em tampão fosfato (pH 7,4). O cérebro dos animais foi dissecado, crioprotégido com solução de sacarose 30% e congelados para posterior processamento histológico.

Investigação de células pSTAT3 positivas através de imunoperoxidase

De cada cérebro previamente processado (congelamento) foram coletados cortes seriados coronais (8 µm) em lâminas gelatinizadas. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 1% NaOH e 1% H₂O₂ por 20 minutos. Para imunomarcagem de pSTAT3, as lâminas foram incubadas inicialmente em solução contendo 0,3% Glicina por 10 minutos e a seguir em solução contendo 0,03% SDS por 10 minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com solução BSA (5%) e Triton-X100 0,25% em tampão PBS pH 7,4 por 1 hora. Os cortes foram então incubados com anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio (pSTAT3 – Cell Signaling (1:3000), CNTFR α – Santa Cruz (1:100)) por 12 horas à 4°C em câmara úmida. A seguir, os cortes foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente em solução contendo anticorpo secundário conjugado à biotina. A imunorreatividade foi amplificada através de complexo avidina-biotina (Vectastain ABC kit, Vector) por 1 hora. Por fim, a marcação foi revelada através de reação de peróxido de hidrogênio com diaminobenzidina e as lâminas foram montadas (Entelan, Merck) para análise por microscopia óptica (Leica DMLB 100S) em campo claro.

Investigação da ação protetora do TAT-CNTF sobre o estriado

Lesão do estriado e tratamento

Previamente à lesão do estriado os camundongos receberam uma administração (sc) de TAT-CNTF (25 nmol/kg), CNTF (25 nmol/kg) ou PBS. Após a lesão os camundongos foram tratados diariamente com administrações (sc) de TAT-CNTF (25 nmol/kg, Centro di Ricerche in Biotenologie Innovative-CRIBI da Universidade de Padova, Itália) ou CNTF (25 nmol/kg, Centro di Ricerche in Biotenologie Innovative-CRIBI da Universidade de Padova, Itália) ou PBS, por três dias.

Para realização da lesão do estriado esquerdo dos camundongos foi empregada a técnica descrita por Hansson e colaboradores (1999) com modificações. Inicialmente os camundongos foram anestesiados com uma solução de tribromoetanol (12,5 mg/ml) na dose de 250mg/kg (ip). Após anestesia estes foram posicionados em um aparelho estereotáxico (Insight modelo EFF-331) e, com o auxílio de uma broca odontológica, o crânio foi perfurado nas coordenadas 0,7 mm anterior ao bregma e 1,9 mm lateral à esquerda da linha média. A seguir, a ponta de uma agulha 32G acoplada a uma seringa de 10µl foi posicionada na coordenada 2,5 mm ventral ao bregma. O volume de 1 ul de ácido quinolínico (30 nmol) foi administrado a uma velocidade de 0,5ul/minuto utilizando-se uma bomba de microinfusão (Insight modelo EFF311). Após a infusão o orifício no crânio foi fechado com acrílico auto-polimerizante e a pele foi suturada. Os animais foram então recolocados em suas gaiolas para recuperação.

Dez dias após a lesão os animais foram anestesiados com uma solução de tribromoetanol (12,5 mg/ml) na dose de 250mg/kg (ip). Os animais foram perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS até a completa remoção do sangue. Em

seguida foram perfundidos com solução fixadora contendo 4% de formaldeído em tampão fosfato (pH 7,4). O cérebro dos animais foi dissecado, crioprottegido com solução de sacarose 30% e congelados para posterior processamento histológico.

O peso corporal dos animais foi acompanhado durante todo o procedimento com o objetivo de observar efeitos metabólicos relacionados às moléculas administradas.

Avaliação estereológica

O cérebro foi posicionado no suporte de um criostato (Leica CM1850) para obtenção de cortes coronais. A região do estriado foi inteiramente seccionada serialmente em cortes de 40 µm, sendo todos os cortes coletados individualmente em placas de cultura de 24 poços contendo PBS e 0,05% de azida. Os cortes foram então armazenados a 4°C até o uso.

Uma amostragem sistemática aleatória foi realizada para a seleção dos cortes utilizados nas contagens. Para tal, um corte foi selecionado aleatoriamente entre os quatro primeiros obtidos. A partir de então, um a cada oito cortes foi selecionado até esgotar-se a série. Estes cortes foram posicionados serialmente sobre lâminas gelatinizadas, corados com Cresil Violeta e montados com Permount (Fischer) (Galvin e Oorschot, 2003).

Para a contagem foi utilizada a técnica de “Optical Fractionator”. Os neurônios foram identificados morfológicamente através de seu núcleo grande, palidamente corado e citoplasma fortemente corado, contendo corpúsculos de Nissl. Em cada corte selecionado, a área do estriado ipsilateral à lesão foi delimitada utilizando-se uma objetiva panorâmica (4X). Uma grade composta por quadrados de 250 X 250 µm foi aleatoriamente sobreposta ao corte. Em cada ponto de intersecção da grade sobre o estriado foi posicionada uma janela de contagem (frame) de 35 X 35 µm. A contagem dos neurônios foi realizada por “disector” óptico utilizando-se uma objetiva de 100X (imersão em óleo) em um

microscópio que possui controle motorizado do movimento da platina ao longo do eixo “Z” (microcator). Antes do início da contagem foi medida a espessura do corte em cada frame. Para isso, a face superior do corte foi definida pela primeira célula que entrar em foco à medida que o mesmo for deslocado no eixo Z. Da mesma forma, a face inferior foi definida pela última célula que entrar em foco. Para o início da contagem o plano de foco foi posicionado 2 µm abaixo da superfície do corte, não se considerando assim a região que possa ter perdido parte das estruturas a serem contadas durante a obtenção dos cortes (“lost caps”). A partir desta profundidade, foram contados todos os núcleos de neurônios nitidamente identificáveis à medida que o plano de foco for aprofundado ao longo dos próximos 10 µm da espessura do corte. Tal espessura (10 µm) foi definida como a altura do “disector” (h). Serão excluídos da contagem todos os núcleos que contatarem a linha proibida do frame (West e cols., 1991).

O número de neurônios foi estimado utilizando-se a seguinte fórmula: $C = \frac{\sum Q-}{t/h} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{ssf}$, onde C é o número total de núcleos de neurônios; $\sum Q-$ é a somatória do número núcleos de neurônios a serem contados; t é a espessura do corte; h é altura do “disector” (10 µm); asf é a fração de área amostrada, calculada como área da janela de contagem (35 x 35 = 1225 µm²) dividida pela área do quadrante do grid de contagem (250 x 250 = 62500 µm²); ssf é a fração de cortes em que foram amostradas as células, como foram selecionados um corte a cada oito, o valor é 1/8. Os neurônios do estriado contralateral, não lesado, também foram contados utilizando-se a técnica acima descrita.

O volume do estriado ipsilateral à lesão, bem como o contralateral, foi estimado pelo método de Cavalieri. A área do estriado em cada corte selecionado foi mensurada e o

volume foi calculado através da equação $V(\text{ref}) = \Sigma a \times t$, onde $V(\text{ref})$ é o volume calculado, Σa é soma das áreas em cada corte e t é a distância entre os cortes coletados (320 μm) (Gundersen e cols., 1988).

Investigação da ação neuroprotetora do TAT-CNTF sobre neurônios do hipocampo

Previamente à lesão do hipocampo os camundongos receberam uma administração (sc) de TAT-CNTF (25 nmol/kg, Centro di Ricerche in Biotecnologie Innovative-CRIBI da Universidade de Padova, Itália), CNTF (25 nmol/kg, Centro di Ricerche in Biotecnologie Innovative-CRIBI da Universidade de Padova, Itália) ou PBS. Após a lesão, os camundongos foram tratados diariamente com administrações (sc) de TAT-CNTF (25 nmol/kg) ou CNTF (25 nmol/kg) ou PBS, por três dias.

Para realização da lesão do hipocampo dorsal esquerdo dos camundongos foi empregada a técnica descrita por Gouder e colaboradores (2004) com modificações. Inicialmente os camundongos foram anestesiados com uma solução de tribromoetanol (12,5 mg/ml) na dose de 250mg/kg (ip). Após anestesia foram posicionados em um aparelho estereotáxico (Insight modelo EFF-331) e, com o auxílio de uma broca odontológica, o crânio foi perfurado nas coordenadas 1,5 mm posterior ao bregma e 1,8 mm lateral à esquerda da linha média. A seguir, a ponta de uma agulha 32G acoplada a uma seringa de 10 μl foi posicionada na coordenada 1,9 mm ventral ao bregma. O volume de 0,5 μl de ácido cáinico (1 nmol) foi infundido a uma velocidade de 0,5 μl /minutos utilizando-se uma bomba de microinfusão (Insight modelo EFF311). Após a infusão o orifício no crânio foi

fechado com acrílico auto-polimerizante e a pele foi suturada. Os animais foram então recolocados em suas gaiolas para recuperação.

Vinte e quatro horas após o último tratamento os animais foram anestesiados com uma solução de tribromoetanol (12,5 mg/ml) na dose de 250mg/kg (ip). Os animais foram perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS até a completa remoção do sangue. Em seguida foram perfundidos com solução fixadora contendo 4% de formaldeído em tampão fosfato (pH 7,4). O cérebro dos animais foi dissecado, crioprotégido com solução de sacarose 30% e congelados para posterior processamento histológico.

O peso corporal dos animais foi acompanhado durante todo o procedimento com o objetivo de observar efeitos metabólicos relacionados às moléculas administradas.

Avaliação estereológica

O cérebro foi posicionado no suporte de um criostato (Leica CM1850) para obtenção de cortes coronais. A região do hipocampo dorsal foi inteiramente seccionada serialmente em cortes de 40 µm, sendo todos os cortes coletados individualmente por técnica de “free floating” em placas de cultura de 24 poços contendo PBS e 0,05% de azida. Os cortes foram então armazenados a 4°C até o uso.

Uma amostragem sistemática aleatória foi realizada para a seleção dos cortes a serem utilizados para as contagens. Para tal um corte foi selecionado aleatoriamente entre os quatro primeiros obtidos. A partir de então, um a cada oito cortes foi selecionado até esgotar-se a série. Estes cortes foram posicionados serialmente sobre lâminas gelatinizadas, corados com Cresil Violeta e montados com Permount (Fischer) (Galvin e Oorschot, 2003).

O número de neurônios piramidais das regiões CA1, CA2+CA3 e de neurônios granulares do giro denteado ipsilaterais à lesão foram estimados utilizando-se o método de

“Optical Fractionator” como acima descrito. A região CA1 é formada por uma camada densamente empacotada de células piramidais menores do que aquelas das camadas CA2 e CA3. A transição de CA1 para o subiculum pode ser definida pela perda do denso empacotamento observado na primeira. Os neurônios foram identificados morfológicamente através de seu núcleos grandes, palidamente corados e citoplasma fortemente corado, contendo corpúsculos de Nissl. Para CA1 foi utilizada uma janela de contagem de 17 X 17 μm , para CA2+CA3 23 X 23 μm e para o giro denteado 12 X 12 μm (West e cols., 1991; Fitting e cols., 2007). Os neurônios dessas mesmas regiões do hipocampo contralateral, não lesado, também foram contados utilizando-se a técnica acima descrita.

O volume da camada piramidal das regiões CA1, CA2+CA3 e da camada granular do giro denteado de cada animal foi estimado pelo método de Cavalieri. Para isso a área de cada região em cada corte selecionado foi mensurada. O volume foi então calculado para cada região separadamente através da equação: $V(\text{ref}) = \sum a \times t$, onde $V(\text{ref})$ é o volume calculado, $\sum a$ é soma das áreas em cada corte e t é a distancia entre os cortes coletados (320 μm) (Gundersen e cols., 1988).

- Resultados

Imunohistoquímica para pSTAT3 após administração sub-cutânea de CNTF ou TAT-CNTF

A administração subcutânea de TAT-CNTF foi capaz de ativar células no núcleo arqueado do hipotálamo de camundongos adultos. Porém tal ativação se deu em menor intensidade quando comparado a camundongos que receberam administração de CNTF. Estes apresentam um número maior de células pSTAT3 positivas no núcleo arqueado do hipotálamo. Os dados obtidos no presente trabalho indicam que administrações subcutâneas de TAT-CNTF em camundongos adultos não irão induzir efeitos metabólicos deletérios. Sendo a possível causa deste fenômeno a reduzida atividade do TAT-CNTF no núcleo arqueado do hipotálamo.

Contagem de neurônios por estereologia na lesão do hipocampo com ácido caínico – Região CA2/CA3

Os animais do grupo PBS (n=3) apresentaram índice de sobrevivência médio (número de neurônios do lado lesado / número de neurônios no lado contra-lateral à lesão) de 0,39,

ou seja, em média apresentaram perda de 41% dos neurônios devido à lesão. Foi realizada contagem de apenas um animal do grupo tratado com CNTF e um do grupo TAT-CNTF sendo encontrado índice de sobrevivência 0,44 e 0,61 respectivamente.

Contagem de neurônios por estereologia na lesão do corpo estriado com ácido quinolínico

Foi realizado a contagem de neurônios de apenas um animal do grupo PBS, sendo que este apresentou índice de sobrevivência de 0,43. Os animais do grupo TAT-CNTF (n=2) apresentaram índice médio 0,45 ao passo que do grupo CNTF (n=2) apresentaram índice médio 0,68.

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, PANAYOTATOS N, CORCORAN TL, LINDSAY RM, WIEGAND SJ. Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(14):7346-51, 1996.

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.

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.

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 target-deprived preganglionic sympathetic spinal cord neurons. *Neurosci Lett.*, 105(3):316-320 1989.

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.

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.

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.

CHOI JS, KIM SY, PARK HJ, CHA JH, CHOI YS, CHUNG JW, CHUN MH, LEE MY. Differential regulation of ciliary neurotrophic factor and its receptor in the rat hippocampus in response to kainic acid-induced excitotoxicity. *Mol Cells*. 17(2):292-6, 2004.

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.

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, 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.

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

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.

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.

EMERICH DF, LINDNER MD, WINN SR, CHEN EY, FRYDEL BR, KORDOWER JH. Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci*, 16(16):5168-81, 1996.

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. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(2):664-668, 1994.

FITTING S, BOOZE RM, HASSELROT U, MACTUTUS CF. Differential long-term neurotoxicity of HIV-1 proteins in the rat hippocampal formation: A design-based stereological study. *Hippocampus*, [Epub ahead of print]Oct 9 2007.

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.

GALVIN KA, OORSCHOT DE. Continuous low-dose treatment with brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 protects striatal medium spiny neurons from mild neonatal hypoxia/ischemia: a stereological study. *Neuroscience*, 118:1023-1032 2003.

GOUDER N, SCHEURER L, FRITSCHY JM, BOISON D. Overexpression of adenosine kinase in epileptic hippocampus contributes to epileptogenesis. *J Neurosci.* 24(3):692-701, 2004.

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

GUNDERSEN HJ, BAGGER P, BENDTSEN TF, EVANS SM, KORBO L, MARCUSSEN N, MØLLER A, NIELSEN K, NYENGAARD JR, PAKKENBERG B, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96(10):857-881, 1988.

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.

HANSSON O, PETERSÉN A, LEIST M, NICOTERA P, CASTILHO RF, BRUNDIN P. Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(15):8727-8732, 1999.

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.

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.

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.

KAWAGUCHI Y, WILSON CJ, AUGOOD SJ, EMSON PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 18(12):527-535, 1995.

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, TERHEGGEN U, HOFMANN HD. Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. *Mol Cell Neurosci*. 24(1):130-138, 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.

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.

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):4652-4657, 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.

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.

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.

MORRIS RGM, HAGAN JJ. Hippocampal electrical activity and ballistic movement. In: Seifert, W. ed . *Neurobiology of the hippocampus*. London: Academic Press, 1983.

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.

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.

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.

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.

PODUSLO JF, CURRAN GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res.* 36(2):280-286, 1996.

RENDE M, MUIR D, RUOSLAHTI E, HAGG T, VARON S, MANTHORPE M. Immunolocalization of ciliary neurotrophic 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.

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.

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.

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.

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.

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.

SKAPER SD, NEGRO A, DAL TOSO R, FACCI L. Recombinant human ciliary neurotrophic factor alters the threshold of hippocampal pyramidal neuron sensitivity to excitotoxin damage: synergistic effects of monosialogangliosides. *J Neurosci Res*. 33(2):330-337, 1992.

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.

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.

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.

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.

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.

VIEIRA AS, ROGÉRIO F, REZENDE ACS, VELLOSO LA, NEGRO A, LANGONE F. TAT-CNTF intracerebroventricular administration in rats do not produce CNTF catabolic effects. National Congress of the Italian Society of Neuroscience 2007 Abstracts, SAT-23, 2007.

WEST MJ, GUNDERSEN HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol.* 296(1):1-22, 1990.

WEST MJ, SLOMIANKA L, GUNDERSEN HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 231:482-497, 1991.

WEN TC, MATSUDA S, YOSHIMURA H, KAWABE T, SAKANAKA M. Ciliary neurotrophic factor prevents ischemia-induced learning disability and neuronal loss in gerbils. *Neurosci Lett.* 191(1-2):55-8, 1995.

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.

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.