



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**ALEXANDRE CÉSAR SANTOS DE REZENDE**

**Investigação da ação neuroprotetora do fator neurotrófico ciliar  
(CNTF) conjugado com peptídeo contendo domínio de  
translocação de proteína (PTD)**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Alexandre Cesar Santos  
de Rezende  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Celular e Estrutural  
na área de Biologia Celular.

**Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone**

**Campinas, 2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<b>R339i</b>	<p>Rezende, Alexandre César Santos de Investigação da ação neuroprotetora do fator neurotrófico ciliar (CNTF) conjugado com peptídeo contendo domínio de translocação de proteína (PTD) / Alexandre César Santos de Rezende. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Francesco Langone (em memória). Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Fator neurotrófico ciliar. 2. Sistema nervoso. 3. Regeneração. 4. Fatores neurotróficos. 5. Motoneurônio. I. Langone, Francesco, 1950-2009. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Investigation of neuroprotective action of ciliary neurotrophic factor (CNTF) fused to a protein transduction domain (PTD).

**Palavras-chave em inglês:** Ciliary neurotrophic factor; Nervous system - Regeneration; Neurotrophic factors; Motor neurons.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Francesco Langone, Laurecir Gomes, Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Roger Frigério Castilho, Jackson Cioni Bittencourt, Guilherme de Araújo Lucas.

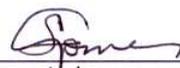
**Data da defesa:** 31/07/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 31 de julho de 2009.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Laurecir Gomes



Assinatura

Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

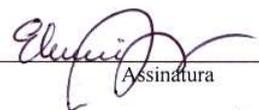


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto

Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari



Assinatura

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho



Assinatura

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Assinatura

Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Assinatura

Ao meu orientador Prof. Dr. Francesco Langone  
Embora não esteja aqui presente, o senhor foi o grande responsável pela minha formação profissional. O seu exemplo de pessoa e profissional estará sempre presente em minha vida. Pela sua dedicação e cuidado na minha formação, meu eterno agradecimento.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Francesco Langone, pela sua paciência, dedicação e honestidade nos ensinamentos no decorrer do trabalho. Agradeço de modo especial por ter sido meu orientador e acreditar no meu trabalho. Espero sempre responder com trabalho e dedicação os seus ensinamentos.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado e pelo projeto auxílio que sem dúvida foram decisivos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo suporte em todas as fases do trabalho.

De modo especial a Profa. Dra. Laurecir Gomes coordenadora do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural por toda ajuda humana e profissional nos trâmites finais da tese, que foi essencial para a superação de todas as dificuldades que surgiram no final deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

A Líliam A. S. Panagio em especial, pela sua paciência, competência e prontidão em resolver todos os problemas burocráticos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, meu muito obrigado.

A CAPES/PROEX pelo auxílio nas despesas da tese.

A minha esposa Simone por ser minha companheira nos bons e maus momentos e por ser uma presença ativa nas minhas conquistas.

A minha mãe Vanda que esteve sempre presente nesta jornada, muito obrigado por sempre me encorajar, incentivar e por ser a minha mãe. E a toda minha família.

Ao meu sogro e minha sogra Édson e Marilu, pela torcida e confiança, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Alessandro Negro, por acreditar no meu trabalho e por manter o fornecimento das moléculas testadas neste trabalho.

Ao meu grande amigo André S. Vieira pela sua ajuda nas análises dos resultados e publicações. Você é uns dos grandes responsáveis pelo bom andamento das atividades desenvolvidas no Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica – IB – UNICAMP. Meu sincero agradecimento.

Ao meu amigo César R. Sartori, por ser meu amigo e pelas agradáveis conversas que sempre foram úteis para nosso crescimento profissional e pessoal.

Ao meu amigo Gustavo Facchini pela importante ajuda nos procedimentos para a avaliação do metabolismo energético realizado neste trabalho.

E aos meus amigos de Laboratório: Raffinha, Janice, Karina, Carlos, Priscila, Fernando, Elayne e Dionéia, pela amizade e pela ajuda no andamento do trabalho.

Ao técnico Juvani do Departamento de Histologia e Embriologia, pela ajuda nos procedimentos para a realização dos cortes histológicos em historesina essenciais para as análises dos resultados das gorduras e nervos realizado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Antonio Barbosa de Toledo, pela preciosa ajuda nas reações histoquímicas desenvolvidas neste trabalho.

A Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho e ao Prof. Dr. Jackson C. Bittencourt, pelas observações na Pré-Banca, que com certeza foram de extrema importância para o término da tese.

A Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, ao Dr. Roger Frigério Castilho, ao Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt, ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto, a Profa. Dra. Leonilda M. B. dos Santos, ao Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas e ao Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada, por aceitaram compor a banca para a defesa desta tese.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Minha gratidão.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	3
<b>2. OBJETIVOS</b>	14
<b>3. MATERIAIS E MÁTODOS</b>	15
3.1. Animais e grupos experimentais	15
3.2. Procedência do CNTF e TAT-CNTF	16
3.3. Procedimentos cirúrgicos para o esmagamento do nervo ciático	16
3.4. Tratamento dos animais	17
3.5. Avaliação do efeito do tratamento	18
3.5.1. Peso corporal	18
3.5.2. Dosagem da glicemia e concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol e ácidos graxos livres	18
3.5.2.1. Procedimentos para dosagem de glicose em microplaca	19
3.5.2.2. Procedimentos para dosagem de triglicérides em microplaca	19
3.5.2.3. Procedimentos para dosagem de colesterol em microplaca	20
3.5.2.4. Procedimentos para dosagem de ácidos graxos livres em microplaca	20
3.5.3. Recuperação funcional motora e sensitiva	21
3.6. Análise histológica	27
3.6.1. Sobrevivência neuronal e regeneração axonal após esmagamento do nervo ciático	27
3.6.2. Análise morfológica e morfométrica do tecido adiposo	30
3.7. Avaliação estatística dos dados morfométricos	32
<b>4. RESULTADOS</b>	33
4.1. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento ponderal dos animais	33
4.2. Dosagens das concentrações plasmáticas de glicose	35
4.3. Dosagens das concentrações plasmáticas de triglicérides	35

4.4. Dosagens das concentrações plasmáticas de colesterol	39
4.5. Dosagens das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres	39

## RESUMO

O fator neurotrófico ciliar (CNTF) despertou grande interesse com a descoberta do seu efeito neuroprotetor sobre motoneurônios após secção de nervos periféricos em ratos neonatos e camundongos adultos. Contudo, seus efeitos colaterais de perda de peso e caquexia impedem seu uso clínico. Uma via alternativa muito promissora, no sentido de eliminar estes efeitos colaterais, parece ser a administração do CNTF conjugado com peptídeos que possuem domínio de translocação de proteínas (PTD-protein transduction domain). Previamente, mostramos que o CNTF conjugado a um PTD derivado da proteína *tat* do vírus HIV-1 (TAT-CNTF) também tem efeito protetor sobre motoneurônios e não produziu efeitos colaterais no tratamento, por 5 dias, de ratos neonatos (P2-P7) que sofreram secção do nervo isquiático. O presente trabalho teve como objetivo investigar se a administração da TAT-CNTF por tempos mais prolongados seria capaz de manter a sobrevivência de motoneurônios e neurônios sensoriais, bem como de estimular a regeneração axonal, sem a ocorrência dos efeitos colaterais do CNTF. Desta forma, ratos Wistar neonatos (P2) receberam tratamento subcutâneo com CNTF (1,2µg/g/dia) durante 5 dias, TAT-CNTF (1,2µg/g/dia) ou PBS durante 5 ou 15 dias. Ao final do período de tratamento os animais foram sacrificados por decapitação, sendo coletado para posterior análise o sangue e gorduras marrom interescapular, branca retroperitoneal e branca epididimal. Um outro grupo de animais teve o nervo isquiático esquerdo esmagado em P2 e recebeu o mesmo tratamento. No período entre 20 e 60 dias de vida foi realizada a avaliação da recuperação funcional motora por meio de *Walking Track Test*, e da recuperação funcional sensitiva através da medida do limiar da resposta de retirada da pata a um estímulo elétrico. No 30º ou 60º dia de vida foi realizada marcação retrógrada de neurônios cujos axônios compõem o nervo isquiático utilizando-se Amina Dextrano Biotinilado (BDA). Após 7 dias, os animais foram sacrificados, sendo coletada a intumescência lombar, os gânglios sensoriais L4 e L5 e o nervo isquiático para análise histológica. As análises dos níveis plasmáticos de glicose, triglicérides e ácidos graxos revelaram que o tratamento com TAT-CNTF ou CNTF por igual período (5 dias) produziu modificações no metabolismo energético em relação aos ratos controle (PBS), contudo diferiram quanto à intensidade dos efeitos produzidos. O tratamento prolongado com TAT-CNTF (15 dias) produziu significantes alterações nas concentrações plasmáticas de triglicérides e de colesterol. Entretanto, o tratamento com TAT-CNTF (5 ou 15 dias) produziu efeitos reduzidos sobre os tecidos adiposos quando comparados ao tratamento com CNTF. Os ratos do grupo TAT-CNTF apresentaram peso corporal significativamente menor que aqueles do grupo PBS a partir do 9º dia de tratamento, porém o grupo CNTF apresentou menor peso a partir do 2º dia. Em ambos tratamentos houve reversão desse efeito sobre o peso corporal, porém esta ocorreu mais precocemente nos ratos do grupo TAT-CNTF (P25) quando comparados ao grupo CNTF (P32). A recuperação funcional motora e sensorial dos grupos CNTF e TAT-CNTF foi 50% superior ao grupo controle. Os grupos CNTF e TAT-CNTF também apresentaram maior número de neurônios sensoriais e motores BDA positivos, além de maior número de axônios mielínicos no nervo isquiático quando comparados ao grupo controle. Nossos resultados mostraram que o tratamento com TAT-CNTF, mesmo por períodos mais longos, promoveu a sobrevivência e regeneração axonal de motoneurônios e neurônios sensitivos sem a ocorrência dos efeitos colaterais produzidos pelo tratamento com CNTF. Além disso, tais propriedades da TAT-CNTF contribuíram significativamente para a recuperação funcional motora e sensorial após lesões nervosas periféricas.

## ABSTRACT

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is known as a neuroprotective agent on motoneurons after peripheral nerve section in neonatal rats and adult mice. However, side effects like weight loss and cachexia have limited its clinical use. A promising approach for the avoidance of such side effects is the fusion of a protein transduction domain (PTD) with CNTF. Previously we showed that CNTF fused with HIV-1 PTD (TAT-CNTF) also had protective effect on motoneurons and did not produce side effects in a 5 days treatment of sciatic nerve transected neonatal rats (P2-P7). The aim of the present work was investigate if the TAT-CNTF administration for long time was capable to support the motoneurons and sensory neurons survival, as well as to stimulate the axonal regeneration, without CNTF side effects. Thus, neonatal Wistar rats (P2) were subcutaneously treated with CNTF (1.2 $\mu$ g/g/day) for 5 days, TAT-CNTF (1.2 $\mu$ g/g/day) or PBS during 5 or 15 days. By the end of treatment rats were killed by decapitation and blood, intrascapular brown adipose tissue and retroperitoneal and epididimal white adipose tissue were collected for further analysis. Another group of animals had the left sciatic nerve crushed (NCE) in P2 and received the same treatment. From 20 to 60 days of age a Walking Track Test was performed in order to evaluate the motor function recovery, and the threshold for paw withdraw was used as a measure of sensitive functional recovery. The retrograde labeling of sciatic nerve neurons using Biotinilated Dextran Amine (BDA) was performed at 30 or 60 days of age. Rats were killed after 7 days and the lumbar enlargement, L4 and L5 dorsal root ganglia and the sciatic nerve were collected for histological analysis. The analysis glucose, triglycerides and fatty acid plasmatic levels demonstrated that 5 days TAT-CNTF or CNTF treatment induced changes in energy metabolism compared to control rats, however the effects of these treatments had different intensities. The long term treatment with TAT-CNTF (15 days) induced important changes in triglycerides and cholesterol plasmatic levels. However TAT-CNTF treatment (5 or 15 days) had reduced effects on adipose tissue when compared to CNTF. After the 9<sup>th</sup> day of treatment the TAT-CNTF group had a smaller body weight when compared to the PBS group, on the other hand the CNTF group had a smaller body weight after the 2<sup>nd</sup> day compared to the PBS group. In both treatments (CNTF and TAT-CNTF) there was a reversion of the body weight effect, however this was earlier in the TAT-CNTF group (P25) than on the CNTF group (P32). The motor and sensorial functional recovery of CNTF and TAT-CNTF groups was 50% greater than the control group. CNTF and TAT-CNTF groups also displayed a greater number of BDA positive motor and sensory neurons, and more myelinic axons in the sciatic nerve compared to the control group. Our results demonstrate that TAT-CNTF long term treatment was able to promote the survival and axonal regeneration of motor and sensory neurons without important CNTF related side effects. Moreover, TAT-CNTF properties had significant contribution for the motor and sensory functional recovery after peripheral nerve lesion.

## 1. INTRODUÇÃO

A investigação de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças neurodegenerativas e neurotraumas recebeu um grande impulso nas últimas décadas em virtude do desenvolvimento de técnicas que permitiram a clonagem de moléculas com reconhecida ação neurotrófica (MORIS E VEGA, 2003). Paralelamente, o emprego de modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, para o estudo de processos neurodegenerativos contribuíram significativamente ao conhecimento dos mecanismos de ação e especificidade dessas moléculas (VANTINI E SKAPER, 1992; DISTEFANO, 1993; LINDSAY E COLS., 1994; RIGGS, 1995; BLESCH E COLS., 1998; NEUHAUS E COLS., 2003; PRADAT, 2003; SALEHI E COLS., 2003)

Os trabalhos pioneiros de Rita Levi-Montalcini e a descoberta de novos fatores neurotróficos revelaram que populações diferentes de neurônios são sensíveis a moléculas neurotróficas diferentes. Este conhecimento permitiu também compreender melhor as causas da eliminação de grande número dos neurônios gerados durante a embriogênese (KUNO, 1990; OPPENHEIM, 1991; KORSCHING, 1993; GORDON, 1995; LEVI-MONTALCINI, 2000; BENNET E COLS., 2002). Em particular, diversos laboratórios obtiveram evidências de que a eliminação de aproximadamente 50% dos neurônios motores, sensitivos e interneurônios espinais gerados durante a embriogênese seria decorrente, em grande parte, da competição dessas células pelos fatores neurotróficos produzidos por seus respectivos alvos (KASHIHARA E COLS., 1987; KUNO, 1990; SENDTNER E COLS., 1990; OPPENHEIM, 1991; LOWRIE E VRBOVÁ, 1992; DECKWERTH E JOHNSON, 1993; JOHNSON E DECKWERTH, 1993; GREENSMITH E VRBOVÁ, 1996; PETTMANN E HENDERSON, 1998; WHITESIDE E COLS., 1998;

OLIVEIRA E COLS., 1997; SENDTNER, 2000; BECK, 2001; OLIVEIRA E COLS., 2002).

É interessante notar que durante a primeira semana após o nascimento os neurônios motores e sensitivos de ratos e camundongos são particularmente vulneráveis à lesão axonal. Por exemplo, a secção do nervo isquiático de ratos no dia do nascimento leva à morte de aproximadamente 75% dos neurônios sensitivos e de praticamente 100% dos motoneurônios atingidos. A morte neuronal pode ser notada poucas horas após a lesão e acentua-se gradativamente no decorrer dos dias. Contudo, essa vulnerabilidade à axotomia diminui com a idade do animal, ou seja, pode não mais se manifestar nos motoneurônios de animais adultos quando a lesão é produzida relativamente distante do corpo celular (SCHMALBRUCH, 1984,1987A,1987B,1988,1990; LOWRIE E VRBOVÁ, 1992; LOWRIE E COLS., 1994).

Acredita-se que uma possível causa da morte neuronal, induzida pela axotomia durante a primeira semana de vida, seja a grande dependência que estas células - ainda imaturas - tenham dos fatores neurotróficos fornecidos pelo seu respectivo território de inervação. Além disso, durante esse período as células não neurais do nervo, especialmente as células de Schwann, seriam ainda incapazes de prover quantidades adequadas de fatores neurotróficos aos neurônios axotomizados, como ocorre na idade adulta. Embora os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nestes fenômenos ainda não estejam esclarecidos, esta hipótese tem sido corroborada por observações de diferentes laboratórios (KASHIHARA E COLS., 1987; KUNO, 1990; SENDTNER E COLS., 1990; LOWRIE E VRBOVÁ, 1992; SENDTNER E COLS., 1992A,B; YAN E COLS., 1993; FUNAKOSHI E COLS., 1993; FRIEDMAN E COLS., 1995; GREENSMITH E VRBOVÁ, 1996; LOWRIE

E LAWSON, 2000; OLIVEIRA E COLS., 2002).

Sabe-se também que a administração de fatores neurotróficos aos nervos periféricos lesados reduz significativamente a morte de diferentes populações de neurônios, quer em animais neonatos, quer em animais adultos (DA-SILVA E LANGONE, 1989; SENDTNER E COLS., 1992A,B; YAN E COLS., 1992; IP E YANCOPOULOS, 1995; IP E YANCOPOULOS, 1996; VEJSADA E COLS., 1995; LEWIN E BARDE, 1996; SEMKOVA E KRIEGLSTEIN, 1999; YUAN E COLS., 2000; OLIVEIRA E COLS., 2002). Interessantemente, trabalhos recentes mostraram que a lesão do nervo isquiático em ratos, além de provocar morte dos motoneurônios e neurônios sensitivos diretamente afetados pela axotomia, causam também a morte de populações de interneurônios espinais (OLIVEIRA E COLS., 1997; WHITESIDE E COLS., 1998; OLIVEIRA E COLS., 2002). Dentro deste contexto, é importante destacar que a morte de neurônios espinais após axotomia em ratos neonatos parece ocorrer pela ativação de processos apoptóticos, de maneira semelhante ao que se observa durante o desenvolvimento (OPPENHEIM, 1991; PETTMANN E HENDERSON, 1998; LAWSON E LOWRIE, 1998; OLIVEIRA E COLS., 2002).

Corroborando as hipóteses referidas acima, mostramos que a aplicação do fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator neurotrófico ciliar (CNTF) sobre o coto proximal do nervo isquiático de ratos neonatos reduziu significativamente o número de neurônios motores, sensitivos e interneurônios apoptóticos (OLIVEIRA E COLS., 2002). Além disso, o efeito neuroprotetor seletivo do NGF e do CNTF sobre neurônios sensoriais e neurônios motores, respectivamente, manifestou-se também sobre diferentes populações de interneurônios distribuídos nas lâminas de Rexed. Este achado sugeriu que os

interneurônios são troficamente dependentes de seus neurônios alvo e aferentes específicos, e que a aplicação local de fatores neurotróficos sobre nervo lesado pode contribuir para manutenção dos circuitos espinais.

Os fatores neurotróficos podem ser agrupados em classes segundo sua estrutura molecular e tipos de receptores. Por exemplo, na classe das neurotrofinas, cujo protótipo é o NGF encontram-se outras proteínas, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina 3 (NT-3) e a neurotrofina 4/5 (NT-4/5), que atuam sobre diferentes populações de neurônios sensitivos e motores através do receptor p75 e dos receptores de membrana da família tirosina quinase TrkA, TrkB e TrkC (BARBACID, 1994; BOTHWELL, 1995; CHAO, 2003). Por sua vez, na classe das neurocininas, ou neuropoetinas, encontram-se o CNTF e o fator inibidor de leucemia (LIF), moléculas altamente relacionadas com as citocinas, e a própria interleucina 6 (IL-6). Estas atuam sobre diferentes populações de neurônios através de receptores compostos por multisubunidades, dentre as quais está sempre presente a subunidade gp130. (STALH E YANCOPOULOS, 1994; INOUE E COLS., 1996; IP E YANCOPOULOS, 1996).

O CNTF foi inicialmente identificado como um fator capaz de garantir a sobrevivência de neurônios parassimpáticos do gânglio ciliar de pintainho (VARON E COLS., 1979). Posteriormente, o estudo da sua expressão, purificação e clonagem foram realizados por diferentes autores (BARBIN E COLS., 1984; MANTHORPE E COLS., 1986; STOCKLI E COLS., 1989; LIN E COLS., 1989; NEGRO E COLS., 1991A,B). Atualmente sabe-se que o CNTF é produzido por células de Schwann associadas a fibras mielínicas e por subpopulações de astrócitos, sendo amplamente distribuído no sistema nervoso central (STOCKLI E COLS., 1991; FRIEDMAN E COLS., 1992; RENDE E

COLS., 1992; HANDERSON E COLS., 1994; KIRCH E HOFMANN, 1994; RICHARDSON, 1994). Além disso, essa molécula é capaz de promover a sobrevivência de uma variedade de populações de células nervosas e de atuar na proliferação e diferenciação de células gliais no sistema nervoso central durante o desenvolvimento (HUGHES E COLS., 1988; LILLIEN E RAFF, 1990; LILLIEN E COLS., 1990; STOCKLI E COLS., 1991).

Ao longo dos últimos anos foram obtidas diversas evidências que reforçam a hipótese de que o CNTF desempenha um papel importante na resposta do tecido nervoso à lesão (THOENEN, 1991; SENDTNER E COLS., 1997). Neste sentido, observou-se que após lesões no sistema nervoso central ou periférico são desencadeadas dramáticas alterações nos níveis de CNTF nas regiões afetadas. Lesões mecânicas provocadas no cérebro, por exemplo, levam a um expressivo aumento na quantidade de mRNA para CNTF bem como da própria proteína no local lesionado (IP E COLS., 1993; ASADA E COLS., 1995). Interessantemente, este aumento na expressão do mRNA para CNTF foi localizado em astrócitos reativos presentes no tecido cicatricial originado no local da lesão (RUDGE E COLS., 1992; IP E COLS., 1993; HENDERSON E COLS., 1994B; ASADA E COLS., 1995). Desta forma, é possível que o CNTF tenha uma dupla função no processo pós-lesional, atuando como molécula trófica para os neurônios e como estimulador de resposta glial (RUDGE E COLS., 1992; WINTER E COLS., 1995; DALLNER E COLS., 2002).

No sistema nervoso periférico íntegro são detectados altos níveis de mRNA para CNTF e desta proteína no citoplasma das células de Schwann (STOCKLI E COLS., 1991; RENDE E COLS., 1992; FRIEDMENN E COLS., 1992). Porém, após uma lesão

traumática de nervos periféricos os níveis de mRNA para CNTF diminuem drasticamente no coto distal e aumenta a quantidade desta proteína no espaço extracelular (SMITH E COLS., 1993). Desta forma acredita-se que o CNTF estocado nas células de Schwann seja abundantemente liberado em resposta à lesão para atuar como um agente neuroprotetor rápido (FRIEDMAN E COLS., 1992; SENDTNER E COLS., 1992C; SMITH E COLS., 1993). Tem-se também evidências que o CNTF possa ser internalizado e retrogradamente transportado pelos axônios até o corpo celular após uma lesão nervosa periférica, assim como outros fatores neurotróficos (SENDTNER E COLS., 1990; CURTIS E COLS., 1993). É interessante notar que as células de Schwann passam a expressar novamente CNTF à medida que estabelecem contatos com os axônios em crescimento durante o processo regenerativo do nervo (SENDTNER E COLS., 1992C; LEE E COLS., 1995).

O CNTF despertou grande interesse com a descoberta de seu efeito neuroprotetor sobre motoneurônios espinais após secção de nervos periféricos em ratos neonatos e em modelos experimentais de neuropatologias motoras (HAGG E COLS., 1992; SENDTNER E COLS., 1990; SENDTNER E COLS., 1992A,B; LINDSAY, 1995; KUZIS E ECKENSTEIN, 1996). Particularmente, Sendtner e cols (1990) demonstraram que a aplicação local de CNTF sobre o coto proximal do nervo facial de ratos recém nascidos impede efetivamente a morte de motoneurônios. Adicionalmente, Sendtner e cols. (1992b) observaram que a injeção sistêmica de células geneticamente modificadas para expressar CNTF em camundongos mutantes, que desenvolvem uma neuropatia motora progressiva (*pm/pm*), retardou significativamente a degeneração dos motoneurônios e a manifestação dos sinais clínicos. Essa estratégia experimental empregada por Sendtner e cols. (1992b) foi motivada pelo fato de que o CNTF possui uma vida média plasmática de apenas dois a três

minutos e que assim o animal não necessitasse suportar repetidas injeções diárias (DITTRICH E COLS., 1994). Trabalhos posteriores investigaram a viabilidade da administração sistêmica do CNTF empregando outros modelos experimentais, que permitiram observar a ação neurotrófica do CNTF. Porém, em virtude das doses empregadas, essa ação foi acompanhada de inesperada perda de peso e caquexia (HENDERSON E COLS., 1994A; KWON E GURNEY, 1994; ZHANG E COLS., 1995).

Não obstante os efeitos colaterais observados em animais, a ação protetora do CNTF sobre motoneurônios, confirmada em diversos modelos experimentais de neurotrauma e neurodegeneração, motivou a investigação do possível emprego desse fator neurotrófico no tratamento de doenças neurodegenerativas de seres humanos (SENDTNER E COLS., 1994).

Durante a década passada foram realizados testes clínicos em pacientes com esclerose lateral amiotrófica para verificar a toxicidade, a tolerabilidade e a farmacocinética do CNTF (MILLER E COLS., 1993; BROOKS E COLS., 1993; SENDTNER E COLS., 1994; MILLER E COLS., 1996A,B). O estudo multicêntrico relatado por Miller e cols. (1996b) revelou efeitos colaterais importantes associados às diferentes doses e esquemas de tratamento com CNTF recombinante humano. Particularmente, assim como nos animais, a administração de doses acima de 10µg/kg/dia nesses pacientes produziu anorexia e perda de peso, além de estomatite por herpes labial, tosse, aumento de secreções oral e fadiga.

Estes resultados tiveram como consequência a interrupção dos testes clínicos. Por outro lado, além de revelarem outras funções importantes do CNTF (ESPAT E COLS., 1996; MARTIN E COLS., 1996; MATTHYS E BILLIAU, 1997), estimularam a busca de vias alternativas para a administração do CNTF com o objetivo de eliminar os efeitos

colaterais indesejáveis (TAN E COLS., 1995; AEBISCHER E COLS., 1996; PENN E COLS., 1997; HAASE E COLS., 1999; BACHOU-LEVI E COLS., 2000).

Uma via alternativa muito promissora parece ser a administração do CNTF conjugado com peptídeos que possuem um domínio de transdução ou translocação de proteínas (PTD-*protein transduction domain*). Proteínas que possuem esse domínio são capazes de cruzar a membrana celular através de mecanismos independentes de receptores específicos (SCHWARZE E COLS., 1999, 2000; BECKER-HAPAK E COLS., 2001).

A translocação de proteínas para o interior de células foi descrita independentemente por Green e Loewenstein (1988) e por Frankel e Pabo (1988) com a descoberta que a proteína TAT do vírus HIV poderia atravessar membranas celulares e transativar o genoma viral. Em 1994, Fawell e cols., demonstraram que proteínas heterólogas ligadas a uma seqüência de 36 aminoácidos da TAT, contendo o domínio PTD, eram capazes de serem translocadas para o interior de células. Subseqüentemente à descoberta destas propriedades da TAT do HIV outras proteínas com domínios de transdução foram identificadas: a proteína Antenapedia (Antp) da *Drosophila* (Derossi e cols., 1994) e a proteína HSV VP22 do vírus herpes simples (ELLOIT E O'HARE, 1997). É importante mencionar que o domínio de translocação originalmente identificado na TAT do HIV não contém material infeccioso (BECKER-HAPAK E COLS., 2001).

Uma grande variedade de tipos de células em cultura, primária ou transformada, foi utilizada para estudos de translocação de proteínas ligadas a uma seqüência de aminoácidos contendo o PTD da TAT do HIV (NAGARA, 1998; LISSY E COLS., 1998, HO E COLS., 2001). Os estudos *in vivo*, mais recentes na sua maioria, geraram dados particularmente importantes no que refere ao possível emprego desta estratégia para fornecer proteínas

neurotróficas ao sistema nervoso central com finalidade terapêutica. Foi demonstrado que a seqüência PTD da TAT do HIV acoplada a proteínas relativamente grandes é capaz de levá-las a cruzarem a barreira hematoencefálica e de translocá-las para o interior de células do tecido nervoso central (SCHWARZE E COLS., 1999; SCHWARZE E DOWDY, 2000; CAO E COLS., 2002; KILIC E COLS., 2003). Particularmente, Kilic e cols. (2003) demonstraram, pela primeira vez, que a administração endovenosa de um fator neurotrófico acoplado a uma seqüência de 11 aminoácidos contendo o PTD da TAT do HIV pode ser uma poderosa estratégia terapêutica de neuroproteção no tratamento focal de isquemia cerebral.

Conforme já considerado, a axotomia produzida pela secção do nervo isquiático em animais neonatos induz acentuada morte de motoneurônios e neurônios sensitivos espinais. Pela sua reprodutibilidade este modelo experimental é muito útil para investigar a possível ação neuroprotetora de diferentes moléculas *in vivo* (VEJSADA E COLS., 1995). Em particular, sabe-se que a administração local e sistêmica de CNTF mostrou ser eficaz na proteção dos neurônios motores neste modelo (VEJSADA E COLS., 1995; OLIVEIRA E COLS., 2002).

Nos últimos anos, o laboratório do Dr. Alessandro Negro (*Centro di Ricerche in Biotecnologie Innovative* da Universidade de Padova, Itália) construiu uma proteína composta pelo CNTF acoplado a uma seqüência de 15 aminoácidos contendo o PTD da TAT do HIV (TAT-CNTF). Essa molécula foi capaz de internalizar-se rapidamente em cultura de células ovarianas de hamster chinês (CHO). De fato, após 1 hora de tratamento destas células com CNTF ou TAT-CNTF foi possível verificar, através de imunocitoquímica, a presença de CNTF apenas nas células tratadas com TAT-CNTF

(REZENDE E COLS., 2009). Recentemente, demonstramos que a administração local e sistêmica da TAT-CNTF em ratos neonatos foi capaz de promover a sobrevivência de aproximadamente 70% dos motoneurônios axotomizados pela secção do nervo isquiático (LANGONE E COLS., 2004; REZENDE E COLS., 2009). Além disso, esse efeito neuroprotetor da TAT-CNTF foi similar ao produzido pelo CNTF e não foi acompanhado pela intensa mobilização de gordura marrom e pelo baixo crescimento corporal produzido por este último. Estes resultados foram particularmente importantes, pois deram suporte à suposição de que a TAT-CNTF possa ser utilizada como agente protetor de motoneurônios passíveis de degeneração sem a ocorrência de efeitos colaterais. Por outro lado, embora os experimentos tenham sido realizados durante um período pós-natal particularmente importante para a maturação do sistema nervoso, especialmente para os motoneurônios (LOWRIE E VRBORÁ, 1992; LOWRIE E COLS., 1994), nossas observações abrangeram um período de tempo relativamente curto, com apenas 5 dias entre a lesão (P2) e o sacrifício dos animais (P7). Além disso, no modelo empregado não permitimos a regeneração axonal, pois seccionamos o nervo isquiático desses animais. Assim, estão em aberto várias questões importantes na investigação das propriedades da TAT-CNTF como agente neurotrófico.

Sabe-se, por exemplo, que o CNTF, além de atuar como um fator neuroprotetor para motoneurônios após axotomia periférica, é capaz de promover a regeneração do nervo, estimulando o brotamento e o crescimento axonal (SAHENK E COLS. 1994; NEWMAN E COLS., 1996; SIEGEL E COLS., 2000; ZHANG E COLS. 2004). Além disso, vários autores mostraram que o CNTF tem importante efeito protetor sobre músculos denervados, bem como sobre o processo de reinervação muscular (GURNEY E COLS., 1992; HELGREN E COLS., 1994; HIRUMA E COLS., 1997; HUANG E COLS., 2002;

ENGLISH, 2003). A par disto, diversos estudos verificaram que o CNTF parece ser importante para impedir a morte de neurônios sensoriais espinais durante o desenvolvimento pós-natal e após axotomia (APFEL E COLS., 1993; LO E COLS., 1995; SIMON E COLS., 1995; TOLOSANO E COLS., 1996).

Dentro deste contexto, a consideração do uso do CNTF no tratamento de lesão nervosas periféricas traumáticas é especialmente atraente. Contudo, pelo já exposto, a administração do mesmo por tempo prolongado para o tratamento deste tipo de lesões é inviável. Assim, o presente trabalho investigou se a administração da TAT-CNTF por tempos mais prolongados foi capaz de manter a sobrevivência de motoneurônios e neurônios sensoriais, bem como estimular a regeneração axonal, sem a ocorrência dos efeitos colaterais importantes relacionados ao CNTF.

## **2. OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivo geral ampliar o conhecimento sobre as propriedades neurotróficas da TAT-CNTF e dar subsídios básicos para o emprego desta molécula como agente terapêutico em patologias neurodegenerativas e em lesões nervosas periféricas.

### **Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito da administração sistêmica do CNTF e da TAT-CNTF:

**1** – Sobre o peso corporal, o tecido adiposo, a glicemia e as concentrações plasmáticas de triglicérides, ácidos graxos livres e colesterol em ratos durante o desenvolvimento pós-natal (P2-P17).

**2** – Sobre a recuperação funcional motora e sensitiva após o esmagamento do nervo isquiático de ratos neonatos (P2).

**3** – Na sobrevivência de neurônios motores e sensitivos espinais, e sobre a regeneração axonal após 30 e 60 dias do esmagamento do nervo isquiático de ratos neonatos (P2).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e grupos experimentais

Foram empregados ratos Wistar com idade de dois dias (P2) adquiridos previamente do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Os animais foram deixados junto com a mãe durante todo o período de amamentação e aqueles que tiveram sobrevivência maior que 21 dias foram separados de acordo com o sexo a partir do 22º dia. As condições de luz (ciclo de 12:12 horas de claro/escuro) e de temperatura (21°C) foram controladas e os animais tinham livre acesso à água e ração.

Os animais foram divididos em 22 grupos (n=169), de acordo com o tratamento e tempo de sobrevivência (Tabelas 1, 2 e 3). Os procedimentos de manipulação experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA), e aprovadas pelo comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biologia da Unicamp (Proc.1851-1).

**TABELA 1: Animais destinados as análises do metabolismo energético e morfometria do tecido adiposo (machos e fêmeas)**

GRUPOS (n=102)	TRATAMENTO			Duração do tratamento	Idade ao final do experimento(dias)
	CNTF Subcutâneo 1,2µg/gr/dia	TAT-CNTF Subcutâneo 1,2µg /gr/dia	PBS (0,1M) Subcutâneo		
1.1 (n=12)	X			5 dias	7
1.2 (n=11)		X		5 dias	7
1.3 (n=08)	X			5 dias	17
1.4 (n=08)		X		15 dias	17
1.5 (n=11)			X	5 dias	7
1.6 (n=11)			X	15 dias	17
1.7 (n=11)		X		5 dias	17
1.8 (n=10)			X	5 dias	17
1.9 (n=10)	-	-	-	5 dias	7
1.10 (n=10)	-	-	-	15 dias	17

**TABELA 2: Animais destinados as análises da sobrevivência e regeneração neuronal (somente os animais machos)**

GRUPOS (n=34)	LESÃO	TRATAMENTO			Duração do tratamento	Idade ao final do experimento (dias)
		CNTF Subcutâneo 1,2µg/gr/dia	TAT-CNTF Subcutâneo 1,2µg /gr/dia	PBS (0,1M) Subcutâneo		
2.1 (n=05)	X	X			5 dias	37
2.2 (n=06)	X		X		5 dias	37
2.3 (n=05)	X		X		15 dias	37
2.4 (n=06)	X			X	5 dias	37
2.5 (n=06)	X			X	15 dias	37
2.6 (n=06)	Não	---	---	---	---	37

**TABELA 3: Animais destinados as análises da recuperação funcional motora e sensitiva, sobrevivência e regeneração neuronal (somente os animais machos)**

GRUPOS (n=33)	LESÃO	TRATAMENTO			Duração do tratamento	Idade ao final do experimento (dias)
		CNTF Subcutâneo 1,2µg/gr/dia	TAT-CNTF Subcutâneo 1,2µg /gr/dia	PBS (0,1M) Subcutâneo		
3.1 (n=05)	X	X			5 dias	67
3.2 (n=05)	X		X		5 dias	67
3.3 (n=06)	X		X		15 dias	67
3.4 (n=06)	X			X	5 dias	67
3.5 (n=05)	X			X	15 dias	67
3.6 (n=06)	Não	---	---	---	---	67

### 3.2 Procedência do CNTF e TAT-CNTF

As moléculas de CNTF e TAT-CNTF foram fornecidas pelo Dr. Alessandro Negro, do *Centro di Biotecnologie Innovative (CRIBI)* da Universidade de Padova (PD, Itália). A proteína CNTF foi produzida a partir da clonagem de cDNA para o CNTF humano, segundo descrito por Negro e cols. (1991). Por sua vez, a TAT-CNTF foi obtida a partir da construção de um vetor de expressão de bactéria *E. coli* capaz de expressar a proteína CNTF humana fundida à seqüência TAT, formada por 15 aminoácidos. Esta seqüência contém o domínio PTD que permite a translocação da proteína TAT do HIV para o interior das células. Ambas proteínas CNTF e TAT-CNTF se mostraram homoganeamente puras, quer em gel de eletroforese, quer em HPLC analítico, e possuem pesos moleculares de 24Kda e 28Kda, respectivamente.

### 3.3. Procedimentos cirúrgicos para esmagamento do nervo isquiático

Os animais foram anestesiados por hipotermia e imediatamente posicionados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos, M90). A pele da coxa esquerda foi incisada e, afastando-se a musculatura, o nervo isquiático foi exposto. Com auxílio de microtesoura (Vannas, Steel Inox-S.OF3212) o nervo foi dissecado até sua emergência no forame isquiático, onde foi esmagado.

Para o esmagamento do nervo foi empregada uma pinça invertida de ponta fina, desenhada especialmente para a padronização desse procedimento. O nervo foi esmagado por 30 segundos. Após o esmagamento o nervo foi examinado em grande aumento (24X) para avaliar a integridade do epineuro, sendo descartados aqueles animais que apresentarem evidente interrupção anatômica do mesmo. Ao final, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada com fio de seda 8-0 (Ethicon). Os animais foram colocados em local aquecido até despertarem da anestesia e serem devolvidos à mãe. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no mesmo período do dia, entre 13 e 14 horas.

#### **3.4. Tratamento dos animais**

O tratamento dos animais que sofreram esmagamento do nervo isquiático (Tabelas 2 e 3) começou com a aplicação da primeira dose de CNTF, ou TAT-CNTF, 30 minutos antes da cirurgia. A segunda dose foi aplicada imediatamente após a lesão e a terceira dose 2 horas depois. A partir do dia seguinte, o tratamento seguiu com uma dose única diária, administrada no mesmo horário (13 horas), durante 5 ou 15 dias (vide Tabelas 2 e 3). Os animais dos grupos controle receberam doses equivalentes de PBS (0,1M), obedecendo-se o mesmo protocolo de tratamento.

As doses empregadas foram escolhidas com base nos resultados por nós obtidos em experimentos anteriores (OLIVEIRA E COLS., 2002; LANGONE E COLS., 2004; REZENDE, 2005; REZENDE E COLS., 2008) e de acordo com o relatado por outros autores em experimentos similares (SENDTNER E COLS., 1990; DITTRICH E COLS., 1994; KWON E GURNEY, 1994; YUAN E COLS., 2000). O tempo de tratamento prescrito para os animais que sofreram esmagamento do nervo foi determinado a partir de experimentos prévios. A interrupção do tratamento com CNTF (1,2µg/gr) após 5 dias se deve à constatação de que esses animais

apresentam significativa redução no crescimento quando comparados aos animais que recebem TAT-CNTF e aos animais controle (LANGONE E COLS., 2004; REZENDE, 2005). O prolongamento do tratamento por 15 dias poderia acarretar a morte dos mesmos. Por sua vez, a interrupção do tratamento com TAT-CNTF no 15º dia foi definida considerando que após esse período os axônios em regeneração já atingiram seu tecido alvo, do qual passam a ter suporte trófico (HARDING E COLS., 1996; GORIO E COLS., 1998; VERGAMI E COLS., 1998). As quantidades de CNTF e TAT-CNTF foram às mesmas nas condições experimentais levando-se em conta as molaridades das moléculas.

Os animais que não sofreram esmagamento do nervo isquiático (Tabela 1) foram submetidos ao mesmo protocolo de tratamento dos animais lesados, conforme descrito acima e segundo o grupo a que pertencerem.

### **3.5. Avaliação do efeito do tratamento**

#### **3.5.1 Evolução ponderal**

Todos os animais foram pesados diariamente a partir da idade P2 e durante 15 dias, com exceção dos animais dos grupos 1.1, 1.2 e 1.5 (Tabela 1). Após esse período, os animais que foram sacrificados com idade de 35 e 65 dias (Tabelas 2 e 3) passaram a ser pesados semanalmente. Os procedimentos para pesagem foram realizados sempre no mesmo horário, entre as 13 e 14 horas.

A avaliação estatística do ganho de peso corporal foi realizada por meio da análise da variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, seguida do teste de Duncan.

#### **3.5.2 Dosagem da glicemia e das concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol e ácidos graxos livres**

Nos animais dos grupos 1.1, 1.2, 1.5 a 1.9 a dosagem da glicemia e dos níveis de

triglicérides, ácidos graxos e colesterol plasmáticos foi realizada após os animais ficarem por 1 hora em jejum antes do sacrifício. Sendo que os animais com 17 dias de vida (grupos 1.3, 1.4, 1.6, 1.7, 1.8 e 1.10) permaneceram em jejum de 12 horas.

O sangue foi coletado em capilares heparinizados após decapitação sempre no período da manhã, centrifugado (12.000 rpm; 4°C) e o plasma armazenado a -80°C para posteriores dosagens das concentrações plasmáticas de glicose, triglicérides, ácidos graxos e colesterol.

Os valores obtidos foram analisados estatisticamente através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste Student-Newman-Keuls.

### **3.5.3 Procedimento para dosagem de glicose em microplaca**

A dosagem da glicemia foi realizada utilizando-se o método colorimétrico enzimático, desenvolvido em microplaca com 96 poços. Em cada placa, 3 poços foram preenchidos apenas com o reativo de trabalho fornecido pelo fabricante (Cat. no. 02200; Laborlab), outros 7 poços foram destinados para a construção da curva-padrão, sendo depositado em cada um deles 20, 40, 60, 80, 100, 150 e 200 mg/dL de glicose, seguido de 200µL do reativo. Os poços restantes receberam 20µL das amostras de plasma diluídas 10x, em triplicata, e 200µL do reativo. Após 30 minutos da adição do reagente, foi registrada a absorbância em Leitor de ELISA, empregando-se comprimento de onda igual à 492nm. Todos os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente.

### **3.5.4 Procedimento para dosagem de triglicérides em microplaca**

As dosagens de triglicérides plasmáticos foram realizadas pelo método colorimétrico enzimático desenvolvido em microplaca com 96 poços, utilizando-se o teste TG/Triglycerides

GPO-PAP (Roche Diagnostics). Em cada placa, 3 poços foram preenchidos apenas com o reativo de trabalho fornecido pelo fabricante (Cat. No. 11488872), outros 7 poços foram destinados para a construção da curva-padrão, sendo depositado em cada um deles 30, 60, 120, 150, 300, 400 e 600 mg/dL de Glicerina (Sigma) dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%), seguido de 200µL do reativo. Os poços restantes receberam 2µL das amostras de plasma, em triplicata, e 200µL do reativo. Após a adição do reativo às placas foram mantidas durante 15 minutos em estufa a 37°C. A seguir, foi registrada a absorbância em Leitor de ELISA, empregando-se comprimento de onda igual à 492nm.

### **3.5.5 Procedimento para dosagem de colesterol em microplaca**

As dosagens de colesterol plasmático foram realizadas pelo método colorimétrico enzimático desenvolvido em microplaca com 96 poços, utilizando-se o teste CHOL/ Cholesterol CHOD-PAP (Roche Diagnostics). Em cada placa, 3 poços foram preenchidos apenas com o reativo de trabalho fornecido pelo fabricante (Cat. No. 11489232), outros 6 poços foram destinados para a construção da curva-padrão, sendo depositado em cada um deles 25, 50, 100, 200, 400 e 600mg/dL de colesterol (Sigma) dissolvido em álcool isopropílico, seguido de 200µL do reativo. Os poços restantes receberam 4µL das amostras de plasma, em triplicata, e 200µL do reativo. Após a adição do reativo às placas foram mantidas durante 15 minutos em estufa a 37°C. A seguir, foi registrada a absorbância em Leitor de ELISA, empregando-se comprimento de onda igual à 492nm.

### **3.5.6 Procedimento para dosagem de ácidos graxos livres em microplaca**

As dosagens de ácidos graxos livres plasmáticos foram realizadas pelo método colorimétrico enzimático desenvolvido em microplaca com 96 poços, utilizando-se o teste Wako

NEFA C (Cat. No. 994-75409, Wako Chemichals). Em cada placa, 2 poços foram preenchidos apenas com o reativo A (50 $\mu$ L; ACS, AOD, CoA, ATP, 4-aminoantipirina, MgCl<sub>2</sub>, surfactante, estabilizante, tampão fosfato) e reativo B (100 $\mu$ L; ACOD, POD, MEHA, surfactante), outros 6 poços foram destinados para a construção da curva-padrão sendo depositado em cada um deles 25, 50, 100, 200, 400 e 600 mM de ácido oléico, seguido da adição dos reativos A e B, de acordo com os tempos referidos abaixo. Os poços restantes receberam 2 $\mu$ L das amostras de plasma, em duplicata, e 50 $\mu$ L de reativo A. Após 15 minutos da adição do reativo A, foram adicionados 100 $\mu$ L do reativo B e 30 minutos depois foi registrada a absorbância em Leitor de ELISA, empregando-se comprimento de onda igual à 540nm. Todos os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente.

### **3.6 Recuperação funcional motora e sensitiva**

A recuperação funcional motora e sensitiva foi avaliada 20, 30, 45 e 60 dias após o esmagamento do nervo isquiático nos animais dos grupos 3.1 a 3.5 (Tabela 3).

*A avaliação da recuperação motora* foi realizada através do “Walking Track Test” (WTT) empregando-se a metodologia proposta por Dijkstra e cols. (2000), com adaptações adequadas para nosso estudo. Para a realização do WTT foi construída uma trilha em acrílico (30 x 15 x 100 cm) com um espelho posicionado a 45° abaixo da mesma, permitindo a visualização da marcha e a dimensão das pegadas das patas do animal. Numa das extremidades da trilha foi posicionada a entrada de uma caixa com baixa luminosidade no seu interior. Ao serem colocados na extremidade livre da trilha e voltados para caixa, os animais caminhavam espontaneamente em direção a ela, permitindo assim o registro da marcha. Este procedimento foi realizado três vezes para cada animal. Os registros de vídeo foram obtidos empregando-se uma câmera de vídeo Sony

(DCR-SR42), capaz de registrar 30 quadros por segundo posicionada a 50 cm da trilha e conectada diretamente a um microcomputador (Figura 1 A, B, C e D). Vale ressaltar que antes dos testes, os animais foram deixados na trilha de teste por 5 minutos para ambientação.

Contudo, para padronização e validação dos dados obtidos com o procedimento descrito acima, que chamaremos de *Vídeo Walking Track Test* (V-WTT), foi também realizado o teste empregando o método mais frequentemente referido na literatura, que chamaremos WTT. Ou seja, a plataforma da trilha foi coberta com papel branco contínuo (1,0 m; gramatura=70g/m<sup>2</sup>) e as pegadas do animal foram registradas tingindo-se a patas com tinta de impressão digital. Para isso, animais tiveram as patas traseiras levemente pressionadas contra uma almofada de carimbo contendo tinta de impressão digital e, a seguir, foram posicionados na extremidade livre da trilha (Figura 1 E). Este procedimento foi realizado três vezes para cada animal.

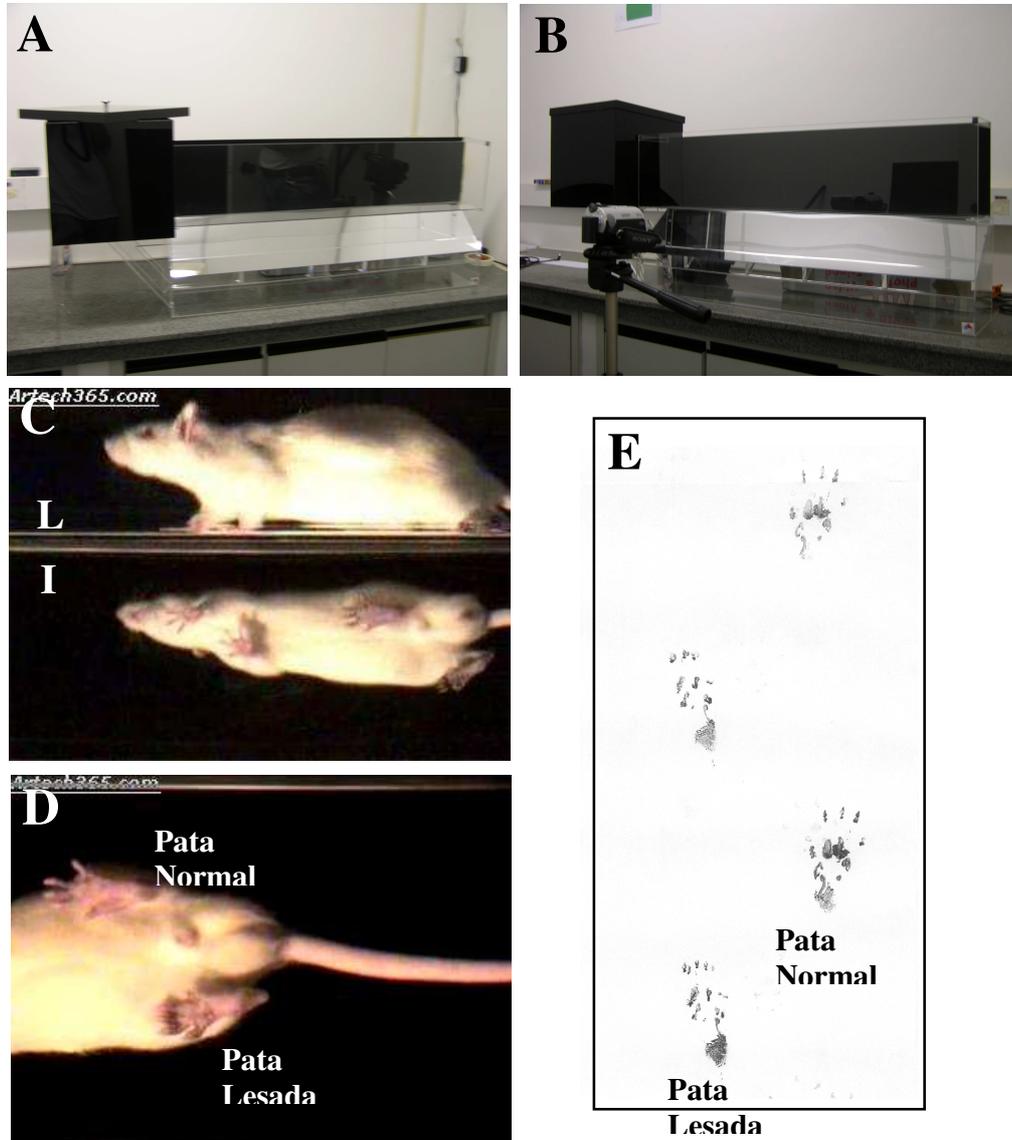
A partir das imagens das pegadas do animal, registradas em três seqüências sucessivas de marcha, foi feita a medida dos seguintes parâmetros: PL=comprimento total da pegada, TS=distância entre o 1° e o 5° artelho e IT=distância entre o 2° e o 4° artelho. Estes parâmetros foram obtidos empregando-se o programa analisador de imagens SigmaScam Pro (V 5.0). Os valores obtidos das patas do lado normal (n) e do lado operado (e) foram introduzidos na fórmula abaixo, a qual forneceu o índice de recuperação funcional decorrente da regeneração do nervo isquiático (SFI, da expressão em inglês *Sciatic Function Index*):

$$\text{SFI} = -38,3(e\text{PL}-n\text{PL} / n\text{PL}) + 109,5(e\text{TS}-n\text{TS} / n\text{TS}) + 13,3(e\text{IT}-n\text{IT} / n\text{IT}) - 8,8$$

O SFI correspondeu a um valor percentual negativo que indicou o quanto a recuperação funcional da marcha da pata operada estava aquém do valor controle (correspondente à pata contralateral).

Esta avaliação foi realizada após 20, 30, 45 e 60 dias após o esmagamento do nervo

isquiático e os valores de SFI obtidos foram analisados através da análise da variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, seguida do teste de Duncan.



**Figura 1:** Avaliação da recuperação funcional motora através *Walking Track Test* (WTT). A figura **A** mostra a trilha de teste com espelho fixado a 45° abaixo da mesma. Em **B** mostra-se o posicionamento da câmera de vídeo digital para o registro da marcha do animal para posterior análise. A figura **C** mostra um quadro da filmagem onde é possível observar, na vista lateral (L), o posicionamento pata posterior esquerda (lesada) e, na vista inferior (I), as pegadas das patas posteriores refletidas pelo espelho. Em **D** pode-se observar, em maior aumento, a área de contato da pata com superfície da trilha na fase de apoio da marcha. A figura **E** mostra o registro das pegadas das patas posteriores de um animal obtidas tingindo-se a patas com tinta de impressão digital; método classicamente empregado para o WTT. As imagens acima foram obtidas com um animal de 62 dias de idade em que o nervo isquiático esquerdo foi esmagado idade P2.

*A avaliação da recuperação da sensibilidade* foi realizada investigando-se a resposta de retirada da pata e o afastamento dos artelhos provocados pela estimulação elétrica na região plantar da pata operada do animal (DE KONING E COLS., 1986; DIJKSTRA E COLS., 2000; IJKEMA-PAASSEN E COLS., 2004). Para isso o animal foi mantido com as patas voltadas para o experimentador e, empregando-se um estimulador elétrico projetado e construído pelo Eng. Paulo Wong Chan, então aluno do último ano do curso de Engenharia Elétrica da PUC-Campinas, a região plantar da pata do animal foi estimulada eletricamente.

Esse estimulador gera pulsos de onda quadrada com largura de pulso fixa em 1 ms, que podem ser disparados nas frequências de 0,5 à 50Hz. A corrente aplicada pode variar de 0,22mA a 5mA, considerando-se uma impedância de 100kOhms. A aplicação do estímulo na região plantar da pata do rato é feita a partir de dois eletrodos de cobre recobertos por prata, com 1 mm de diâmetro e distanciados em 3 mm. Os mesmos estão acoplados a um dispositivo aplicador dos estímulos que permite o controle da frequência dos pulsos (Figura 2). Ao se pressionar os eletrodos contra a pata do animal o estimulador faz a leitura da corrente que flui entre eles. Com base na impedância da pata, o estimulador vai aumentando, automática e gradualmente, a tensão e a corrente entre os dois eletrodos. Os incrementos são realizados a cada pulso e o valor da corrente aplicada é continuamente informado por um visor de cristal líquido (LCD) localizado no painel frontal do equipamento (Figura 2). Quando o estímulo atinge a intensidade que gera resposta de retirada da pata o circuito entre os eletrodos é interrompido e valor da corrente aplicada (limiar) é registrado. A frequência de estímulo foi sempre igual a 3 Hz em todas as avaliações. A escolha desse valor foi determinada a partir experimentos piloto. Nestes experimentos observamos que o tempo para atingir o limiar de resposta era maior quando

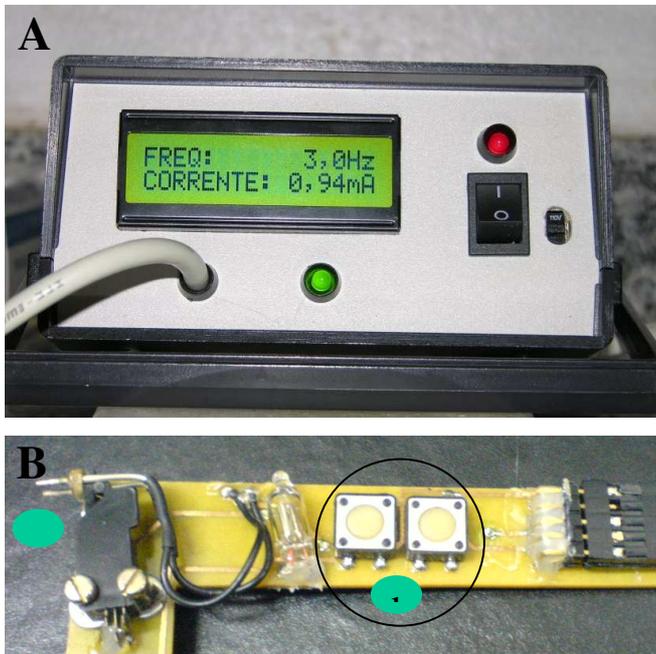
os estímulos tinham frequências inferiores a 3 Hz, fato que dificultava a contenção dos animais e, conseqüentemente os registros. Por outro lado, frequências mais altas geralmente diminuía a precisão dos mesmos.

Analisando os territórios de inervação da região plantar, observa-se que suas porções central e lateral são inervadas pelos nervos tibial e sural, respectivamente, ao passo que a porção medial é inervada pelo nervo safeno que é ramo do nervo femoral. Além disso, quando é realizada a denervação sensitiva das demais regiões, pelo esmagamento ou secção do nervo isquiático, o território inervado pelo nervo tibial pode ser invadido por brotamentos do nervo safeno antes da sua reinervação (DEVOR E COLS. 1979). Por sua vez, o território correspondente ao nervo sural parece ser preservado dessa invasão (DE KONING E COLS., 1986).

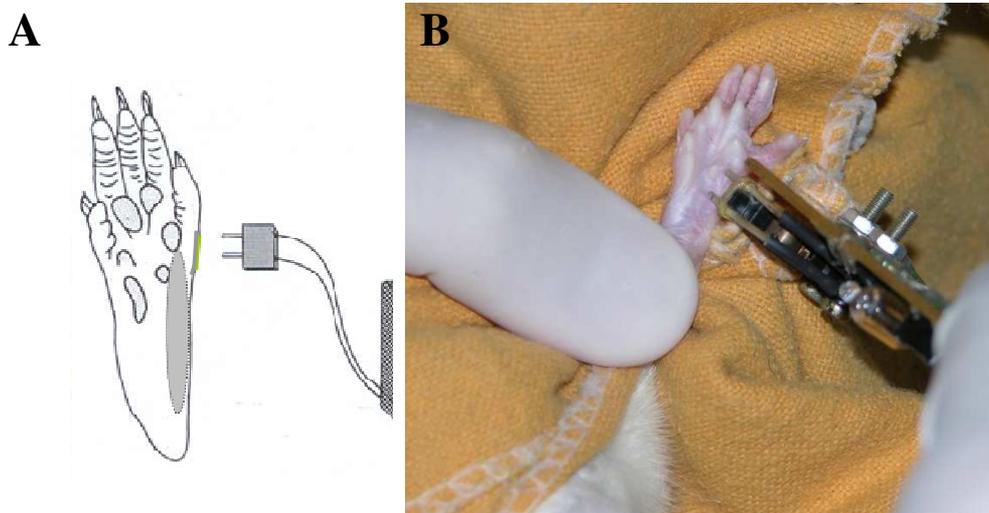
Assim sendo, padronizamos a avaliação da recuperação sensitiva estimulando somente na região plantar lateral da pata, que corresponde à região inervada exclusivamente pelo nervo sural (DE KONING E COLS., 1986) (Figura 3). Os procedimentos foram sempre realizados pelo mesmo experimentador sem conhecimento prévio do grupo avaliado, sendo o mesmo animal avaliado por 3 vezes com intervalos de 15 minutos em cada sessão de estimulação. A média dos valores obtidos em cada sessão foi considerada como o valor do estímulo limiar indicador da recuperação funcional da sensibilidade (RFS). A avaliação estatística dos valores de RFS foi realizada pela análise da variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, seguida do teste de Duncan.

Esta avaliação também foi realizada após 20, 30, 45 e 60 dias após o esmagamento do nervo isquiático. Para a obtenção do valor RFS em condições de não lesão foram utilizados os

animais íntegros do grupo 3.6 da Tabela 3 e não o lado contralateral dos animais operados, a fim de evitar um possível efeito de aprendizagem da resposta nestes últimos.



**Figura 2:** Estimulador elétrico desenvolvido para avaliação da recuperação funcional sensitiva. Em **A** pode-se observar no visor de cristal líquido (LCD) a frequência dos estímulos, estabelecida em 3 Hz, e a intensidade da corrente limiar necessária para a resposta de retirada da pata apresentada pelo rato. Em **B** observa-se o dispositivo aplicador de estímulos, constituído por dois eletrodos (a) acoplados a um sistema de controle de liberação do estímulo e controle da frequência (b).



**Figura 3:** Em **A** pode se observar o esquema representativo da região estimulada na pata esquerda do rato, innervada pelo nervo sural. Em **B** observa-se o posicionamento dos eletrodos sobre na pata do animal para a aplicação do estímulo elétrico.

### **3.7 Análise Histológica**

#### **3.7.1 Sobrevivência neuronal e regeneração axonal após esmagamento do nervo isquiático**

Após 30 e 60 dias da lesão, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e cloridrato de xilazina (100mg/kg; 10mg/kg; i.p.) e tiveram o nervo isquiático esquerdo dissecado até altura da fossa poplíteia e seccionado na altura do terço distal da coxa. Na extremidade do coto proximal foi implantado um tubo de polietileno contendo uma solução de Amina Dextrano Biotinilado (BDA, 20% em tampão citrato de sódio). Segmentos dos nervos tibial, fibular e sural foram removidos separadamente do coto distal e depositados em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2% e formaldeído 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4), para posterior processamento e inclusão em resina histológica. Os grupos dos animais íntegros (grupos 2.6 e 3.6) foram submetidos aos mesmos procedimentos.

Cinco dias após o implante dos tubos contendo BDA, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 3% (0,1ml/20g, i.p.) e perfundidos com salina 0,9%, seguida de formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Após esse procedimento, os animais foram eviscerados e mantidos na mesma solução fixadora por 24 horas. A seguir a intumescência lombar da medula espinal e os gânglios da raiz dorsal, correspondentes aos segmentos L4, L5 e L6, foram dissecados e mantidos por 24 horas a 4°C em solução de sacarose 30% (tampão fosfato de sódio 0,1 M; pH 7,3). Após este tratamento de crioproteção os espécimes foram congelados em isopentano resfriado com gelo seco (-70°C).

#### **Motoneurônios e Neurônios Sensoriais**

Foram obtidos cortes seriados e longitudinais da intumescência lombar e dos gânglios das raízes dorsais L4 e L5, com 30µm de espessura, empregando-se criostato (Leica CM1850). Os cortes foram coletados em tampão fosfato de sódio (0,1M e pH 7,4) e processados para

evidenciar os motoneurônios e neurônios sensitivos marcados com BDA. Inicialmente, os cortes foram tratados em peróxido de hidrogênio (5ml/100ml de tampão fosfato 0.1M, pH 7.4) durante 10 minutos. A seguir foram lavados com tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) por 30min sob agitação. Após a lavagem os cortes foram incubados com complexo Avidina–Biotina (Vectastain ABC Kit, VECTOR Labs) por período de 1 hora. Ao final desse período os cortes foram lavados tampão fosfato (0,1M; pH 7,4) por 30 minutos e a seguir foram revelados com diaminobenzidina (DAB; 25mg/100ml tampão fosfato 0,1M; pH 7,4) e durante 15 minutos. A adição de peróxido de hidrogênio (200µl) permitiu a visualização dos motoneurônios e neurônios sensitivos contendo BDA. Os cortes foram coletados em lâminas gelatinizadas e contra-corados com Giemsa. Após desidratação dos cortes, as lâminas foram montadas com Entelan (Merck).

A contagem do número total de motoneurônios e neurônios sensitivos sobreviventes após 37 ou 67 dias do esmagamento do nervo isquiático de ratos neonatos em P2 (grupos referentes às Tabelas 2 e 3) foi realizada sem exclusão de células, independente da intensidade da marcação, da visualização do nucléolo ou do tamanho do soma neural. O número total foi corrigido empregando-se a fórmula de Abercrombie (1946):  $N = \frac{n \cdot T}{T + d}$ , onde **N** corresponde ao número corrigido de células, **n** ao número de células contados ao microscópio, **T** à espessura do corte (30µm) e **d** à média dos diâmetros dos corpos celulares dos motoneurônios e neurônios sensitivos. Para a obtenção de **d** foram selecionados 50 neurônios em cada animal aleatoriamente escolhidos na intumescência lombar e nos gânglios L4 e L5. Para isso, foi inicialmente calculado o diâmetro médio de cada motoneurônio empregando-se o programa analisador de imagens SigmaScam Pro (V 5.0). Imagens desses motoneurônios foram obtidas sob objetiva de 40X e o perímetro do seu corpo celular foi contornado manualmente na tela do computador. A seguir, a partir dos

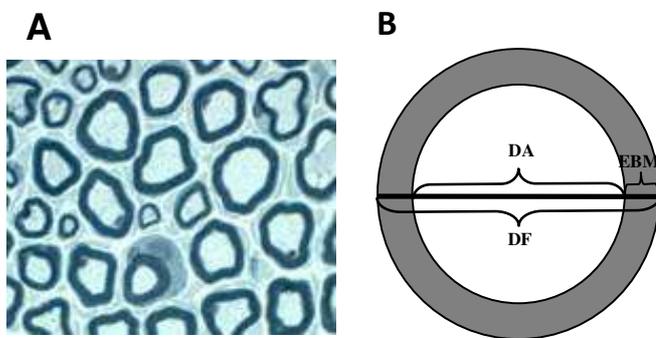
valores do diâmetro maior e diâmetro menor do corpo celular fornecidos pelo programa foi calculado seu diâmetro médio ( $D_m$ ). O valor de  $d$  correspondeu então à média do  $D_m$  dos 50 motoneurônios amostrados aleatoriamente em cada animal.

### **Axônios mielínicos**

Os nervos coletados em solução de Karnovsky foram mantidos nesse fixador por 24 horas a 4°C e a seguir pós-fixados por um período de 2 horas em uma solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato (0,1M; pH 7,4).

Ao final da pós-fixação, os nervos foram lavados em água destilada, desidratados em gradiente crescente de etanol e embebidos em glicolmetacrilato (Historesina Leica). Após a polimerização da resina, foram obtidos cortes transversais semifinos (1 $\mu$ m), com auxílio de um micrótomo (LKB, Bromma 8800), equipado com navalha de vidro. Os cortes foram corados em uma solução aquosa de azul de toluidina (0,5%), desidratados e montados em Entelan. Os cortes foram digitalizados, sob objetiva de 40 vezes, e para a contagem do número total de axônios mielínicos foi empregando o programa SigmaScan Pro (V5.0). Para isso, sobre um corte representativo de cada nervo, foi inicialmente aplicada uma grade com quadrantes de 91440,65  $\mu$ m<sup>2</sup>. Cada um destes quadrantes foi então digitalizado sob objetiva de 40 vezes, marcando-se as bordas inferior e lateral esquerda com linhas proibidas, a fim de evitar a dupla contagem de axônios. A contagem foi realizada manualmente e sempre pelo mesmo experimentador, que desconhecia a procedência do espécime. Os dados obtidos das contagens do número total de axônios mielínicos foram avaliados estatisticamente através da análise da variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey.

No interior dos quadrantes acima referidos foram amostrados aleatoriamente, em cada animal, 200 destes axônios (n. tibial: 100; n. fibular: 70; n. sural: 30), dos quais após digitalização sob objetiva de 100X (imersão em óleo), foram medidos os seguintes parâmetros morfométricos: diâmetro da fibra (DF), diâmetro do axônio (DA), espessura da bainha de mielina ( $EBM = DF - DA/2$ ) e razão “g” ( $RZG = DA/DF$ ) (Figura 4), empregando-se os módulos de medidas do programa SigmaScan Pro (V5.0).



**Figura 4:**

**A** - Imagem representativa de um campo analisado do nervo fibular de um animal tratado com TAT-CNTF.

**B** - Esquema mostrando os parâmetros morfométricos analisados nos nervos tibial, fibular e sural.

DF: diâmetro da fibra

DA: diâmetro axonal

EBM: espessura da mielina ( $DF - DA/2$ )

RZG = razão “g” ( $DA/DF$ )

### 3.7.2 Análise morfológica e morfométrica do tecido adiposo

Após a fixação dos animais, conforme descrito acima, foram removidos o tecido adiposo marrom interescapular (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB) epididimal e retroperitoneal. Imediatamente após a coleta o TAM foi pesado. Fragmentos desses tecidos foram deixados por 24 horas na solução fixadora (formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M; pH 7,4). Após esse período os fragmentos foram lavados em água destilada, desidratados em gradiente crescente de etanol e embebidos em glicolmetacrilato (Historesina Leica). Após a polimerização da resina, foram obtidos cortes semifinos ( $2,0\mu\text{m}$ ), com auxílio de um micrótomo (LKB, Bromma 8800), equipado com navalha de vidro. Os cortes foram corados em uma solução

aquosa de azul de toluidina (0,5%), desidratados e montados em Entelan para análise ao microscópio de luz. O número de células adiposas e a dimensão dos espaços ocupados pela gordura nessas células foram avaliados em cada animal (modificado de Sbarbati e cols., 1991) empregando-se o programa SigmaScan Pro (V5.0). De cada animal foram utilizados 10 cortes de cada espécime de TAB e TAM, distanciados por 100 micrômetros entre si, para a contagem do número de núcleos celulares de adipócitos e medida a área dos espaços ocupados pela gordura nos mesmos.

Previamente às medições, foi estabelecido um padrão de calibração utilizando-se uma régua micrométrica (Carl Zeiss) contendo uma escala de um milímetro dividido em 100 partes de  $10\mu\text{m}$ . Para a objetiva de 100X (imersão) a distância de  $100\mu\text{m}$  correspondeu a 1432 pixels e para a objetiva de 40X correspondeu a 574 pixels, em um microscópio Leica-DMLB equipado com vídeo câmera digital Leica, DC 300F.

Para a análise morfométrica da gordura marrom interescapular (GMI), foi amostrada ao acaso em cada corte uma área de  $14691,87\mu\text{m}^2$  sob objetiva de 100X. O número total de núcleos das células adiposas presente nessa área foi contado. Para a avaliação da área dos vacúolos lipídicos, foi utilizada apenas a região central da área previamente selecionada, que correspondeu a  $3679,114\mu\text{m}^2$ . Para a análise morfométrica da gordura branca retroperitoneal (GBR) e epididimal (GBE) foi amostrada ao acaso em cada corte uma área de  $91440,65\mu\text{m}^2$  sob objetiva de 40X. O número total de núcleos das células adiposas e da área de todos os vacúolos lipídicos presentes nessa área foi computado.

Os valores do peso da GMI, bem como do quociente entre este valor e o respectivo peso corporal de cada animal (Índice de GMI;  $\text{GMI}_i = \text{PG}/\text{PC}$ ) foram analisados

estatisticamente através da análise da variância (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05.

### **3.8 Avaliação estatística dos dados morfométricos**

Os valores obtidos na contagem do número de motoneurônios, neurônios sensitivos, axônios mielínicos e adipócitos, bem como dos parâmetros morfométricos dos axônios mielínicos e adipócitos, foram avaliados estatisticamente através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste Student-Newman-Keuls (GraphPad InStat).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito dos tratamentos sobre o crescimento ponderal dos animais

O acompanhamento do ganho de peso dos animais entre P2 e P7 mostrou que os animais tratados com doses subcutâneas diárias de CNTF (1,2µg/g) tiveram ganho de peso significativamente inferior aos dos animais tratados com TAT-CNTF e grupos controle (PBS; Sem tratamento). O menor crescimento dos animais tratados com CNTF foi significativo a partir do segundo dia de tratamento. Na idade P7 o peso corporal desses animais foi aproximadamente 31% inferior ao dos animais demais grupos. Não houve diferença significativa de ganho de peso entre os animais tratados com TAT-CNTF e os animais controle (Figura 5).

A evolução ponderal dos animais entre P2 e P17 revelou que os animais tratados com CNTF durante 5 dias e com sobrevida de 15 dias tiveram um crescimento corporal inferior aos animais tratados com TAT-CNTF, PBS ou Sem Tratamento ( $p < 0,001$ ). Do 5º ao 13º dia de tratamento, os animais tratados com TAT-CNTF tiveram aumento de peso inferior aos animais controle ( $p < 0,01$ ), não havendo diferenças entre eles no 14º e 15º dia. Vale ressaltar que os animais tratados com CNTF receberam a substância somente nos 5 primeiros dias e seu efeito na redução do crescimento corporal é observado até o 15º dia após o início do tratamento (Figura 6). Os animais que sofreram lesão do nervo isquiático em P2 (Tabela 2 e 3) e foram tratados com CNTF durante 5 dias apresentaram crescimento corporal inferior do 3º até o 23º dia após lesão (P25) quando comparados aos demais grupos tratados por 5 ou 15 dias com TAT-CNTF ou PBS e aos animais íntegros. Embora o crescimento ponderal dos animais tratados com TAT-CNTF por 5 ou 15 dias tenha sido superior aos animais tratados com CNTF ( $p < 0,001$ ), foi menor que o observado nos grupos tratados com PBS e nos animais íntegros do 7º até o 23º dia ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).

Finalmente, a comparação da evolução ponderal entre animais íntegros e lesados, experimentais (CNTF; TAT-CNTF) e controles (PBS; Íntegros), mostrou que os animais lesados tiveram ganho de peso superior aos animais íntegros entre as idades P2 e P17.

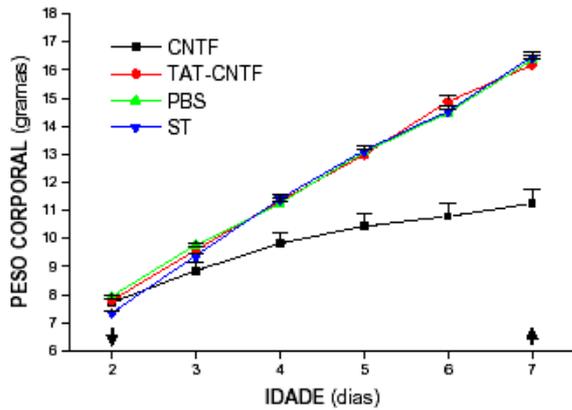


Figura 5: Efeito da administração subcutânea de CNTF e TAT-CNTF sobre o crescimento ponderal de ratos neonatos entre as idades P2 e P7, sem lesão com início do tratamento em P2. A curva de crescimento dos animais tratados com CNTF (1,2µg/g) revelou que estes tiveram ganho de peso significativamente inferior aos animais tratados com TAT-CNTF, PBS e ST (sem tratamento). O menor crescimento dos animais tratados com CNTF foi significativo a partir do segundo dia de tratamento ( $p < 0,01$ ). Na idade P7 o peso corporal desses animais foi 31% inferior aos animais tratados com TAT-CNTF e aos animais controle. Não houve diferenças significativas de ganho de peso entre os animais tratados com TAT-CNTF e os animais tratados com PBS e ST. (▼ início do tratamento; ▲ fim do tratamento)

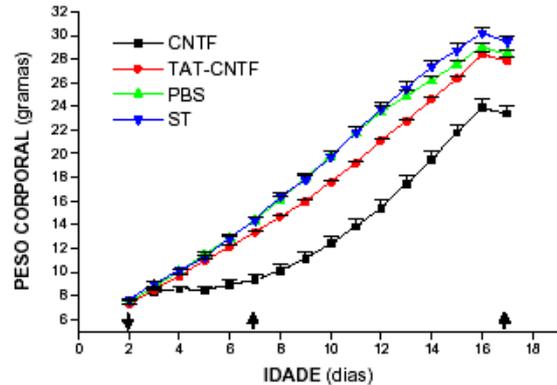


Figura 6: Efeito da administração subcutânea de CNTF e TAT-CNTF sobre o crescimento ponderal de ratos neonatos entre as idades P2 e P17, sem lesão com início do tratamento em P2. A curva de crescimento dos animais que receberam CNTF (1,2µg/g) durante os 5 primeiros dias revelou que a partir do 2º dia estes tiveram ganho de peso significativamente inferior aos animais tratados com TAT-CNTF, PBS e ST ( $p < 0,001$ ). Notar também que, embora os animais tratados com TAT-CNTF mostrem crescimento inferior aos animais controle entre o 5º e o 13º dia de tratamento, ele foi significativamente superior aos dos animais que receberam CNTF. (▼ início do tratamento; ▲ fim do tratamento P7 – CNTF, P17 – TAT-CNTF e PBS).

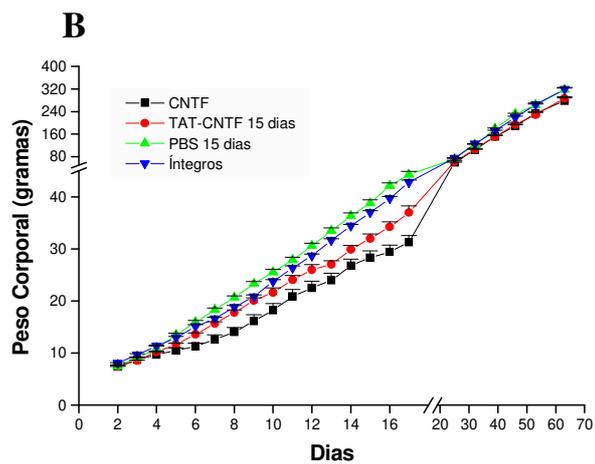
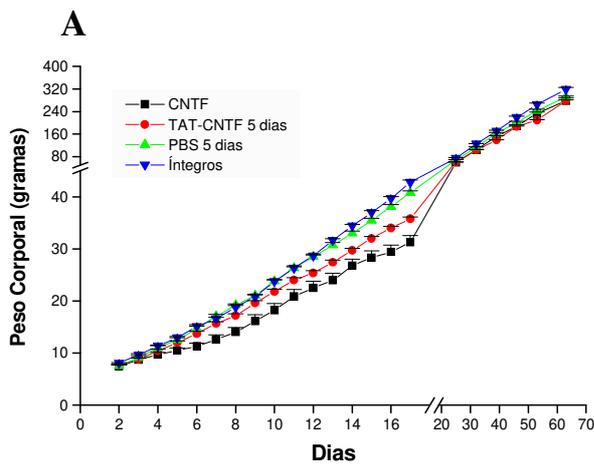


Figura 7: Efeito da administração subcutânea de CNTF e TAT-CNTF sobre o crescimento ponderal de ratos neonatos. O gráfico A corresponde ao peso corporal de animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF ou PBS por 5 dias com sobrevida de 67 dias após esmagamento do nervo isquiático em P2. O gráfico B corresponde ao peso corporal de animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF ou PBS por 15 dias com sobrevida de 67 dias após esmagamento do nervo isquiático em P2. A curva de crescimento dos animais tratados com CNTF (1,2µg/g) nos 5 primeiros dias revelou que estes tiveram ganho de peso significativamente inferior aos animais tratados com TAT-CNTF, PBS e íntegros do 3º até o 23º dia, não havendo diferenças após esse período. Os animais que receberam tratamento com TAT-CNTF tiveram ganho de peso inferior aos grupos controle do 7º até o 23º dia, mas foi superior ao apresentado pelos animais tratados com CNTF.

#### **4.2 Dosagens das concentrações plasmáticas de glicose (Tabela 4)**

Nossos resultados revelaram que nos animais com sobrevida de 5 dias depois do início do tratamento ocorreu uma evidente redução dos níveis de glicose plasmática nos animais tratados com CNTF quando comparado com os animais tratados com TAT-CNTF ( $p < 0,01$ ), PBS ( $p < 0,001$ ) e sem tratamento ( $p < 0,001$ ). Interessantemente, o tratamento com TAT-CNTF também provocou redução da glicose em relação aos grupos controle (PBS; Sem Tratamento) ( $p < 0,001$ ), mas de forma mais branda quanto comparada com os animais tratados com CNTF ( $p < 0,01$ ) (Figura 8).

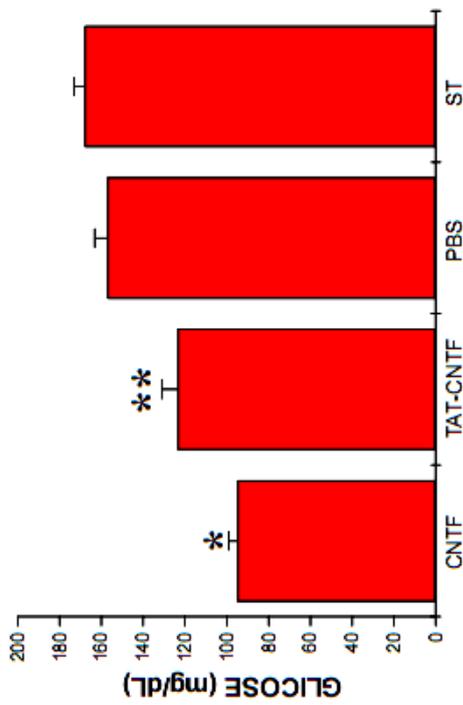
Nos animais com sobrevida de 15 dias, o tratamento com TAT-CNTF por 5 ou 15 dias não modificou os níveis de glicose em relação aos animais tratados com PBS e íntegros. Contudo, os animais que receberam CNTF até a idade P7 exibiram ainda redução nos níveis plasmáticos de glicose na idade P17 quando comparado com os animais tratados com TAT-CNTF, PBS ou Sem Tratamento ( $p < 0,05$ ) (Figura 9).

#### **4.3 Dosagens das concentrações plasmáticas de triglicérides (Tabela 4)**

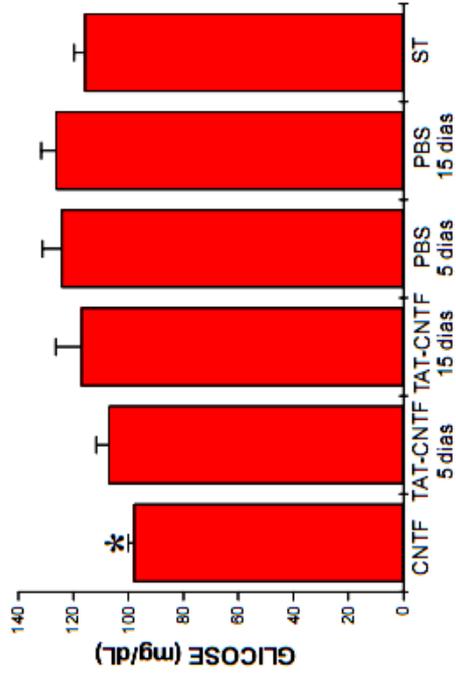
Nossos resultados mostraram que o tratamento com CNTF por 5 dias diminuiu os níveis plasmáticos de triglicérides em relação aos grupos controle (PBS e Sem Tratamento;  $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF. Além disso, os animais tratados com TAT-CNTF não apresentaram diferenças nas concentrações plasmáticas de triglicérides quando comparado aos grupos controle (Figura 10). Contudo, o tratamento com TAT-CNTF durante 15 dias aumentou significativamente os níveis plasmáticos de triglicérides em relação aos grupos controle ( $p < 0,001$ ). Os animais que

receberam CNTF e TAT-CNTF até a idade P7 não exibiram alterações nos níveis de triglicérides em relação aos grupos controle na idade P17 (Figura 11).

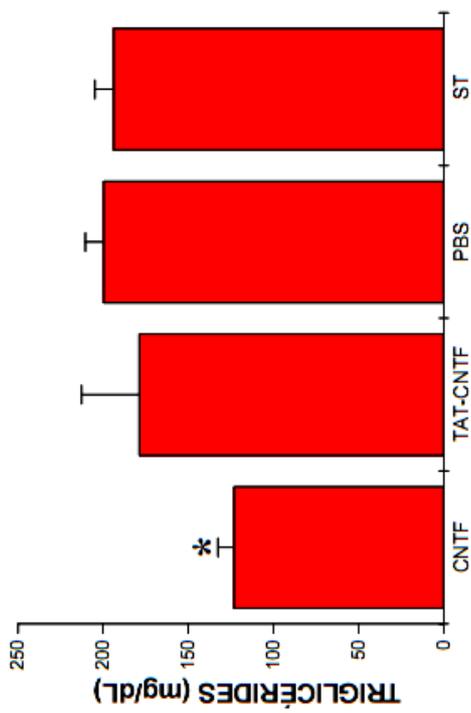
Os grupos com sobrevida de 15 dias ficaram de jejum durante 12 horas antes da coleta do plasma sanguíneo destinado as dosagens das concentrações plasmáticas de triglicérides. Este fato evidenciou uma visível diferença nas concentrações plasmáticas de triglicérides quando comparado aos grupos com sobrevida de 5 dias. Vale ressaltar que estes últimos ficaram somente 1 hora de jejum antes da coleta do plasma sanguíneo.



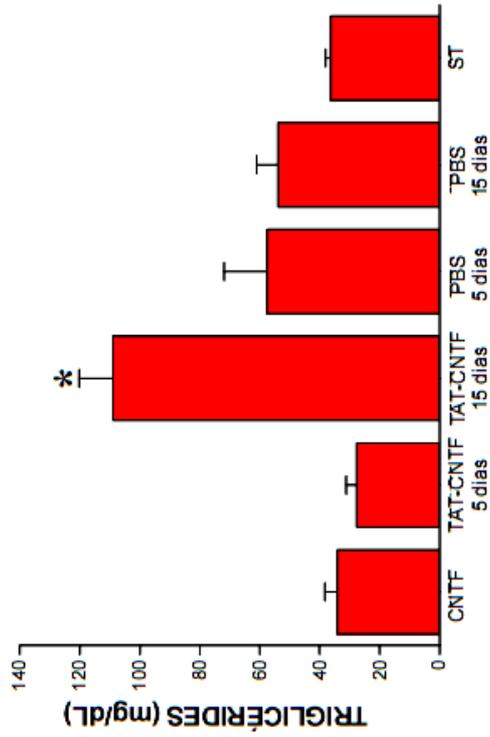
**Figura 8:** Concentração plasmática da glicose em ratos neonatos não lesados e tratados por 5 dias com doses diárias s.c. de CNTF (1,2µg/g), TAT-CNTF (1,2µg/g), PBS ou Sem Tratamento (ST). Uma hora antes do sacrifício os animais foram separados da mãe, ficando, portanto em jejum. O tratamento com CNTF reduziu os níveis de glicose quando comparado aos animais tratados com TAT-CNTF, PBS e ST (\* $p < 0,01$ ). Note que o tratamento com TAT-CNTF também reduziu os níveis de glicose quando comparados com os animais controle (\*\* $p < 0,01$ ). Contudo, esse efeito foi inferior ao exibido pelo tratamento com CNTF. Valores mostrados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média.



**Figura 9:** Concentração plasmática da glicose em ratos neonatos não lesados e tratados por 15 dias com doses diárias s.c. de CNTF (1,2µg/g), TAT-CNTF (1,2µg/g), PBS ou Sem Tratamento (ST). Doze horas antes do sacrifício os animais foram separados da mãe, ficando, portanto em jejum. O tratamento com CNTF reduziu os níveis de glicose quando comparado aos animais tratados com TAT-CNTF, PBS e ST (\* $p < 0,05$ ). Note que o tratamento com TAT-CNTF durante 5 ou 15 dias não alterou as concentrações de glicose quando comparado com os animais controle. Valores mostrados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média.



**Figura 10:** Concentração plasmática de triglicérides de ratos neonatos não lesados e tratados por 5 dias com doses diárias s.c. de CNTF (1,2µg/g), TAT-CNTF (1,2µg/g), PBS ou Sem Tratamento (ST). Uma hora antes do sacrifício os animais foram separados da mãe, ficando portanto em jejum. O tratamento com CNTF diminuiu os níveis de triglicérides comparados com os grupos controle (\* $p < 0,05$ ). Contudo não existiu diferença significativa entre os grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF. O tratamento com TAT-CNTF não modificou as concentrações de triglicérides em relação aos grupos controle. Valores mostrados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média.



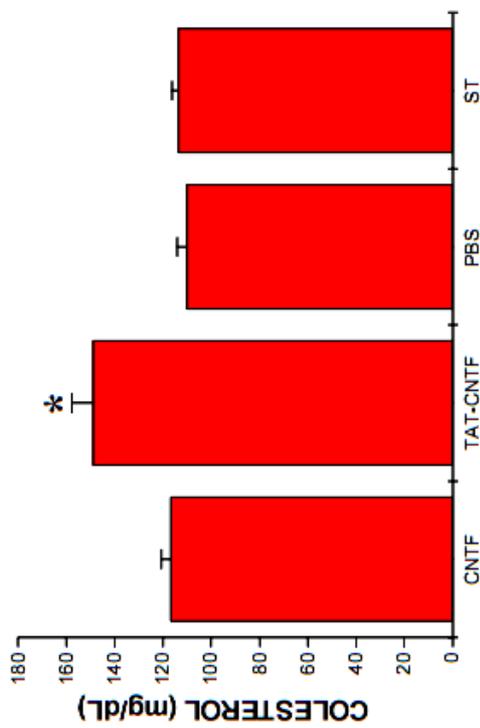
**Figura 11:** Concentração plasmática de triglicérides de ratos neonatos não lesados e tratados por 15 dias com doses diárias de CNTF (1,2µg/g), TAT-CNTF (1,2µg/g), PBS ou Sem Tratamento (ST). Doze horas antes do sacrifício os animais foram separados da mãe, ficando portanto em jejum. O tratamento com CNTF TAT-CNTF durante 5 dias não alterou os níveis de triglicérides comparados com os grupos controle. Contudo, o tratamento com TAT-CNTF durante 15 dias aumentou os níveis de triglicérides plasmáticos em relação aos animais tratados com CNTF, PBS e ST (\* $p < 0,001$ ). Valores mostrados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média.

#### **4.4 Dosagens das concentrações plasmáticas de colesterol (Tabela 4)**

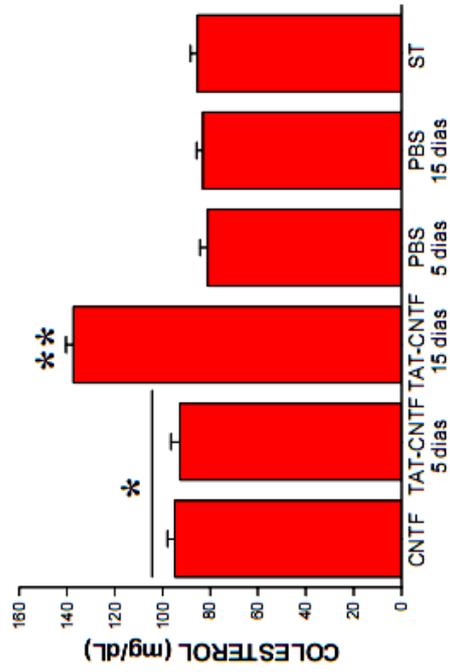
O tratamento com CNTF por 5 dias não modificou os níveis plasmáticos de colesterol quando comparados com os grupos controle (PBS; Sem tratamento). Contudo, o tratamento com TAT-CNTF por 5 dias aumentou os níveis de colesterol em relação a todos os demais grupos ( $p < 0,001$ ) (Figura 12). Além disso, nossos resultados mostraram que o tratamento com TAT-CNTF por 15 dias também aumentou os níveis plasmáticos de colesterol quando comparados ao registrado nos grupos controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 13). Os animais que sobreviveram por 15 dias após o início do tratamento, mas receberam CNTF e TAT-CNTF nos 5 primeiros dias, mostraram também níveis aumentados de colesterol quando comparados com os animais controle ( $p < 0,05$ ), contudo este aumento foi inferior ao observado no grupo tratado durante 15 dias com TAT-CNTF ( $p < 0,001$ ) (Figura 13).

#### **4.5 Dosagens das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (Tabela 4)**

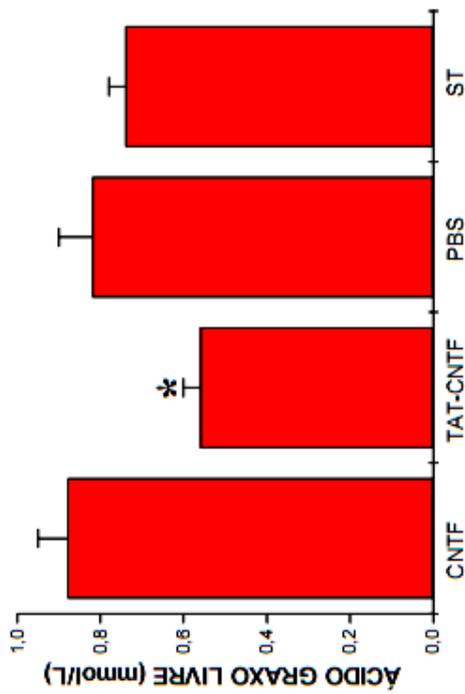
Nos animais com sobrevida de 5 dias, o tratamento com CNTF não alterou os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres, embora podemos observar uma tendência de aumento quando comparado aos animais controle. Por outro lado, o tratamento com TAT-CNTF diminuiu os níveis de ácidos graxos livres em relação aos animais tratados com PBS e sem tratamento ( $p < 0,05$ ) e CNTF ( $p < 0,01$ ) (Figura 14). Interessantemente, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos com sobrevida de P2 a P17. Contudo, os animais tratados com TAT-CNTF durante 15 dias exibiram uma tendência de aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (Figura 15).



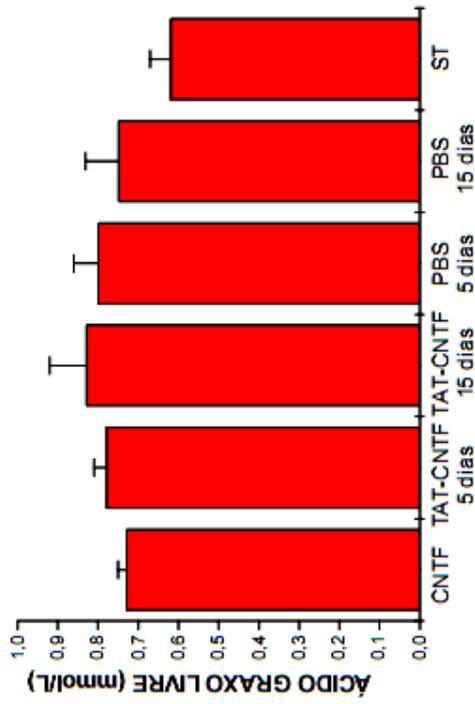
**Figura 12:** Concentração plasmática de colesterol de ratos neonatos não lesados e tratados por 5 dias com doses diárias de CNTF (1,2µg/g), TAT-CNTF (1,2µg/g), PBS ou Sem Tratamento (ST). Uma hora antes do sacrifício os animais foram separados da mãe, ficando, portanto em jejum. Note que o tratamento com TAT-CNTF aumentou as concentrações de colesterol quando comparado aos animais tratados com CNTF, PBS ou ST (\* $p < 0,001$ ). O tratamento com CNTF não alterou as concentrações de colesterol em relação aos grupos controle. Valores mostrados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média.



**Figura 13:** Concentração plasmática de colesterol de ratos neonatos não lesados e tratados por 15 dias com doses diárias de CNTF (1,2µg/g), TAT-CNTF (1,2µg/g), PBS ou Sem Tratamento (ST). Doze horas antes do sacrifício os animais foram separados da mãe, ficando, portanto em jejum. O tratamento com CNTF e TAT-CNTF durante 5 dias ligeiramente aumentou os níveis de colesterol em relação aos grupos controle (\* $p < 0,05$ ). Note que o tratamento com TAT-CNTF aumentou as concentrações de colesterol quando comparado aos animais tratados com PBS ou ST (\*\* $p < 0,001$ ). O aumento do colesterol provocado pelo CNTF foi inferior ao provocado pela TAT-CNTF (\*\* $p < 0,001$ ). Valores mostrados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média.



**Figura 14:** Concentração plasmática de ácidos graxos livres de ratos neonatos não lesados e tratados por 5 dias com doses diárias de CNTF(1,2µg/g), TAT-CNTF(1,2µg/g), PBS ou Sem Tratamento (ST). Uma hora antes do sacrifício os animais foram separados da mãe, ficando, portanto em jejum. O tratamento com TAT-CNTF diminuiu os níveis de ácidos graxos livres em relação aos animais tratados com CNTF, PBS ou ST (\*p<0,001). Note que o tratamento com CNTF provocou uma tendência de aumento, embora não significativa, em relação aos grupos controle. Valores mostrados correspondem à média ± erro padrão da média.



**Figura 15:** Concentração plasmática de ácidos graxos livres de ratos neonatos não lesados e tratados por 15 dias com doses diárias de CNTF(1,2µg/g), TAT-CNTF(1,2µg/g), PBS ou Sem Tratamento (ST). Doze horas antes do sacrifício os animais foram separados da mãe, ficando, portanto em jejum. O tratamento com CNTF durante 5 dias e TAT-CNTF durante 5 ou 15 dias não alterou os níveis de ácidos graxos livres em relação aos animais controle (PBS e ST). Embora, o tratamento com TAT-CNTF durante 15 dias tenha promovido uma tendência de aumento das concentrações de ácidos graxos livres, embora não significativa, em relação aos grupos controle. Valores mostrados correspondem à média ± erro padrão da média.

## **4.6 Análise morfológica e morfométrica do tecido adiposo (Tabela 4)**

### **4.6.1 Morfologia da Gordura Marrom Interescapular (GMI)**

A média do peso da GMI dos animais tratados durante 5 dias com TAT-CNTF ( $0,085 \pm 0,006$ g) foi superior à dos animais tratados com CNTF ( $0,044 \pm 0,006$ g;  $p < 0,001$ ) e não houve diferenças significativas quando comparados com os animais tratados com PBS ( $0,094 \pm 0,002$ g) e Sem Tratamento ( $0,084 \pm 0,003$ ) (Figura 16). O peso da GMI dos animais que receberam tratamento com CNTF foi inferior também aos grupos controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 16A). Este mesmo padrão pode ser visto nos animais com sobrevivência de 15 dias. Nestes animais não observamos diferenças entre os tratados com TAT-CNTF durante 5 dias ( $0,160 \pm 0,004$ ) ou 15 dias ( $0,158 \pm 0,006$ ), PBS durante 5 dias ( $0,172 \pm 0,006$ ) ou 15 dias ( $0,169 \pm 0,006$ ) e sem tratamento ( $0,187 \pm 0,009$ ) (Figura 17) e aqueles que receberam CNTF nos 5 primeiros dias apresentaram uma média de peso da GMI inferior aos demais grupos ( $0,115 \pm 0,006$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 17A).

O índice de GMI ( $GMI_i$ ) dos animais que receberam durante 5 dias doses diárias de CNTF ( $0,004 \pm 0,0002$ ) foi inferior ao registrado nos animais tratados com TAT-CNTF ( $0,005 \pm 0,0004$ ;  $p < 0,01$ ), PBS ( $0,006 \pm 0,0002$ ;  $p < 0,001$ ) e ST ( $0,006 \pm 0,0002$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 16B). Além disso, os animais tratados com TAT-CNTF tiveram  $GMI_i$  inferior aos animais controle ( $p < 0,01$ ), mas superior aos animais tratados com CNTF ( $p < 0,01$ ) (Figura 16B). Contudo, os animais com sobrevivência de 15 dias tratados com CNTF ( $0,0047 \pm 0,0002$ ) nos 5 primeiros dias apresentaram  $GMI_i$  inferior aos animais tratados com TAT-CNTF durante 5 dias ( $0,0060 \pm 0,0003$ ;  $p < 0,05$ ) ou 15 dias ( $0,0057 \pm 0,0002$ ;  $p < 0,05$ ), PBS durante 5 dias ( $0,0059 \pm 0,0002$ ;  $p < 0,01$ ) ou 15 dias ( $0,0060 \pm 0,0002$ ;  $p < 0,01$ ) e sem

tratamento ( $0,0063 \pm 0,0003$ ;  $p < 0,01$ ), não havendo diferenças significativas entre estes três últimos grupos (Figura 17B).

A análise histológica da GMI dos animais com sobrevivência de 5 e 15 dias revelou que os animais tratados com TAT-CNTF exibiram GMI com morfologia semelhante aos dos animais tratados com PBS ou sem tratamento. Esta estava formada por adipócitos contendo abundantes gotículas lipídicas de variados tamanhos. Por outro lado, a GMI dos animais tratados com CNTF apresentava células gordurosas intensamente depletadas de gordura, exibindo poucas e pequenas gotas lipídicas no citoplasma (Figura 18).

#### **4.6.2 Morfometria da Gordura Marrom Interescapular (GMI) e contagem do número de adipócitos e vacúolos lipídicos**

Os resultados obtidos na análise morfométrica da GMI dos animais com sobrevivência de 5 dias após a lesão em P2, revelaram que a média das áreas dos vacúolos dos animais tratados com CNTF ( $3,2 \pm 1,07 \mu\text{m}^2$ ) foi significativamente inferior à dos animais tratados com TAT-CNTF, PBS ou sem tratamento (ST) ( $15,48 \pm 1,95 \mu\text{m}^2$ ,  $13,08 \pm 1,64 \mu\text{m}^2$  e  $18,23 \pm 3,06 \mu\text{m}^2$ , respectivamente;  $p < 0,001$ ; Figura 19). Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes três últimos grupos. Além disso, nos animais tratados com CNTF 20,4% dos vacúolos tinham área superior a  $2 \mu\text{m}^2$ , ao passo que nos demais grupos esse percentual foi de 51,8%, 63,7% e 71,5% (TAT-CNTF, PBS e ST, respectivamente). Por outro lado, o número médio de vacúolos lipídicos por unidade de área nos animais tratados com CNTF foi expressivamente maior ( $9952,44 \pm 896,961 \text{mm}^2$ ;  $p < 0,001$ ) que o observado nos animais que recebeu TAT-CNTF ( $5921,64 \pm 104,19 \text{mm}^2$ ),

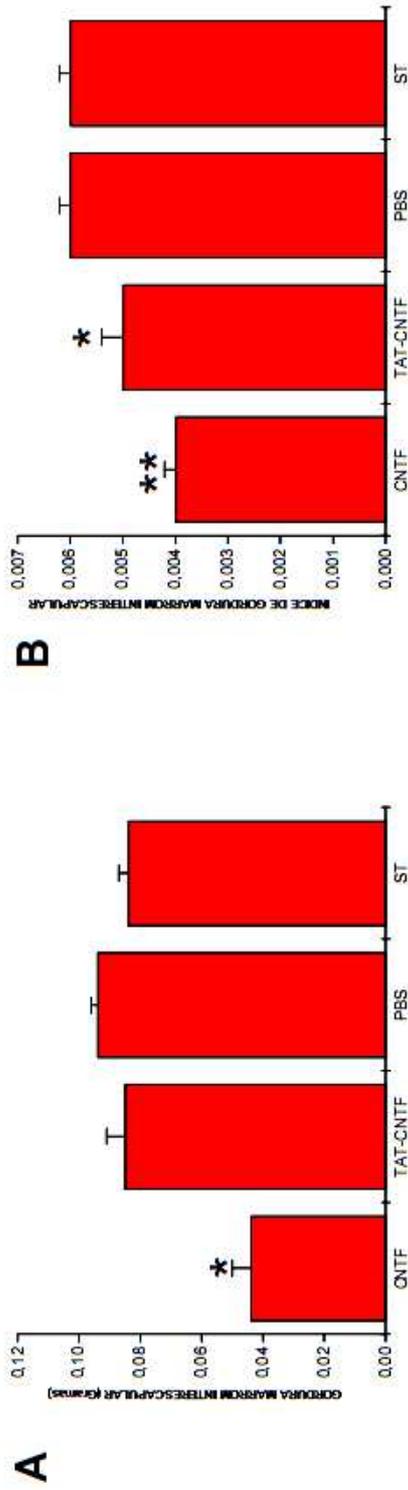
PBS ( $6168,95 \pm 586,39/\text{mm}^2$ ) ou ST ( $4979,63 \pm 418,28/\text{mm}^2$ ). Não foi observada diferença entre os grupos tratados com TAT-CNTF, PBS e ST.

Por sua vez, a contagem do número de núcleos de adipócitos por campo analisado revelou que os animais tratados com CNTF exibiram maior número destas células por unidade de área ( $1442,98 \pm 94,80/\text{mm}^2$ ;  $p < 0,001$ ) que os animais que receberam TAT-CNTF, PBS e ST ( $803,17 \pm 45,15$ ,  $735,10 \pm 75,79$  e  $816,78 \pm 48,13$ , respectivamente). O grupo que recebeu TAT-CNTF não apresentou diferença significativa quando comparado com os grupos controle (PBS e ST) (Figura 19).

Os dados obtidos na análise morfométrica da GMI dos animais, com sobrevida de 15 dias após a lesão em P2, revelaram que a média das áreas dos vacúolos dos animais tratados com CNTF foi significativamente inferior ( $4,29 \pm 0,49 \mu\text{m}^2$ ) ao dos animais tratados com TAT-CNTF ou PBS durante 5 ou 15 dias e dos animais sem tratamento (ST) (TAT-CNTF 5 dias:  $15,48 \pm 1,30 \mu\text{m}^2$ ; TAT-CNTF 15 dias:  $14,72 \pm 1,28 \mu\text{m}^2$ , PBS 5 dias:  $27,72 \pm 1,88 \mu\text{m}^2$ ; PBS 15 dias:  $28,86 \pm 2,31 \mu\text{m}^2$  e ST:  $49,23 \pm 4,40 \mu\text{m}^2$ , respectivamente;  $P < 0,001$ ). Curiosamente, os animais tratados durante 5 ou 15 dias com TAT-CNTF apresentaram áreas dos vacúolos lipídicos inferiores aos seus respectivos controles ( $P < 0,01$ ) e aos animais ST ( $P < 0,001$ ), embora fossem superiores aos animais tratados com CNTF. Os grupos que receberam TAT-CNTF por 5 ou 15 dias não apresentaram diferenças significativas em relação a média das áreas dos vacúolos lipídicos. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais que receberam PBS durante 5 ou 15 dias. Por outro lado, estes últimos foram significativamente inferiores aos animais ST ( $P < 0,001$ ). Além disso, nos animais tratados com CNTF 41% dos vacúolos tinham área superior a  $2,5 \mu\text{m}^2$ , ao passo que nos demais grupos esse percentual foi de 82%,

85%, 90%, 91% e 94%, respectivamente nos grupos TAT-CNTF 5 dias, TAT-CNTF 15 dias, PBS 5 dias, PBS 15 dias e ST. Por outro lado, o número médio de vacúolos lipídicos por unidade de área nos animais tratados com CNTF foi expressivamente maior ( $10995,88 \pm 888,13/\text{mm}^2$ ;  $p < 0,001$ ) que o observado nos animais que receberam TAT-CNTF durante 5 dias ( $5452,00 \pm 76,71/\text{mm}^2$ ), TAT-CNTF durante 15 dias ( $5748,08 \pm 265,91/\text{mm}^2$ ), PBS durante 5 dias ( $3345,39 \pm 132,11/\text{mm}^2$ ) PBS durante 15 dias ( $3461,10 \pm 218,19/\text{mm}^2$ ) ou ST ( $2184,88 \pm 226,26/\text{mm}^2$ ). O número de vacúolos computados nos animais tratados com TAT-CNTF durante 5 ou 15 dias, embora inferiores aos observados nos animais tratados com CNTF, foram significativamente superiores aos seus respectivos controles (PBS 5 ou 15 dias;  $p < 0,01$ ). Os grupos que receberam TAT-CNTF por 5 ou 15 dias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao número médio de vacúolos lipídicos. Não foi observada diferença entre os grupos tratados com PBS durante 5 ou 15 dias e ST (Figura 20).

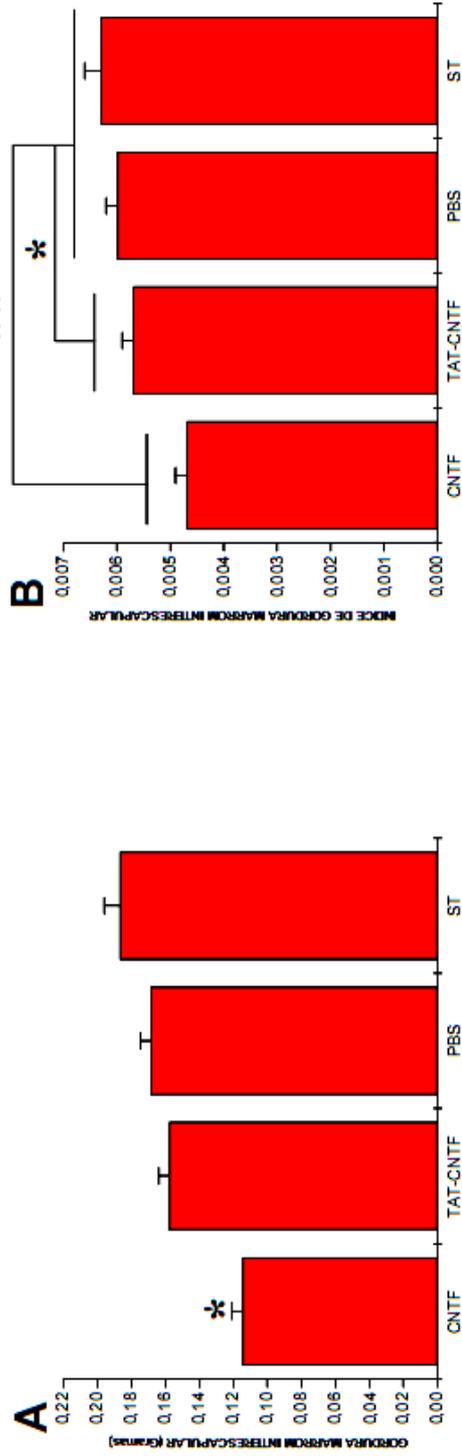
A contagem do número de núcleos de adipócitos por área mostrou que a densidade destas células na GMI foi maior nos animais tratados com CNTF ( $2375,46 \pm 85,1/\text{mm}^2$ ) quando comparada à dos animais que receberam TAT-CNTF ou PBS e à dos animais sem tratamento (TAT 5d:  $1218,00 \pm 19,05/\text{mm}^2$ ; TAT 15d:  $1233,68 \pm 17,44/\text{mm}^2$ ; PBS 5d:  $959,71 \pm 38,2/\text{mm}^2$ , PBS 15d:  $986,94 \pm 39,1/\text{mm}^2$ ; ST:  $850,81 \pm 43,94/\text{mm}^2$ ;  $p < 0,001$ ). Os grupos que receberam TAT-CNTF durante 5 ou 15 dias não apresentaram diferenças significativas entre si, mas a densidade de adipócitos nestes foi superior à dos animais tratados com PBS por 5 ou 15 dias e à dos animais sem tratamento ( $p < 0,01$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos controle (PBS 5d; PBS 15 dias; ST; Figura 20).



**Figura 16:**

A) Peso da Gordura Marrom Interscapular (GMI) de ratos neonatos na idade P7. Os animais foram tratados subcutaneamente com CNTF (1,2µg/dia), TAT-CNTF (1,2µg/dia) ou PBS entre as idades P2 e P7. ST - animais sem tratamento. Notar que o tratamento com TAT-CNTF não alterou significativamente a média de peso da GMI, quando comparada à dos animais controle, contrariamente aos observado nos animais tratados com CNTF (\* $p < 0,001$ ).

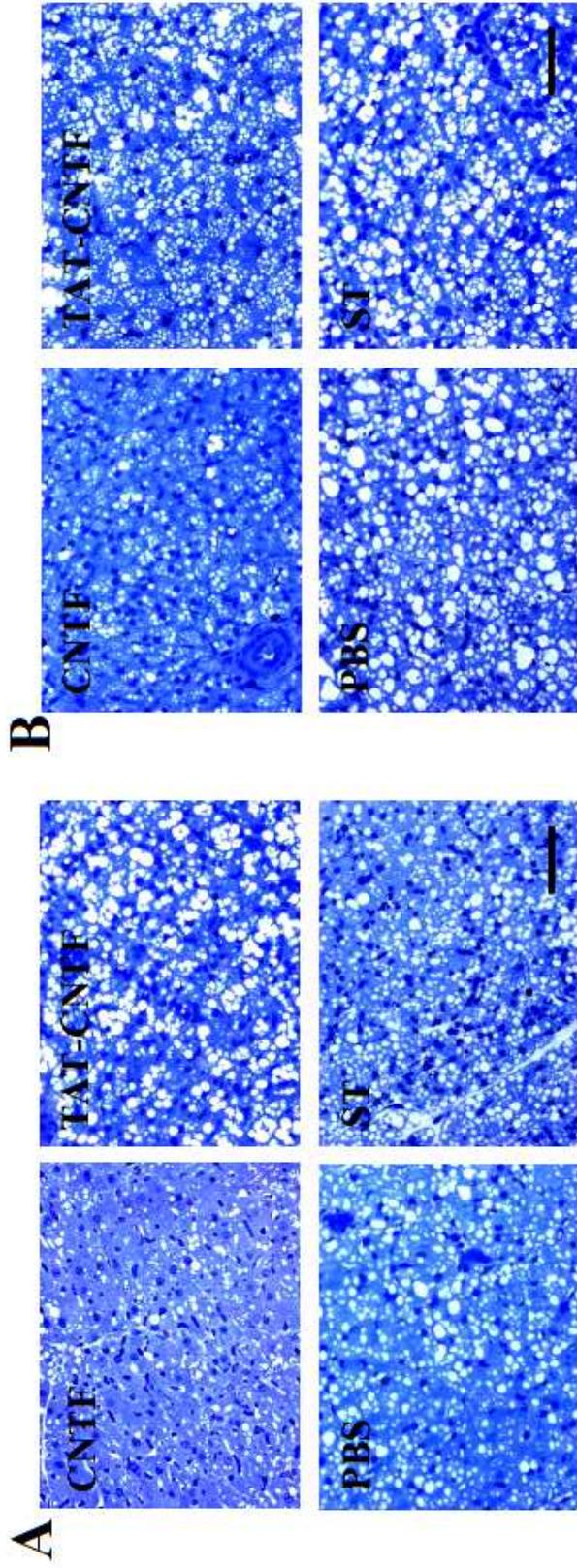
B) Índice de Gordura Marrom Interscapular (GMI<sub>i</sub>). Observar que embora o peso da GMI dos animais que receberam TAT-CNTF tenha sido semelhante ao dos animais controle, o GMI<sub>i</sub> foi significativamente inferior (\* $p < 0,01$ ) ao destes últimos. Por outro lado, o GMI<sub>i</sub> dos animais tratados com TAT-CNTF foi superior ao dos animais tratados com CNTF (\* $p < 0,01$ ). Estes, por sua vez, tiveram GMI<sub>i</sub> significativamente inferior aos dos animais controle (\*\* $p < 0,001$ ).



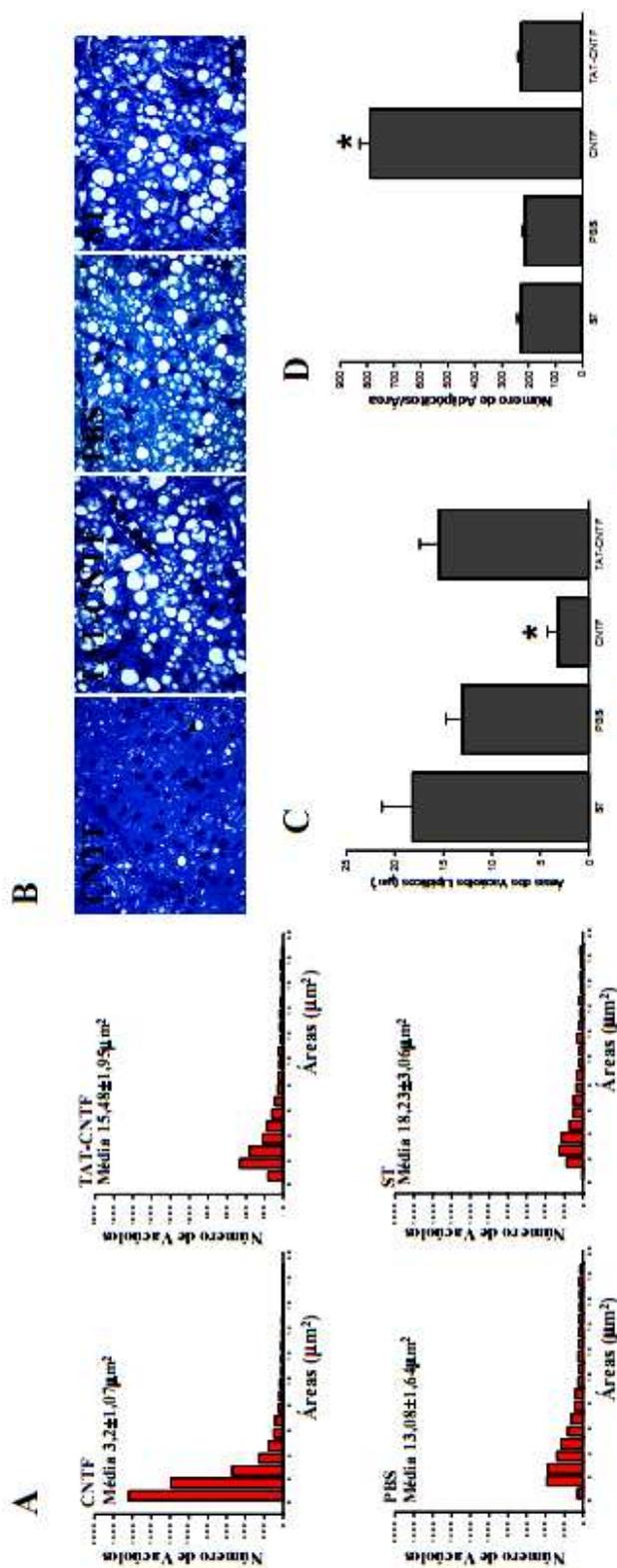
**Figura 17:**

A) Peso da Gordura Marrom Interscapular (GMI) de ratos neonatos na idade P17. Os animais foram tratados subcutaneamente com CNTF (1,2µg/dia) entre as idades P2 e P7, ou com TAT-CNTF (1,2µg/dia) ou PBS entre as idades P2 e P7. ST - animais sem tratamento. Notar que o tratamento com TAT-CNTF não alterou significativamente a média de peso da GMI, quando comparada à dos animais controle, contrariamente aos observado nos animais tratados com CNTF (\*p<0,01).

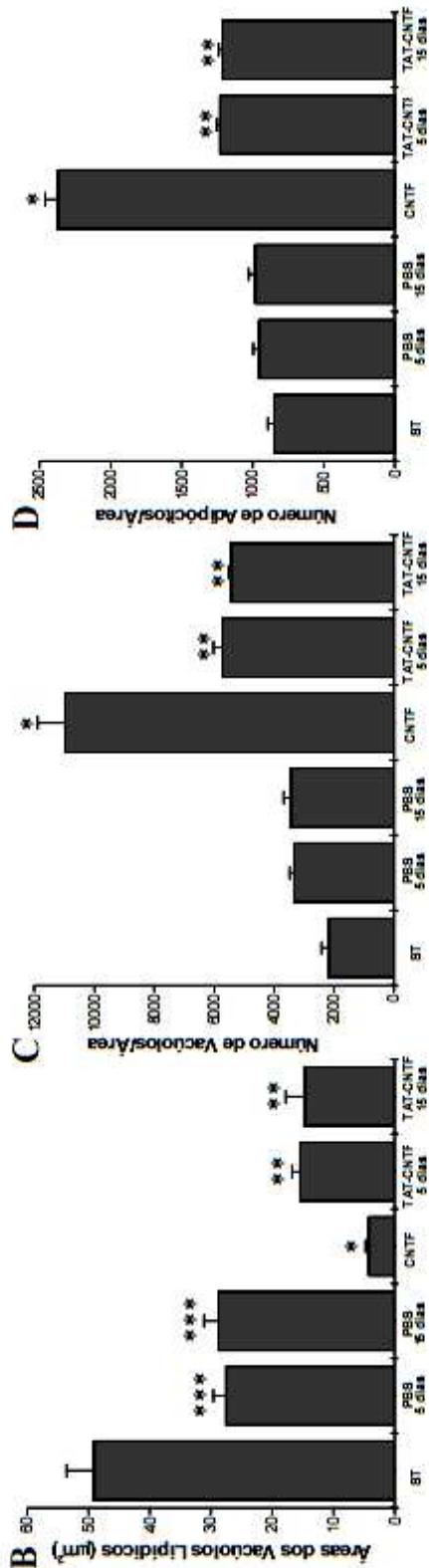
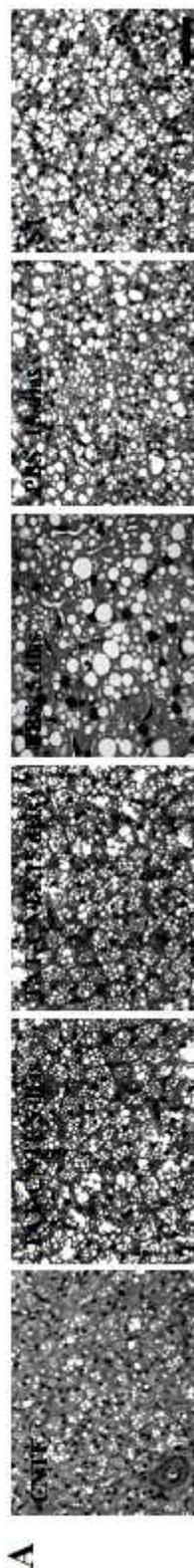
B) Índice de Gordura Marrom Interscapular (GMI). Observar que GMI dos animais tratados com TAT-CNTF durante 15 dias foi semelhante aos dos animais controle. Por outro lado o tratamento com CNTF durante 5 dias (P2-P7) provocou redução do GMI, nesses animais quando comparado aos dos animais tratados com TAT-CNTF (\*p<0,05) e grupos controle (\*\*p<0,01).



**Figura 18:** Cortes do tecido adiposo marrom interestapular de ratos na idade P7 (A) e P17 (B) tratados com doses diárias subcutâneas de CNTF (1,2µg/g), TAT-CNTF (1,2µg/g), PBS e Sem Tratamento (ST). Observar que os animais tratados com CNTF exibem adipócitos com poucas e pequenas gotas lipídicas, ao passo que a gordura marrom dos animais tratados com TAT-CNTF, PBS ou ST possui abundantes gotas lipídicas de tamanhos variados na idade P7 e P17. Barras=50µm).



**Figura 19:** Os gráficos mostram a distribuição das áreas dos vacúolos lipídicos da Gordura Marrom Interescapular (GMI) dos animais neonatos (P7) sem lesão tratados com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou Sem Tratamento (ST) (A). Em B as figuras correspondem a uma das áreas amostradas para a avaliação morfológica da GMI em cada situação experimental, respectivamente. Em C gráfico representativo das médias de áreas dos vacúolos dos animais tratados com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou ST. Em D gráfico representativo do número de adipócitos por unidade de área (mm<sup>2</sup>) dos animais tratados com CNTF, TAT-CNTF, PBS e ST. Os vacúolos dos animais tratados com CNTF estavam 20,4% acima de 2µm<sup>2</sup> enquanto que nos animais que receberam TAT-CNTF, PBS e ST este percentual foi de 51,8%, 63,7% e 71,5%, respectivamente. A média das áreas dos vacúolos lipídicos dos animais tratados com CNTF foi expressivamente inferior aos demais grupos analisados (\*p<0,001). Notar o maior número de adipócitos por unidade de área nos animais tratados com CNTF quando comparado com os animais que receberam TAT-CNTF, PBS e ST (\*p<0,001). Os valores mostrados correspondem à média±erro padrão. Barra = 30µm.



**Figura 20:** As figuras correspondem a uma das áreas amostradas para a avaliação morfológica da gordura marrom interestescapular dos animais neonatos (P17) sem lesão tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou Sem Tratamento (ST) (A). Em B gráfico representativo das médias de áreas dos vacuolos dos animais tratados com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou ST. Em C gráfico representativo do número de adipócitos por unidade de área dos animais tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS e ST. Em D gráfico representativo do número de adipócitos por unidade de área dos animais tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS e ST. A média das áreas dos vacuolos lipídicos dos animais tratados com CNTF foi expressivamente inferior aos demais grupos analisados ( $p < 0,001$ ). Os animais tratados durante 5 ou 15 dias com TAT-CNTF apresentaram áreas dos vacuolos lipídicos inferiores aos seus respectivos controles e aos animais ST ( $p < 0,01$ ), embora fossem superiores aos animais tratados com CNTF ( $p < 0,01$ ). Os animais que receberam PBS durante 5 ou 15 dias apresentaram médias de vacuolos lipídicos inferiores ao observado nos animais ST ( $p < 0,01$ ). Notar o maior número de vacuolos lipídicos e de adipócitos por unidade de área nos animais tratados com CNTF e TAT-CNTF quando comparado com os animais que receberam PBS e ST ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Os animais que receberam TAT-CNTF por 5 ou 15 dias apresentaram número de vacuolos lipídicos e de adipócitos por unidade de área inferiores aos dos animais tratados com CNTF ( $p < 0,001$ ). Os valores mostrados correspondem à Média ± EPM. Barra = 50µm.

#### **4.6.3 Morfologia da Gordura Branca Retroperitoneal (GBR) e Epididimal (GBE)**

A análise morfológica da GBR dos animais com sobrevida de 5 dias revelou que os animais tratados com TAT-CNTF exibiram GBR com morfologia semelhante aos dos animais tratados com PBS ou sem tratamento. Esta estava formada por adipócitos contendo grandes vacúolos lipídicos. Por outro lado, a GBR dos animais tratados com CNTF apresentava células gordurosas com vacúolos nitidamente menores que os demais grupos (Figura 21). Interessantemente, a análise GBR dos animais com sobrevida de 15 dias revelou que os animais tratados com CNTF durante 5 dias ou com TAT-CNTF durante 5 ou 15 dias exibiram morfologia semelhante. Porém, em todos esses animais as células gordurosas eram nitidamente menores que as observadas nos animais tratados com PBS por 5 ou 15 dias, e nos animais ST (Figura 22).

A análise morfológica da GBE só foi realizada nos animais com sobrevida de 15 dias, pois não foi possível a retirada da mesma nos animais com idade P7. Desta forma, não observamos diferenças na morfologia da GBE entre todos os grupos analisados. Em todos os grupos foram observadas células adiposas contendo vacúolos lipídicos grandes (Figura 23).

#### **4.6.4 Morfometria da Gordura Branca Retroperitoneal (GBR) e Epididimal (GBE) e contagem do número de adipócitos e vacúolos lipídicos.**

A análise morfométrica da área ocupada pelos vacúolos lipídicos da GBR nos animais com sobrevida de 5 dias e tratados com CNTF mostrou ser inferior  $643,66 \pm 11,88 \mu\text{m}^2$  que foi expressivamente inferior aos animais tratados com TAT-CNTF ( $1649,69 \pm 87,8 \mu\text{m}^2$ ), PBS ( $1883,51 \pm 59,56 \mu\text{m}^2$ ) ou Sem Tratamento ( $1842,23 \pm 72,11 \mu\text{m}^2$ ). Por outro lado, os animais que receberam TAT-CNTF, embora tivessem uma média de área

lipídica superior aos animais tratados com CNTF, revelaram uma média de área estatisticamente menor que a observada nos animais controle (PBS e ST;  $p < 0,05$ ; Figura 20). Além disso, nos animais tratados com CNTF 23,3% dos vacúolos tinham área superior a  $750\mu\text{m}^2$ , ao passo que esse percentual foi de 68,3%, 86,6% e 88,8% para os grupos TAT-CNTF, PBS e ST, respectivamente. O número médio de vacúolos lipídicos por unidade de área dos animais tratados com CNTF ( $891,07 \pm 12,79$ ) foi superior ( $p < 0,001$ ) aos grupos que receberam TAT-CNTF ( $265,75 \pm 12,49$ ), PBS ( $289,37 \pm 10,87$ ) e ST ( $289,81 \pm 10,78$ ). Não houve diferenças entre estes três últimos (Figura 21).

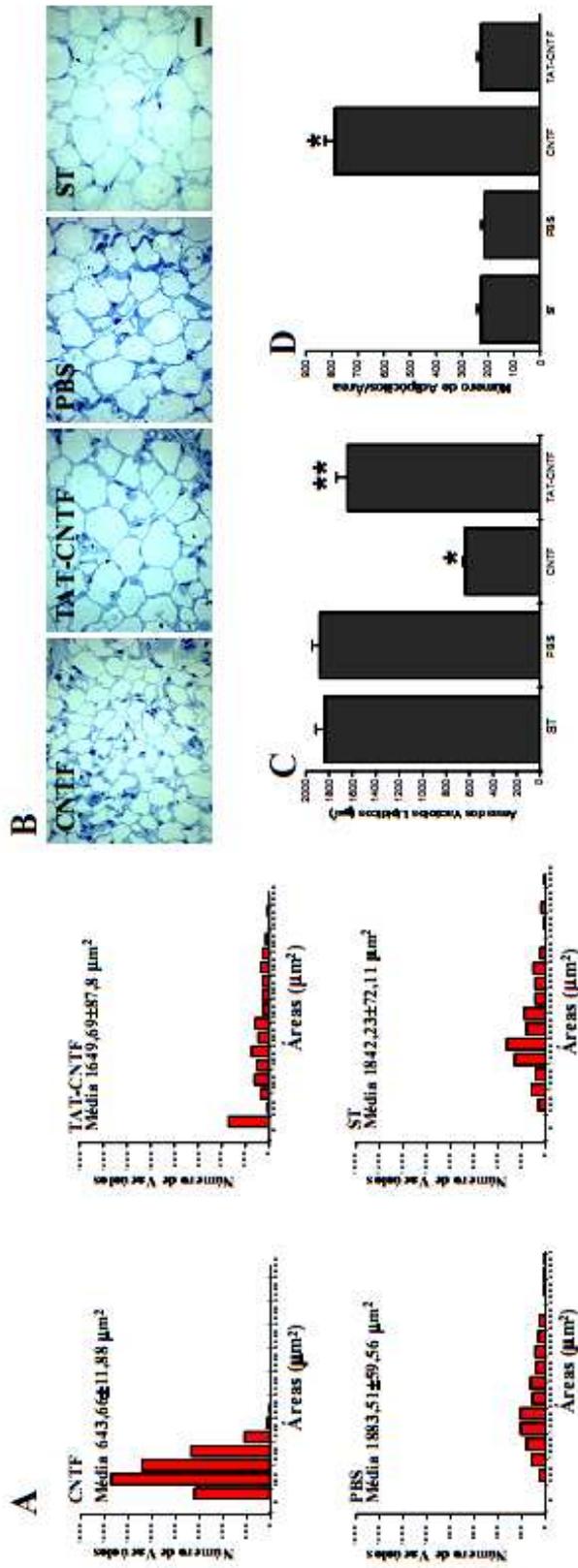
Por sua vez, a contagem do número de núcleos de adipócitos por campo analisado revelou que os animais tratados com CNTF exibiram maior número destas células por unidade de área ( $790,24 \pm 36,96/\text{mm}^2$ ;  $p < 0,001$ ) que os animais que receberam TAT-CNTF, PBS e ST ( $229,00 \pm 12,66$ ,  $217,19 \pm 8,33$  e  $230,53 \pm 12,31$ , respectivamente). O grupo que recebeu TAT-CNTF não apresentou diferença significativa quando comparado com os grupos controle (PBS e ST) (Figura 21).

A análise morfométrica da GBR dos animais com 15 dias de sobrevivência revelou que a média das áreas dos vacúolos lipídicos dos animais tratados com CNTF ( $1224,27 \pm 43,88\ \mu\text{m}^2$ ) foi semelhante à observada nos animais tratados com TAT-CNTF durante 5 ( $1654,56 \pm 81,53\ \mu\text{m}^2$ ) ou 15 dias ( $1510,33 \pm 182,86\ \mu\text{m}^2$ ). Contudo, as áreas dos vacúolos lipídicos nos grupos tratados com CNTF ou TAT-CNTF foram significativamente inferiores às verificadas nos animais que receberam PBS por 5 ou 15 dias e sem tratamento (PBS 5 dias:  $2851,41 \pm 152,32\ \mu\text{m}^2$ ; PBS 15 dias:  $2965,37 \pm 178,06\ \mu\text{m}^2$ ; ST:  $2797,8 \pm 115,35\ \mu\text{m}^2$ ;  $P < 0,001$ ). Não foi observada diferença entre os grupos controle (PBS 5 ou 15 dias e ST). Além disso, nos animais tratados com CNTF por 5 dias, TAT-CNTF por 5 ou 15 dias,

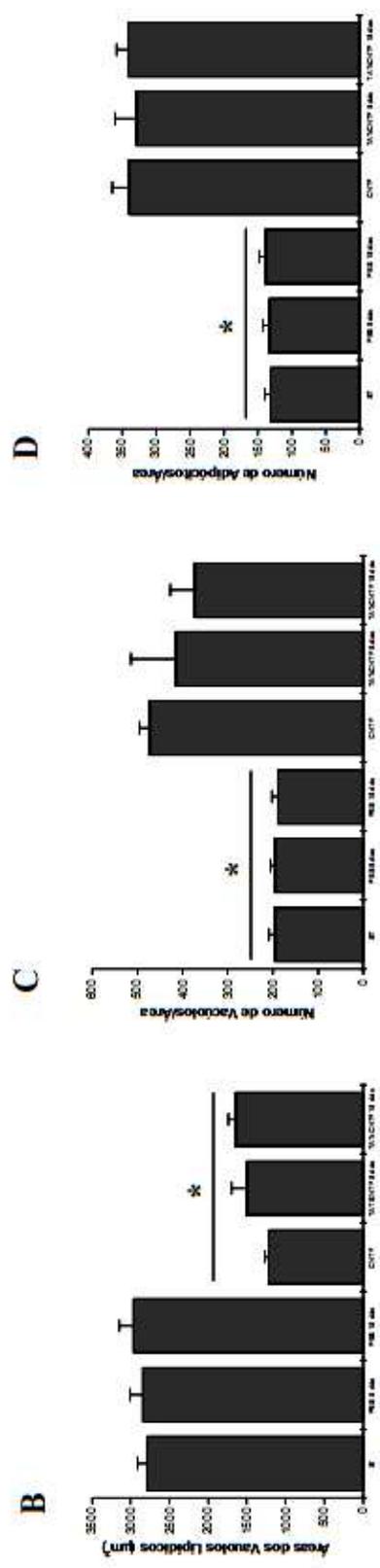
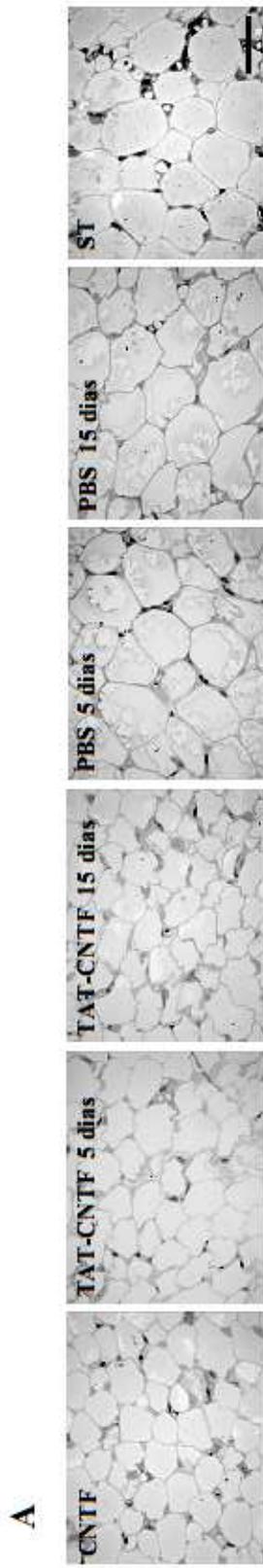
apenas 58%, 60% e 66% dos vacúolos lipídicos tinham área superior a  $1000\mu\text{m}^2$ , respectivamente. Este dado contrastou com o observado nos grupos controle (PBS 5 dias: 95%; PBS 15 dias: 96%, ST: 95%). Adicionalmente, o número médio de vacúolos lipídicos por unidade de área nos animais tratados CNTF ou TAT-CNTF foi expressivamente maior (CNTF:  $474,08\pm 22,04/\text{mm}^2$ ; TAT-CNTF 5 dias:  $373,74\pm 54,03/\text{mm}^2$ ; TAT-CNTF 15 dias:  $416,12\pm 98,27/\text{mm}^2$ ) que o observado nos animais que receberam PBS e ST (PBS 5 dias:  $197,12\pm 7,83/\text{mm}^2$ ; PBS 15 dias:  $189,74\pm 12,51/\text{mm}^2$ ; ST:  $196,85\pm 11,75/\text{mm}^2$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 22).

A contagem do número de núcleos de adipócitos por área mostrou que a densidade de adipócitos na GBR dos animais tratados com CNTF ( $340,66\pm 24,26/\text{mm}^2$ ) foi semelhante à observada nos animais tratados com TAT-CNTF (TAT-CNTF 5 dias:  $341,75\pm 16,91/\text{mm}^2$ ; TAT-CNTF 15 dias:  $330,27\pm 29,95/\text{mm}^2$ ). Contudo, a densidade de adipócitos nestes últimos foi superior à observada nos animais que receberam PBS e nos animais sem tratamento (PBS 5 dias:  $134,24\pm 8,57/\text{mm}^2$ ; PBS 15 dias:  $138,89\pm 9,22/\text{mm}^2$ ; ST:  $132,33\pm 7,86/\text{mm}^2$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 22).

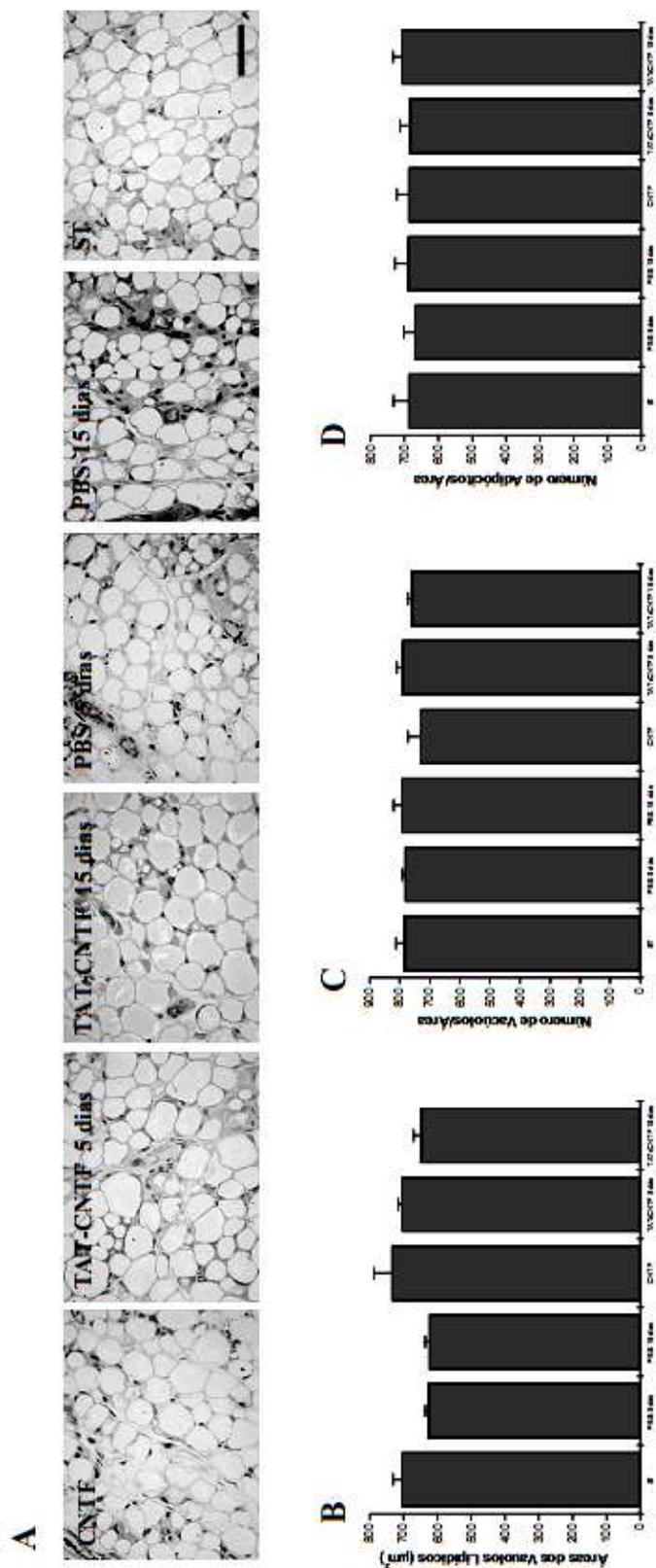
A análise morfométrica da GBE confirmou os dados morfológicos. Desta forma, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nas áreas dos vacúolos lipídicos, no número de vacúolos e na densidade de adipócitos entre todos os grupos experimentais (Figura 23).



**Figura 21:** Os gráficos mostram a distribuição das áreas dos vacúolos lipídicos da Gordura Branca Retroperitoneal (GBR) dos animais neonatos (P7) sem lesão tratados com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou Sem Tratamento (ST) (A). Em B as figuras correspondem a uma das áreas amostradas para a avaliação morfológica da GBR em cada situação experimental, respectivamente. Em C gráfico representativo das médias de áreas dos vacúolos dos animais tratados com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou ST. Em D gráfico representativo do número de adipócitos por unidade de área (mm<sup>2</sup>) dos animais tratados com CNTF, TAT-CNTF, PBS e ST. Os vacúolos dos animais tratados com CNTF estavam 23,3% acima de 750µm<sup>2</sup> enquanto que nos animais que receberam TAT-CNTF, PBS e ST este percentual foi de 68,3%, 86,6% e 88,8%, respectivamente. A média das áreas dos vacúolos lipídicos dos animais tratados com CNTF foi expressivamente inferior aos demais grupos analisados (\*p<0,001). Além disso, o grupo tratado com TAT-CNTF exibiu uma média da área dos vacúolos inferior aos grupos controle (PBS e ST; \*\*p<0,05). Notar o maior número de adipócitos por unidade de área nos animais tratados com CNTF quando comparado com os animais que receberam TAT-CNTF, PBS e ST (\*p<0,001). Os valores mostrados correspondem à média±erro padrão. Barra = 30µm.



**Figura 22:** As figuras correspondem a uma das áreas amostradas para a avaliação morfológica da gordura branca retroperitoneal dos animais neonatos (P17) sem lesão tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou Sem Tratamento (ST) (A). Em B gráfico representativo das médias de áreas dos vacúolos dos animais tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou ST. Em C gráfico representativo do número de vacúolos lipídicos por unidade de área dos animais tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS e ST. Em D gráfico representativo do número de adipócitos por unidade de área dos animais tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS e ST. A média das áreas dos vacúolos lipídicos dos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF foi expressivamente inferior aos demais grupos analisados (\* $p < 0,001$ ). Notar o maior número de vacúolos lipídicos e de adipócitos por unidade de área nos animais tratados com CNTF e TAT-CNTF quando comparado com os animais que receberam PBS e ST (\* $p < 0,001$ ). Os valores mostrados correspondem a Média  $\pm$  EPM. Barra = 50  $\mu$ m.



**Figura 23:** As figuras correspondem a uma das áreas amostradas para a avaliação morfológica da gordura branca epididimal dos animais neonatos (P17) sem lesão tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou Sem Tratamento (ST) (A). Em B gráfico representativo das médias de áreas dos vacúolos dos animais tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS ou ST. Em C gráfico representativo do número de vacúolos lipídicos por unidade de área dos animais tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS e ST. Em D gráfico representativo do número de adipócitos por unidade de área dos animais tratados durante 5 ou 15 dias com CNTF, TAT-CNTF, PBS e ST. Não houve diferenças nas características morfológicas em todos os grupos experimentais. Notar que os parâmetros morfológicos não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos experimentais analisados. Os valores mostrados correspondem à Média±EPM. Barra = 50µm.

**TABELA 4** – Quadro sinóptico comparativo dos efeitos dos tratamentos com TAT-CNTF e CNTF sobre os parâmetros relacionados ao metabolismo energético de animais íntegros.

	P2 – P7		P2 – P7 → P17		P2 – P17
	TAT-CNTF	CNTF	TAT-CNTF	CNTF	TAT-CNTF
Glicose	↓	↓	□	↓	□
Triglicérides	□	↓	□	□	↑
Colesterol	↑	□	↑	↑	↑
Ácidos Graxos Livres	↓	□	□	□	□
Gordura Marrom	□	↓	↓	↓	↓
Gordura Branca	↓	↓	↓	↓	↓

**LEGENDA**

P2 – P7: Tratamento por 5 dias, da idade P2 à idade P6; sacrifício na idade P7

P2 – P7 → P17: Tratamento por 5 dias, da idade P2 à idade P6; sacrifício na idade P17

P2 – P17: Tratamento por 15 dias, da idade P2 à idade P16; sacrifício na idade P17

↑/↓ : Aumento/Diminuição de pequena intensidade em relação aos animais controle (PBS e ST)

↑/↓ : Aumento/Diminuição de moderada intensidade em relação aos animais controle (PBS e ST)

↑/↓ : Aumento/Diminuição de grande intensidade em relação aos animais controle (PBS e ST)

□ : Sem alteração em relação aos animais controle (PBS e ST)

#### 4.7. Recuperação Funcional Motora

Os resultados obtidos através do V-WTT revelaram que o índice de funcionalidade do nervo isquiático (SFI) foi aumentando ao longo do tempo para todos os animais que sofreram lesão ( $F_{3, 60}=92,35$ ;  $p<0,0001$ ). Por sua vez, o SFI dos animais tratados com CNTF por 5 dias, ou com TAT-CNTF por 5 ou 15 dias foi significativamente superior ao dos animais que receberam PBS ( $F_{4, 60}=35,28$ ,  $p<0,0001$ ). Além disso, não houve diferença entre os grupos tratados com as moléculas neurotróficas, independentemente do tempo de tratamento ( $F_{2,36}=0,27$ ;  $p=0,7664$ ). Também não houve diferença entre os grupos que receberam PBS por 5 ou 15 dias após o esmagamento do nervo isquiático ( $F_{1, 24}=1,24$ ;  $p=0,2978$ ). Como esperado, o valor do SFI dos animais íntegros se manteve praticamente constante ao longo do tempo ( $p=0,2989$ ) e superior ao

dos demais grupos ( $F_5, 72=103,11$ ;  $p<0,0001$ ). Vale notar que após 60 dias da lesão os animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF apresentaram um SFI aproximadamente três vezes inferior ao dos animais íntegros, ao passo que para os animais controle (PBS) este valor foi aproximadamente seis vezes inferior (Tabela 5; Figura 24).

Empregando o P-WTT foram obtidos dados semelhantes aos registrados com o V-WTT para os grupos tratados com CNTF, com TAT-CNTF por 5 ou 15 dias e com PBS por 5 dias ou 15 dias (Tabela 6). A comparação estatística dos dados revelou não haver diferenças entre os mesmos, considerando-se os valores do SFI obtidos em ambos os testes para o mesmo tipo de tratamento ao longo do tempo (Tabela 7). Por outro lado, a análise estatística indicou haver diferença entre os dados obtidos com o P-WTT e o V-WTT para os grupos PBS 15 dias e de animais íntegros (Tabela 7). Contudo, a comparação dos valores de SFI (pós-teste de Bonferroni) mostrou que houve diferença significativa entre esses grupos no P-WTT e V-WTT, respectivamente, em apenas em um dos tempos de avaliação. Ou seja, nos animais tratados com PBS por 15 dias o valor de SFI no P-WTT diferiu do obtido no V-WTT apenas 30 dias após a lesão. Nos animais íntegros a diferença foi observada apenas no primeiro dia teste, que correspondeu ao 20º dia após a lesão nos animais tratados (Figura 24).

TABELA 5

Índice de Funcionalidade do n. isquiático (SFI) obtido através do V-WTT após 20, 30, 45 e 60 dias da lesão

Tratamento	Tempo de tratamento (dias)	SFI							
		20 dias		30 dias		45 dias		60 dias	
CNTF	5	-43,69±1,65	Aa	-34,39±2,57	Ab	-20,40±1,83	Ac	-18,10±1,62	Ac
TAT-CNTF	5	-38,64±3,07	Aa	-34,10±1,80	Aa	-19,57±1,73	Ab	-18,13±2,75	Ab
TAT-CNTF	15	-40,79±3,55	Aa	-33,03±1,80	Aa	-21,94±2,62	Ab	-19,45±2,87	Ab
PBS	5	-52,50±3,67	Ba	-50,32±1,34	Ba	-43,59±2,73	Bb	-36,74±2,33	Bb
PBS	15	-50,92±1,84	Ba	-44,97±2,59	Ba	-41,19±1,17	Bb	-37,10±0,89	Bb
ÍNTEGROS	---	-7,03±1,27	Ca	-6,23±0,83	Ca	-6,29±1,26	Ca	-6,18±1,30	Ca

As letras maiúsculas anotadas ao lado da média correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas com os diferentes tratamentos (colunas). As letras minúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas após 20, 30, 45 e 60 dias para cada grupo (linha).

TABELA 6

Índice de Funcionalidade do Isquiático (SFI) obtido através do P-WTT após 20, 30, 45 e 60 dias da lesão

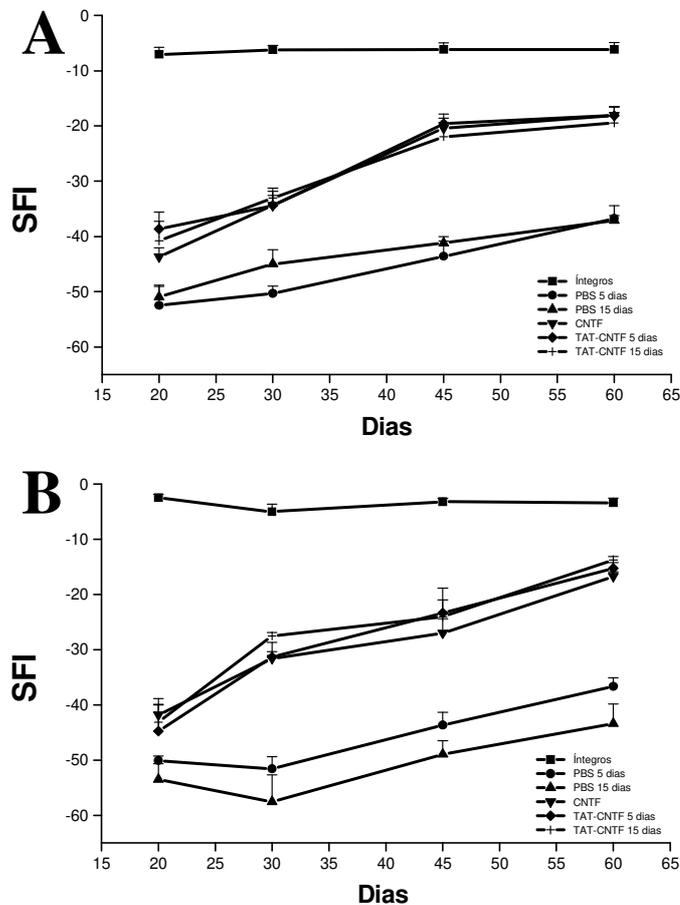
Tratamento	Tempo de tratamento (dias)	SFI							
		20 dias		30 dias		45 dias		60 dias	
CNTF	5	-41,81±1,94	Aa	-31,57±1,25	Ab	-27,01±2,61	Ac	-16,75±0,89	Ac
TAT-CNTF	5	-44,73±4,7	Aa	-31,33±2,67	Aa	-23,34±4,52	Ab	-15,28±1,09	Ab
TAT-CNTF	15	-43,08±4,23	Aa	-27,48±0,61	Aa	-24,05±3,10	Ab	-13,74±0,65	Ab
PBS	5	-50,06±0,82	Ba	-51,57±2,20	Ba	-43,64±2,29	Bb	-36,62±1,54	Bb
PBS	15	-53,49±2,90	Ba	-57,52±4,85	Ba	-48,94±2,46	Bb	-43,36±3,55	Bb
ÍNTEGROS	---	-2,47±0,64	Ca	-5,01±1,37	Ca	-3,19±0,62	Ca	-3,39±0,88	Ca

As letras maiúsculas anotadas ao lado da média correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas com os diferentes tratamentos (colunas). As letras minúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas após 20, 30, 45 e 60 dias para cada grupo (linha).

TABELA 7

Comparação dos Índices de Funcionalidade do Isquiático obtidos através do V-WTT e P-WTT

Tratamento	Tempo de tratamento (dias)	V-WTT vs P-WTT	
CNTF	5	$F_{1,24}=0,01$	$P=0,921$
TAT-CNTF	5	$F_{1,24}=0,14$	$P=0,717$
TAT-CNTF	15	$F_{1,24}=0,54$	$P=0,473$
PBS	5	$F_{1,24}=0,03$	$P=0,877$
PBS	15	$F_{1,24}=13,51$	$P=0,001$
ÍNTEGROS	---	$F_{1,24}=16,67$	$P=0,004$



**Figura 24:** Gráficos da avaliação da recuperação funcional motora através do Walking Track Test [A] V-WTT; B) P-WTT] dos animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias), PBS (5 e 15 dias) após 20, 30, 45 e 60 dias do esmagamento do nervo isquiático na idade P2. Os animais íntegros são da mesma idade dos animais dos grupos experimentais. Os resultados do V-WTT revelaram que o índice de funcionalidade do nervo isquiático (SFI) foi aumentando ao longo do tempo para todos os animais que sofreram lesão ( $F_{3, 60}=92,35$ ;  $P<0,0001$ ). O SFI dos animais tratados com CNTF por 5 dias, ou com TAT-CNTF por 5 ou 15 dias foi significativamente superior ao dos animais que receberam PBS ( $F_{4, 60}=35,28$ ,  $P<0,0001$ ). Notar que após 60 dias da lesão os animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF apresentaram um SFI aproximadamente três vezes inferior ao dos animais íntegros, ao passo que para os animais controle (PBS) este valor foi aproximadamente seis vezes inferior. O dados do P-WTT foram semelhantes aos registrados com o V-WTT para os grupos tratados com CNTF, com TAT-CNTF por 5 ou 15 dias e com PBS por 5 dias ou 15 dias. Os valores apresentados correspondem à Média±EPM.

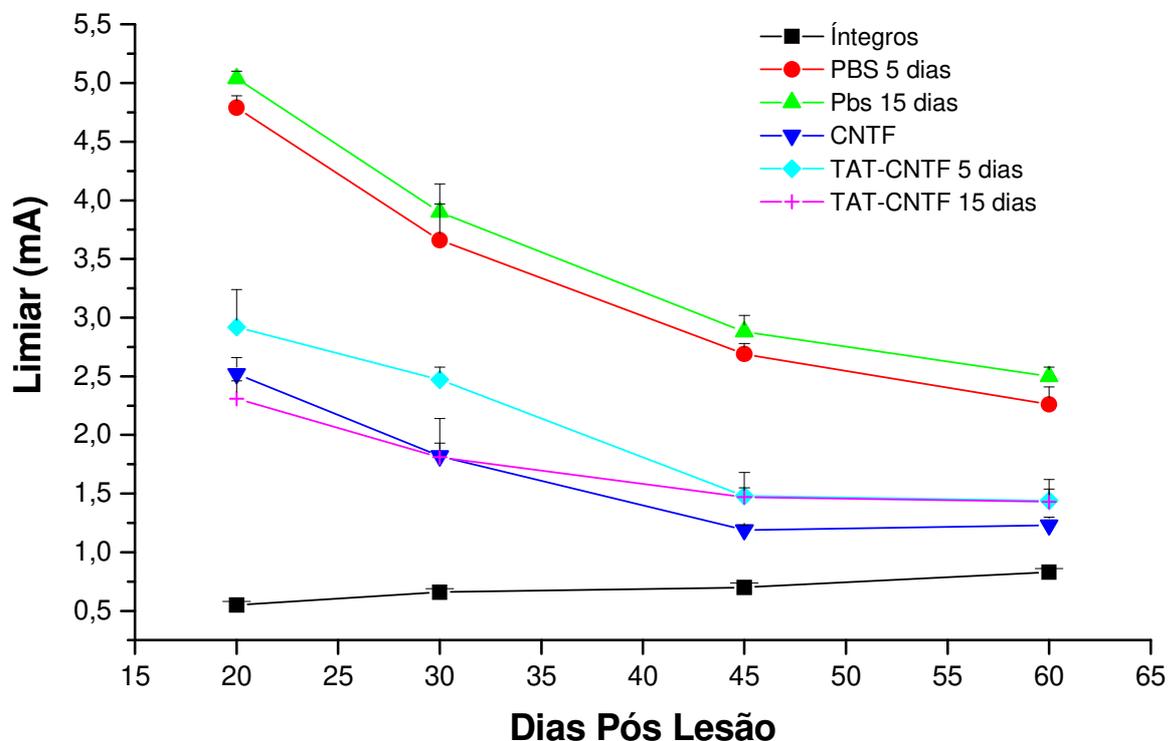
#### 4.8 Recuperação Funcional Sensitiva

Previamente à avaliação da recuperação funcional sensitiva dos animais lesados, procedemos à padronização do método e a obtenção dos valores do limiar de resposta ao estímulo elétrico em animais íntegros. Assim, o limiar de resposta nos ratos íntegros com 22 dias de idade, que corresponde a 20 dias pós-lesão nos demais ratos, foi aproximadamente 10 vezes inferior ao destes animais ( $0,55\pm 0,03\text{mA}$ ). Embora este valor tenha se mantido inferior ao dos animais lesados, esse valor aumentou gradativamente com o tempo ( $0,66\pm 0,03\text{ mA}$ ,  $0,70\pm 0,04\text{ mA}$  e  $0,83\pm 0,03\text{mA}$ , respectivamente; Figura 25).

A avaliação da recuperação funcional sensitiva mostrou que após 20 dias da lesão o limiar de resposta à estimulação elétrica foi expressivamente menor nos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF quando comparados aos animais que receberam PBS. Esta diferença se manteve nos tempos posteriores de avaliação, evidenciando assim a ação neuroprotetora/estimuladora do CNTF e da TAT-CNTF para a sobrevivência dos neurônios sensoriais e sua regeneração axonal.

É interessante notar que em todos os grupos houve uma evidente redução do limiar de resposta ao estímulo elétrico em função do tempo pós-lesão. Assim nos animais tratados com PBS por 5 ou 15 dias esta redução foi observada após 30 dias ( $3,66\pm 0,31$  e  $3,90\pm 0,24\text{mA}$ , respectivamente) e 45 dias ( $2,69\pm 0,09$  e  $2,88\pm 0,14\text{mA}$ , respectivamente) pós-lesão não havendo diferenças estatisticamente significativas entre o 45° e 60° dia ( $2,26\pm 0,15$  e  $2,50\pm 0,08\text{mA}$ , respectivamente). Além disso, os grupos que receberam PBS exibiram limiar de resposta semelhante em todos os tempos avaliados (Figura 25).

A expressiva melhora obtida no limiar de resposta ao estímulo elétrico nos animais tratados com CNTF e TAT-CNTF foi aproximadamente 50% da observada nos grupos tratados com PBS. No 20º dia após a lesão em P2 os animais que receberam CNTF por 5 dias e TAT-CNTF por 5 e 15 dias ( $2,52 \pm 0,14$ ,  $2,31 \pm 0,15$ mA e  $2,92 \pm 0,32$ mA, respectivamente) apresentaram respostas semelhantes. Adicionalmente, no 30º dia pós-lesão o limiar de resposta dos animais tratados por 5 dias com TAT-CNTF ( $2,47 \pm 0,11$ mA) foi significativamente superior ao obtido nos grupos tratados com CNTF por 5 dias e TAT-CNTF por 15 dias ( $1,82 \pm 0,32$  e  $1,81 \pm 0,12$ mA, respectivamente). Entre estes dois últimos grupos a resposta obtida foi praticamente igual. É interessante notar, que 45 dias pós-lesão os grupos tratados com CNTF ( $1,19 \pm 0,04$ mA) e TAT-CNTF (5 dias:  $1,48 \pm 0,20$ mA e 15 dias:  $1,47 \pm 0,08$ mA) tiveram o mesmo padrão de resposta que se manteve estável até 60º dia (CNTF:  $1,23 \pm 0,07$ mA; TAT-CNTF 5 dias:  $1,44 \pm 0,18$ mA; TAT-CNTF 15 dias:  $1,43 \pm 0,11$ ; Figura 25).



**Figura 25:** Gráfico representativo do limiar de resposta ao estímulo elétrico dos animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias), PBS (5 e 15 dias) e íntegros. Os registros foram realizados 20, 30, 45 e 60 dias após o esmagamento do nervo isquiático na idade P2. Notar que após 20 dias da lesão o limiar de resposta dos animais tratados com TAT-CNTF e CNTF é expressivamente inferior ao dos animais que receberam PBS. Embora o valor do limiar tenha diminuído gradualmente com o tempo em todos os grupos, nos animais tratados com CNTF e TAT-CNTF ele sempre se manteve aproximadamente 50% inferior ao dos grupos controle (PBS). Notar que no 60º dia após a lesão o limiar de resposta dos animais tratados com TAT-CNTF e CNTF se aproximou dos valores observados nos animais íntegros, embora ainda seja superior ao destes últimos. Os valores apresentados correspondem a média±erro padrão.

#### 4.9 Número e diâmetro dos motoneurônios na intumescência lombar

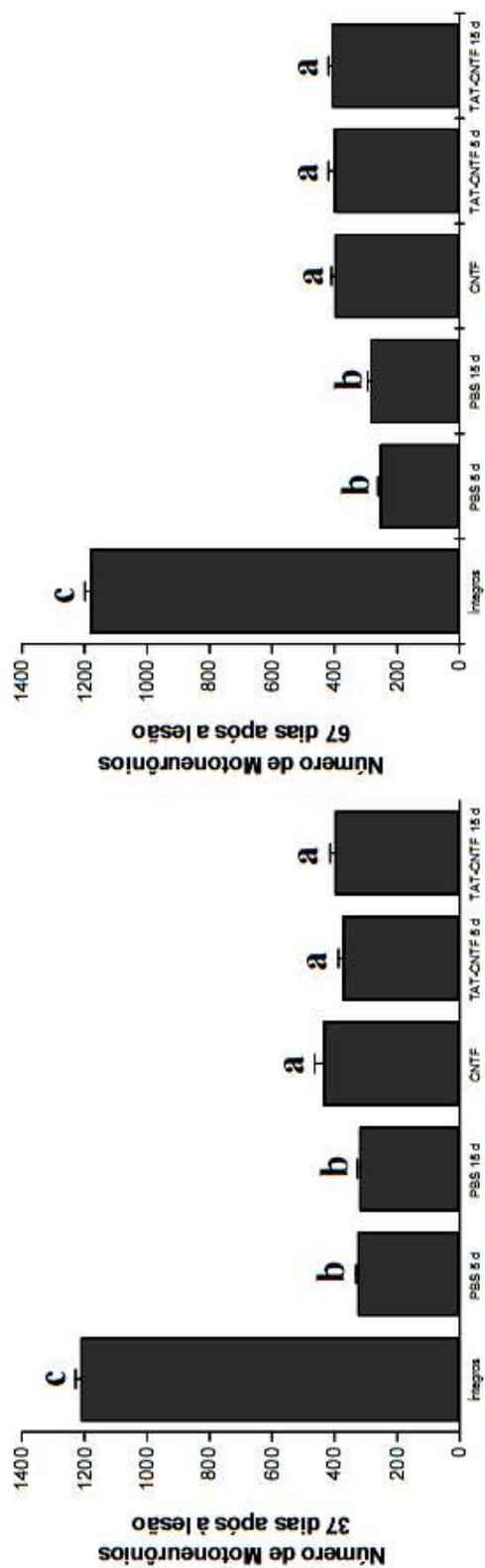
Os resultados mostraram que 37 dias após a lesão em P2 o número de motoneurônios sobreviventes nos animais tratados por 5 dias com 1,2µg/g/dia de CNTF foram significativamente superiores ( $433,79 \pm 29,64$ ) ao observado no grupo tratado por 5 dias com PBS ( $325,94 \pm 5,47$ ;  $p < 0,01$ ) e inferiores aos animais íntegros sem tratamento

(1212,95±15,77;  $p<0,001$ ). Esses valores corresponderam, respectivamente, a 36% e 27% dos motoneurônios presentes nos animais íntegros. Além disso, o número de neurônios motores dos animais tratados por 5 ou 15 dias com 1,2µg/g/dia de TAT-CNTF (371,99±15,55 e 399,59±15,15, respectivamente) também foram maiores quando comparados aos observados nos grupos tratados por 5 ou 15 dias com PBS (325,94±5,47 e 319,37±7,87, respectivamente;  $p<0,05$ ) e menores que dos animais íntegros ( $p<0,001$ ). Esses valores corresponderam a 31%, 33%, 27% e 26% ao registrado nos animais íntegros, respectivamente. Não houve diferenças entre os grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF (Figura 26 e 27). A análise dos diâmetros dos motoneurônios não revelou diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos (Figura 28).

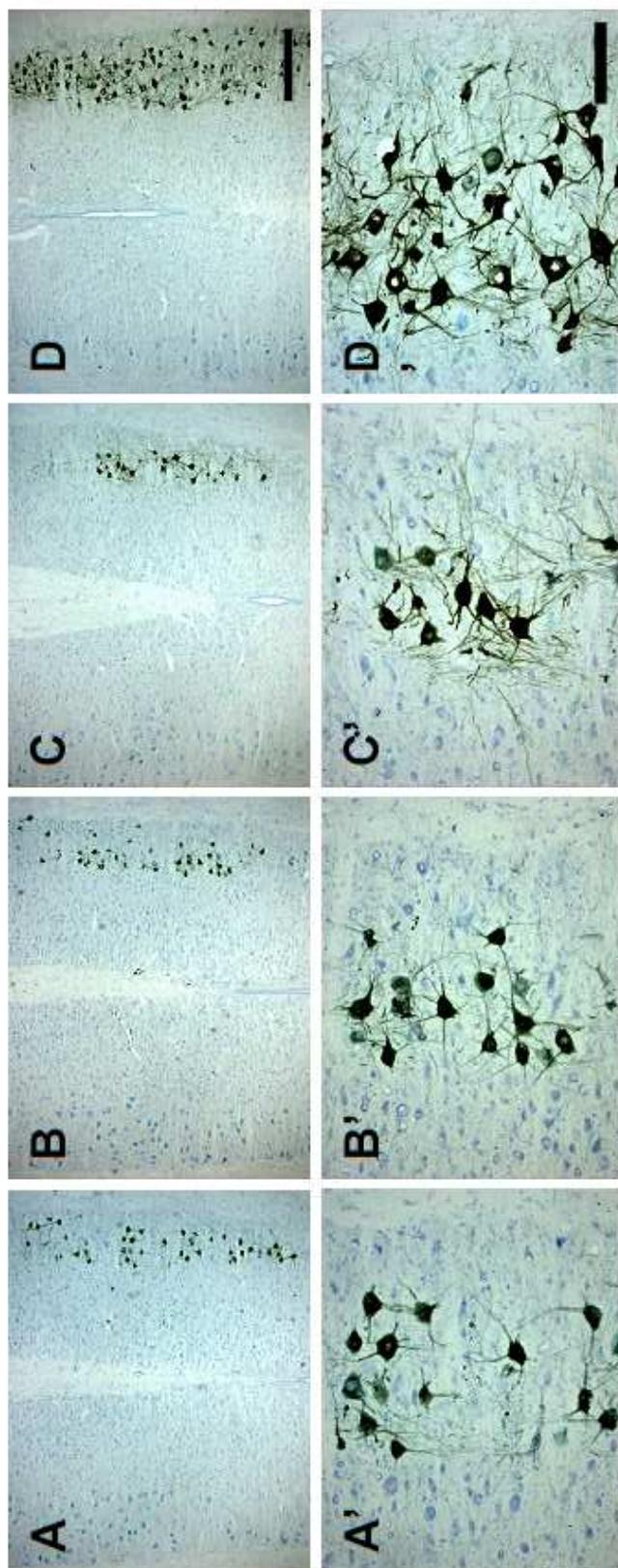
A contagem de motoneurônios nos animais com sobrevida de 67 dias revelou um maior o número dessas células nos animais tratados por 5 dias com CNTF (399,39±10,56;  $n=5$ ) quando comparados com os animais que receberam PBS (253,70±7,67;  $n=6$ ;  $p<0,001$ ) e menor quando comparados com os animais íntegros (1181,43±17,22;  $n=5$ ;  $p<0,001$ ). Esses valores corresponderam, respectivamente, a 34% e 21% dos motoneurônios presentes nos animais íntegros. Os grupos tratados por 5 ou 15 dias com TAT-CNTF (400,26±19,32 e 408,45±10,62, respectivamente) também mostraram número de células superior ao dos respectivos grupos tratados com PBS (5 dias: 253,70±7,67; 15 dias: 285,70±8,84;  $p<0,05$ ) e inferior ao grupo íntegro ( $p<0,001$ ). Esses dados corresponderam a 34% e 35% dos obtidos nos animais normais, respectivamente. Como ocorreu nos animais com sobrevida de 37 dias também não houve diferenças entre os grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF (Figura 26 e 27). Interessantemente, o diâmetro dos motoneurônios se mostrou semelhante entre os grupos tratados com CNTF (31,20±0,83µm), TAT-CNTF por 5 dias (32,59±0,68

$\mu\text{m}$ ), TAT-CNTF por 15 dias ( $30,86\pm 0,63\mu\text{m}$ ) e íntegros ( $31,98\pm 0,74\mu\text{m}$ ), mas significativamente superior ao diâmetro dos neurônios motores dos animais que receberam PBS durante 5 ou 15 dias ( $28,40\pm 1,00\mu\text{m}$  e  $26,32\pm 0,85\mu\text{m}$ , respectivamente;  $p<0,05$ ; Figura 29).

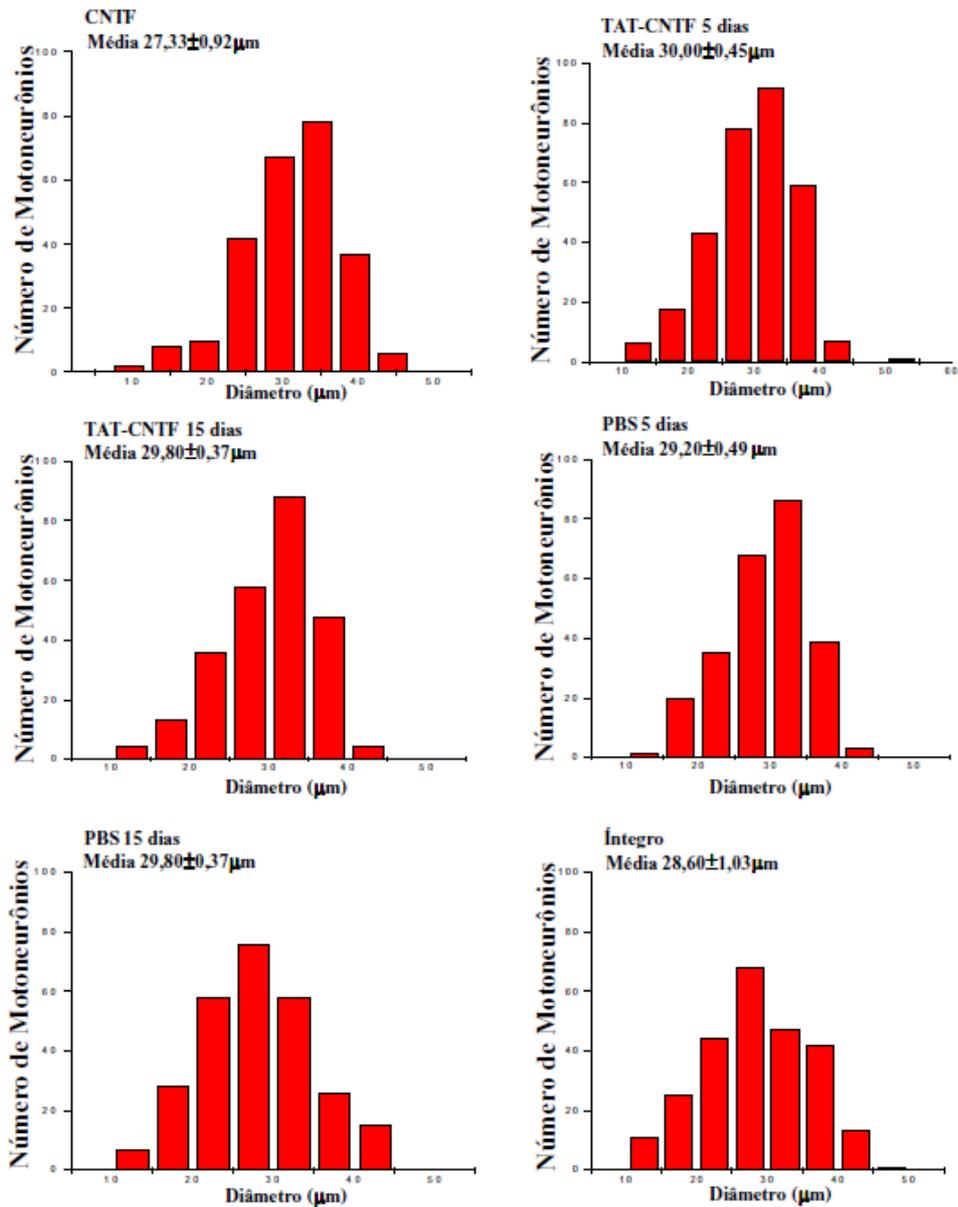
A comparação do número de motoneurônios marcados com BDA entre os animais que sobreviveram por 37 e 67 dias após axotomia não revelou diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos tratados como CNTF ou TAT-CNTF. Por outro lado, os animais tratados com PBS durante 5 ou 15 dias que tiveram sobrevivência de 67 dias apresentaram significativa queda no número de motoneurônios quando comparados aos sacrificados após 37 dias ( $p<0,01$ ; Figura 26)



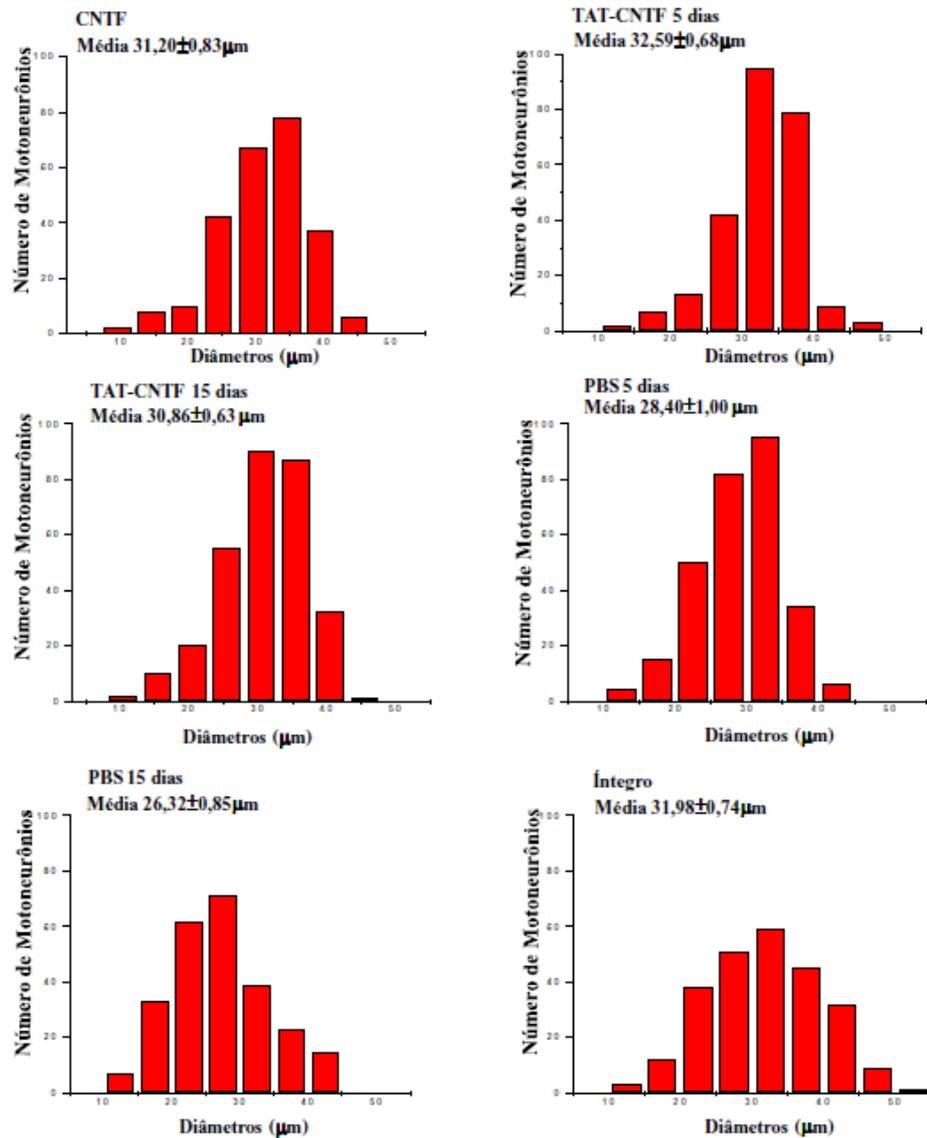
**Figura 26:** Número de motoneurônios dos animais que tiveram o nervo ciático esmagado na idade P2 e tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias) ou PBS (5 e 15 dias), e Integros sem tratamento com sobrevivência de 37 e 67 dias. O tratamento com TAT-CNTF promoveu a sobrevivência de um número de motoneurônios semelhante ao promovido pelo tratamento com CNTF e superior ao dos grupos tratados com PBS ( $p < 0,05$ ) 37 e 67 dias após a lesão. Note que nos animais que receberam PBS por 5 e 15 dias o número de motoneurônios sobreviventes após 67 dias a lesão é menor que o observado 37 dias pós-lesão. Em todos os animais tratados com CNTF, TAT-CNTF e PBS o número de motoneurônios foi inferior ao dos animais integros 37 e 67 dias após a lesão ( $p < 0,001$ ). Os valores correspondem à média ± erro padrão. As letras anotadas sobre cada coluna correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas com os diferentes tratamentos.



**Figura 27:** Cortes longitudinais da região da intumescência lombar da medula representativos de um animal de cada grupo que recebeu tratamento com doses diárias subcutâneas de CNTF (1,2µg/g; A e A'), TAT-CNTF (1,2µg/g; B e B') ou PBS (C e C') e íntegro não tratado (D e D'). Os animais tratados sofrem esmagamento do nervo ciático na idade P2, foram submetidos à marcação dos motoneurônios com o traçador BDA na idade P60 e foram sacrificados na idade P67. As imagens mostram que os animais tratados TAT-CNTF apresentam número de motoneurônios carregados com BDA semelhante ao dos animais tratados com CNTF e superior ao observado nos tratados com PBS, evidenciando assim a ação neuroprotetora de ambas moléculas. Barras: 500µm (A-D); 100µm (A'-D'); contra-coloração com Giemsa.



**Figura 28:** Os gráficos mostram a distribuição dos valores do diâmetro dos corpos celulares dos motoneurônios marcados com BDA, 37 dias após a lesão dos animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias) ou PBS (5 e 15 dias) e íntegros. A análise morfométrica não mostrou diferença entre a média do diâmetro dos corpos celulares de todos os grupos experimentais.



**Figura 29:** Os gráficos mostram a distribuição dos valores do diâmetro dos corpos celulares dos motoneurônios marcados com BDA, 67 dias após a lesão dos animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias) ou PBS (5 e 15 dias) e íntegros. A análise morfométrica mostrou que o diâmetro dos motoneurônios sobreviventes à lesão nos grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF é semelhante ao observado nos animais íntegros e maiores que o dos animais tratados com PBS.

#### 4.10 Número e diâmetro dos neurônios sensitivos

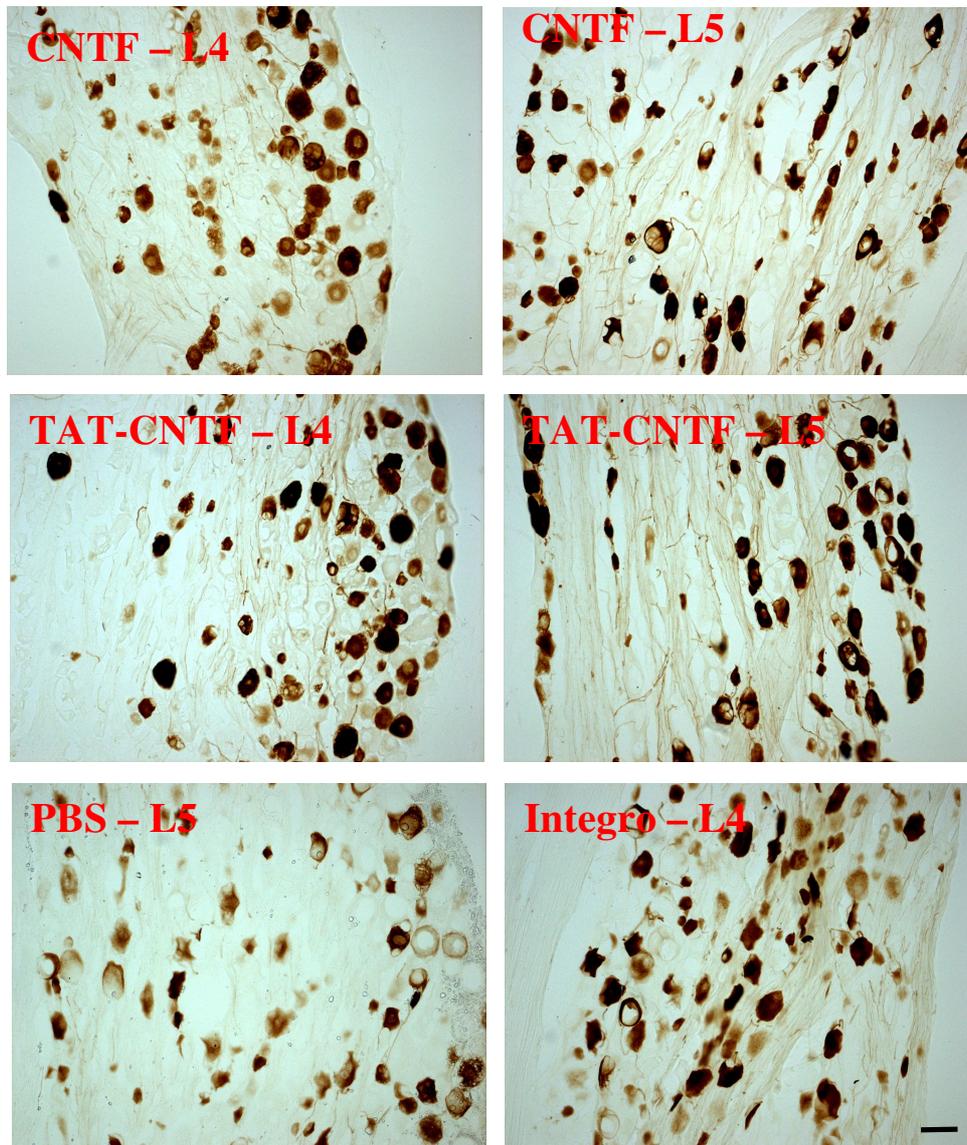
Nossos resultados mostraram que os tratamentos com TAT-CNTF e CNTF durante 5 dias promoveram um efeito neuroprotetor similar sobre os neurônios sensitivos dos gânglios das raízes dorsais L4 e L5. Após 37 dias do esmagamento do nervo isquiático os animais tratados com essas moléculas apresentaram um número total de neurônios contendo BDA (BDA<sup>+</sup>) significativamente superior aos dos animais tratados com PBS. Esta diferença também foi observada nos animais tratados por igual período (5 dias), mas que tiveram sobrevida de 67 dias. Por sua vez, o tratamento com TAT-CNTF durante 15 dias produziu efeito similar ao observado nos animais tratados por 5 dias, quer nos animais que tiveram sobrevida de 37, quer naqueles examinados após 67 dias (Figura 30 e 31).

Considerando-se cada gânglio em separado, pôde-se observar que o número de neurônios BDA<sup>+</sup> foi sempre superior nos gânglios L5 quando comparado ao dos gânglios L4 em todos os animais analisados, tratados e íntegros. Por sua vez, o número total de neurônios BDA<sup>+</sup> dos gânglios L4 e L5, computados nos animais íntegros, foi sempre superior ao dos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF, independentemente do tempo de tratamento ou de sobrevida. Por outro lado, vale destacar que nos animais tratados com essas moléculas o número de neurônios BDA<sup>+</sup> dos gânglios L4 e L5 corresponderam de 65% a 74% dos registrados nos animais íntegros, enquanto que nos animais que receberam PBS esse valor ficou entre 19% e 43% (Tabela 8).

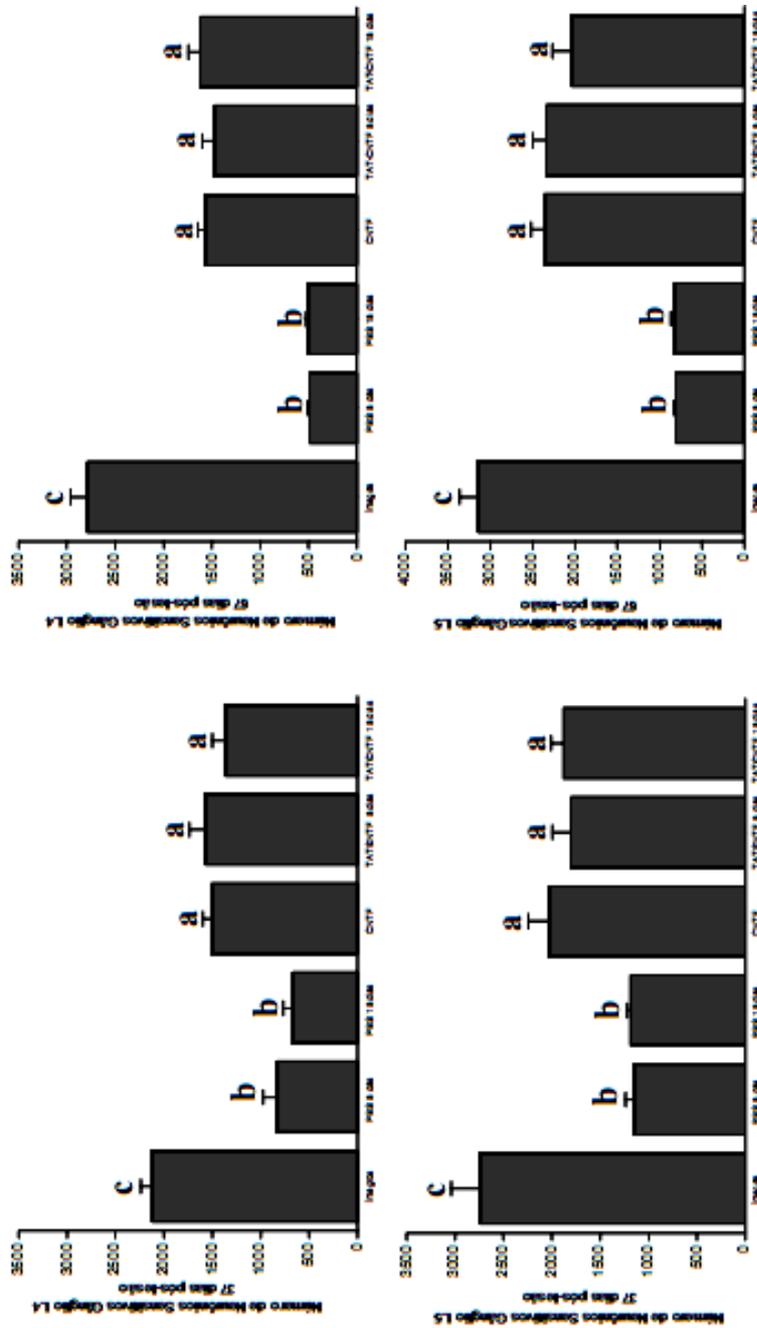
**TABELA 8 – Contagem do número de neurônios sensitivos dos gânglios L4 e L5 contendo BDA**

Tratamento	Tempo de tratamento (dias)	Tempo de sobrevivência após a lesão (dias)	Número de Neurônios		Percentual Relativo aos Animais Íntegros	
			Gânglio L4	Gânglio L5	Gânglio L4	Gânglio L5
CNTF	5	37	1511±87 Aa	2032±209 Ab	71	74
CNTF	5	67	1568±79 Aa	2366±151 Ab	56	75
TAT-CNTF	5	37	1573±161 Aa	1809±190 Ab	74	66
TAT-CNTF	5	67	1476±124 Aa	2340±158 Ab	53	74
TAT-CNTF	15	37	1367±131 Aa	1882±126 Ab	64	69
TAT-CNTF	15	67	1626±118 Aa	2045±221 Ab	58	65
PBS	5	37	832±142 Ba	1147±89 Bb	39	42
PBS	5	67	496±17 Ba	813±22 Bb	18	26
PBS	15	37	671±95 Ba	1188±32 Bb	32	43
PBS	15	67	517±12 Ba	830±38 Bb	19	26
ÍNTEGROS (39 dias)			2125±115 Ca	2744±295 Cb		
ÍNTEGROS (69 dias)			2793±167 Ca	3151±211 Cb		

As letras maiúsculas anotadas ao lado da média correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas com os diferentes tratamentos, tempo de tratamento e sobrevivência (coluna). As letras minúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas nos gânglios L4 e L5 em cada tratamento (linha).



**Figura 30:** Cortes longitudinais dos gânglios das raízes dorsais L4 e L5 representativos de um animal de cada grupo que recebeu tratamento com doses diárias subcutâneas de CNTF (1,2 $\mu$ g/g; 5 dias), TAT-CNTF (1,2 $\mu$ g/g; 15 dias) ou PBS (15 dias) e íntegro não tratado. Os animais tratados sofreram esmagamento do nervo isquiático na idade P2, foram submetidos à marcação dos neurônios sensitivos com o traçador BDA na idade P60 e sacrificados na idade P67. As imagens mostram que os animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF apresentam maior número de neurônios sensitivos e mais carregados com BDA que os animais tratados com PBS. Barras: 100 $\mu$ m.



**Figura 31:** Número de neurônios sensitivos dos gânglios das raízes dorsais L4 e L5 dos animais que tiveram o nervo ciático esmagado na idade P2 e tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias), PBS (5 e 15 dias) e animais íntegros sem tratamento após de 37 e 67 dias da lesão. O tratamento com CNTF e TAT-CNTF promoveu a sobrevivência de um número maior de neurônios sensitivos nos gânglios L4 e L5 quando comparado com os grupos tratados com PBS ( $p < 0,01$ ) 37 e 67 dias após a lesão. Todos os animais tratados com CNTF, TAT-CNTF e PBS o número de motoneurônios foi inferior ao dos animais íntegros 37 e 67 dias após a lesão ( $**p < 0,001$ ). Note que o número de neurônios sensitivos foi sempre superior nos gânglios L5 quando comparado ao dos gânglios L4 em todos os animais analisados, tratados e íntegros. Os valores correspondem à Média ± EP. As letras anotadas sobre cada coluna correspondem ao significado da comparação entre as médias reestruturadas com os diferentes tratamentos.

Os neurônios sensitivos BDA+ dos gânglios L4 e L5 após 37 e 67 dias da lesão exibiram diâmetro médio semelhante nos grupos tratados com CNTF, TAT-CNTF por 5 dias, TAT-CNTF por 15 dias, respectivamente (Tabela 9; Figura 32, 33, 34 e 35). Além disso, esse valor foi similar aos observado nos animais íntegros de idade correspondente e significativamente superior àquele registrado 37 e 67 dias após a lesão nos animais que receberam PBS durante 5 ou 15 dias (Tabela 9; Figura 32, 33, 34 e 35).

**TABELA 9 – Diâmetro médio dos neurônios sensitivos dos gânglios L4 e L5 contendo BDA**

Tratamento	Tempo de tratamento (dias)	Tempo de sobrevida após a lesão (dias)	Gânglio L4		Gânglio L5	
CNTF	5	37	28,49±0,67	Aa	32,29±0,90	Ab
CNTF	5	67	30,19±1,38	Aa	29,94±0,59	Ab
TAT-CNTF	5	37	26,70±0,53	Aa	27,46±0,63	Ab
TAT-CNTF	5	67	32,08±1,34	Aa	28,97±1,63	Ab
TAT-CNTF	15	37	28,44±0,75	Aa	27,52±0,74	Ab
TAT-CNTF	15	67	32,27±0,57	Aa	32,13±1,16	Ab
PBS	5	37	22,86±0,92	Ba	24,16±0,81	Bb
PBS	5	67	25,52±0,30	Ba	22,40±0,97	Bb
PBS	15	37	23,97±1,10	Ba	24,40±0,72	Bb
PBS	15	67	25,52±0,39	Ba	22,32±0,78	Bb
ÍNTEGROS (39 dias)			29,80±0,34	Ca	29,84±0,66	Cb
ÍNTEGROS (69 dias)			34,48±0,79	Da	31,21±0,52	Cb

As letras maiúsculas anotadas ao lado da média correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas com os diferentes tratamentos, tempo de tratamento e sobrevida (coluna). As letras minúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas nos gânglios L4 e L5 em cada tratamento (linha).

## Gânglio L4 – 37 dias

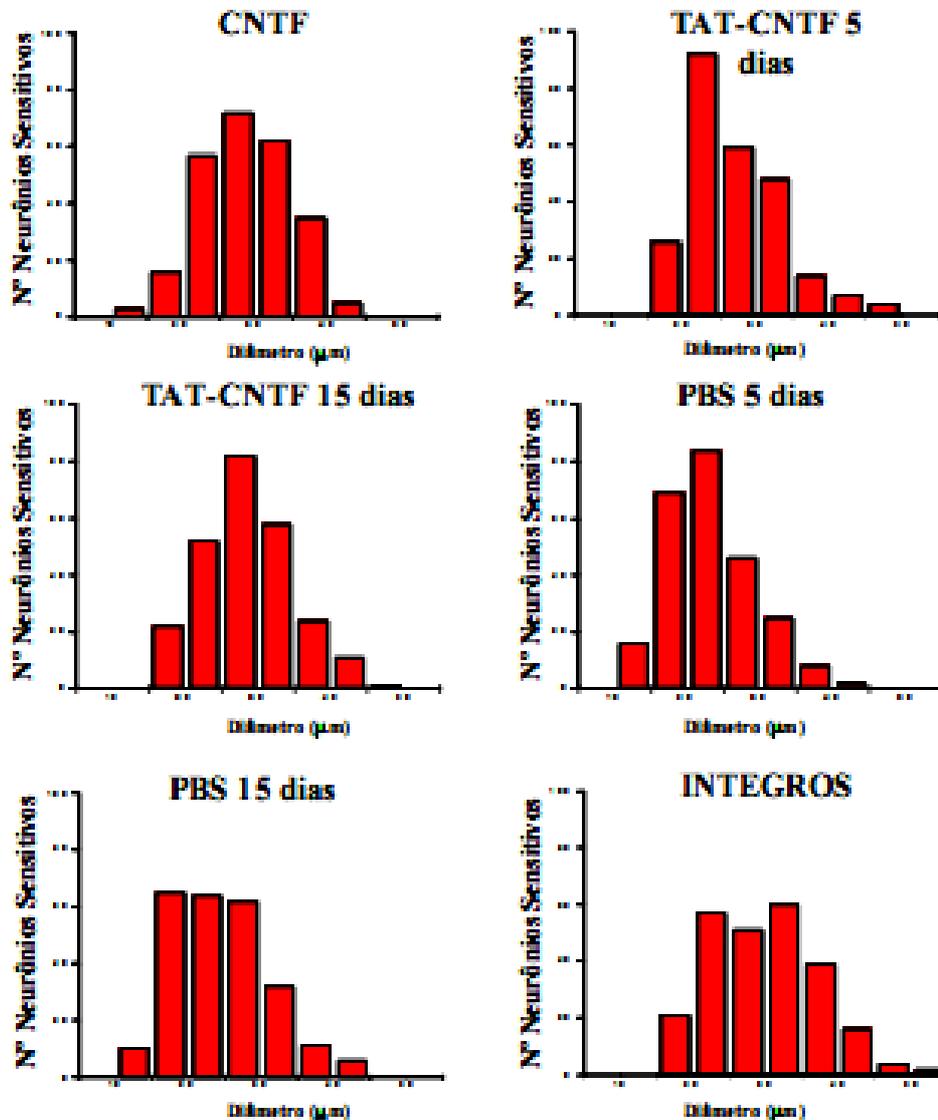
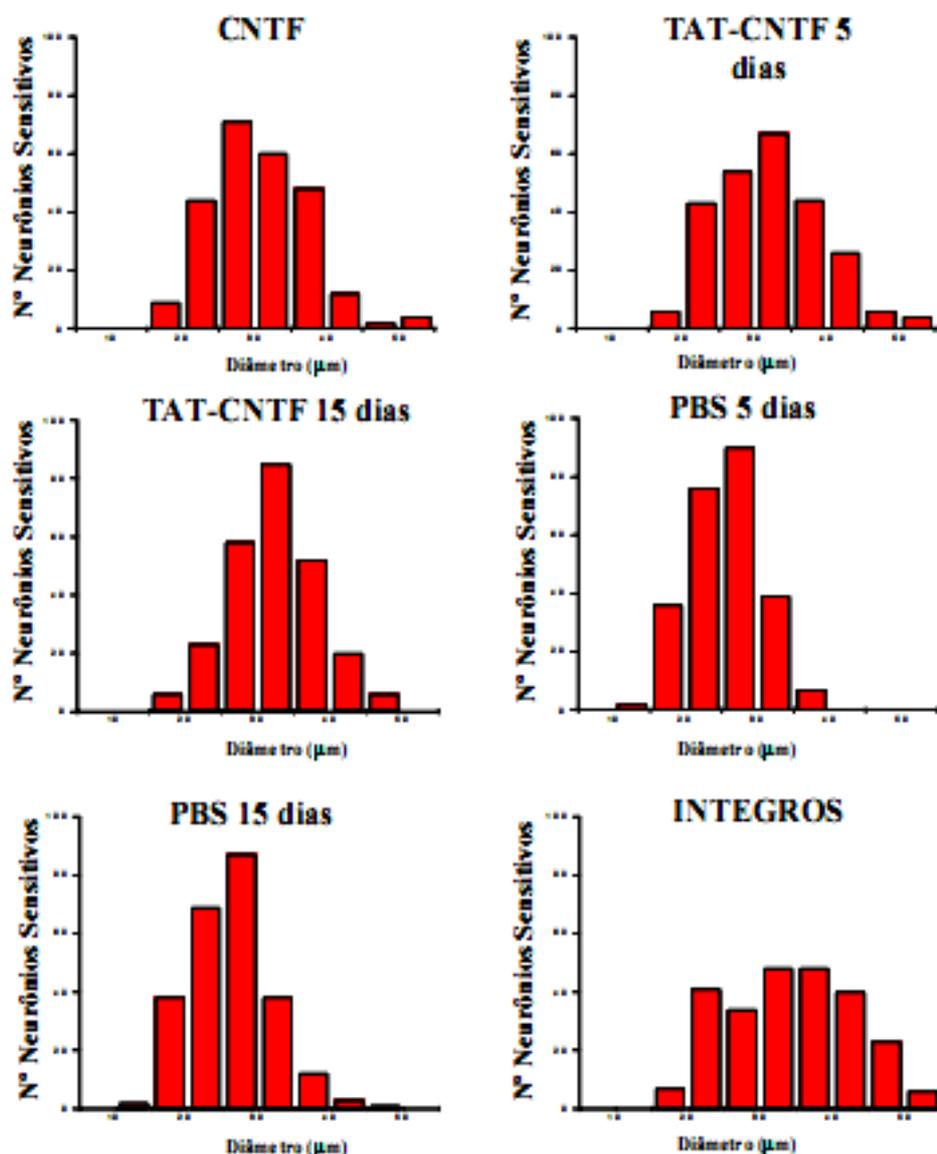


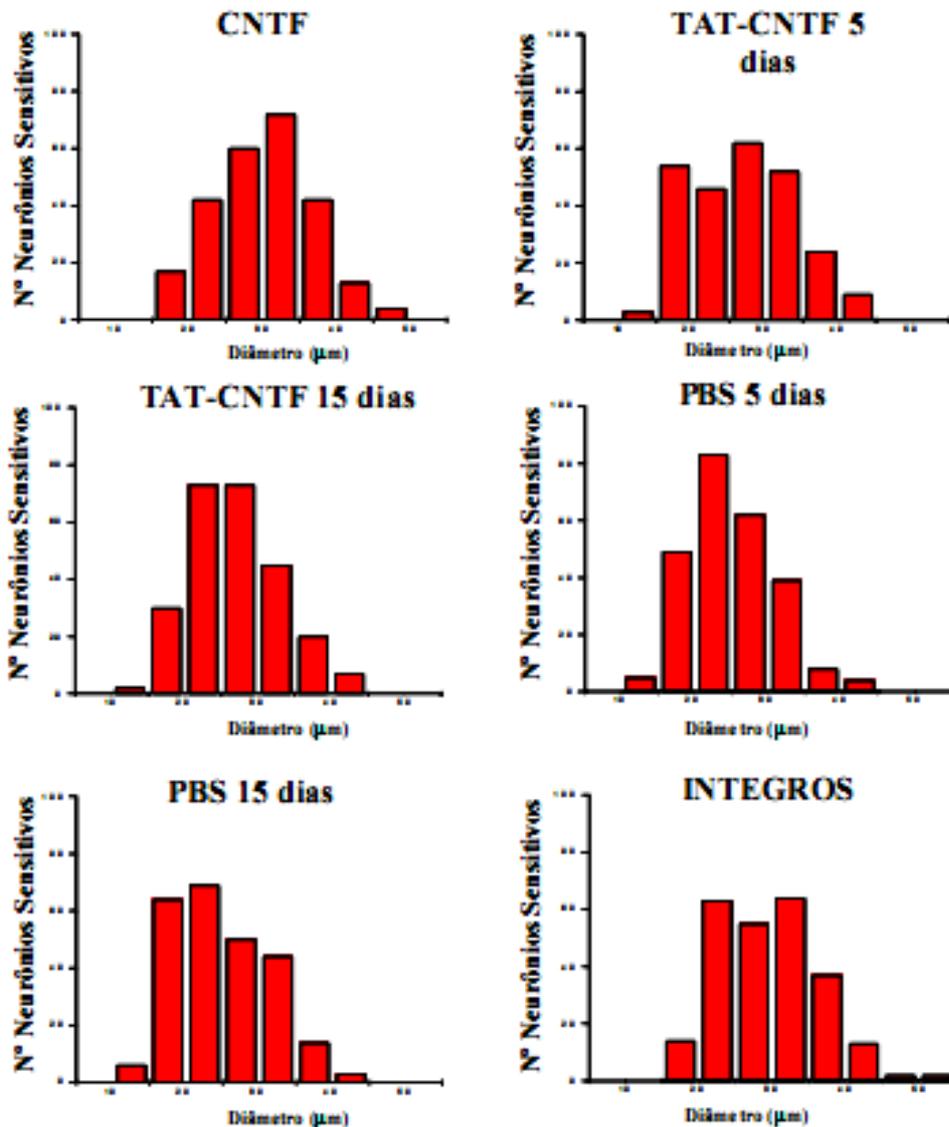
Figura 32: Os gráficos mostram a distribuição dos valores do diâmetro dos corpos celulares dos neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal L4 marcados com BDA, 37 dias após a lesão dos animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias), PBS (5 e 15 dias) e integros. A análise morfométrica mostrou que o diâmetro dos neurônios sensitivos do gânglio L4 marcados e sobreviventes à lesão dos grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF são iguais ao observado nos animais integros e maiores que os motoneurônios dos animais tratados com PBS.

## Gânglio L4 – 67 dias



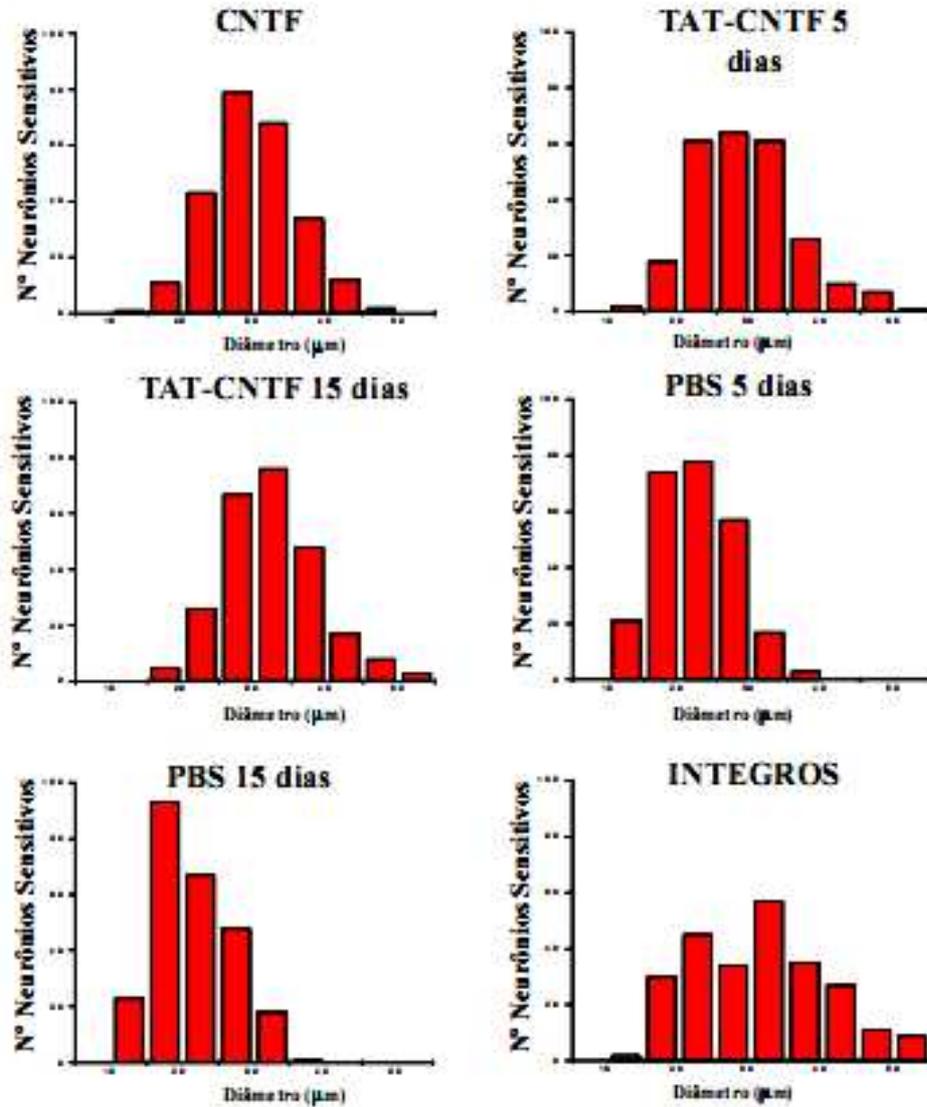
**Figura 33:** Os gráficos mostram a distribuição dos valores do diâmetro dos corpos celulares dos neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal L4 marcados com BDA, 67 dias após a lesão dos animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias), PBS (5 e 15 dias) e íntegros. A análise morfométrica mostrou que o diâmetro dos neurônios sensitivos do gânglio L4 marcados e sobreviventes à lesão dos grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF são iguais ao observado nos animais íntegros e maiores que os motoneurônios dos animais tratados com PBS.

## Gânglio L5 – 37 dias



**Figura 34:** Os gráficos mostram a distribuição dos valores do diâmetro dos corpos celulares dos neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal L5 marcados com BDA, 37 dias após a lesão dos animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias), PBS (5 e 15 dias) e integros. A análise morfométrica mostrou que o diâmetro dos neurônios sensitivos do gânglio L4 marcados e sobreviventes à lesão dos grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF são iguais ao observado nos animais íntegros e maiores que os motoneurônios dos animais tratados com PBS.

## Gânglio L5 –67 dias



**Figura 35:** Os gráficos mostram a distribuição dos valores do diâmetro dos corpos celulares dos neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal L5 marcados com BDA, 67 dias após a lesão dos animais tratados com CNTF (5 dias), TAT-CNTF (5 e 15 dias), PBS (5 e 15 dias) e integros. A análise morfométrica mostrou que o diâmetro dos neurônios sensitivos do gânglio L4 marcados e sobreviventes à lesão dos grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF são iguais ao observado nos animais integros e maiores que os motoneurônios dos animais tratados com PBS.

## 4.11. Regeneração de axônios mielínicos

### 4.11.1 Número total dos axônios mielínicos regenerados

A quantificação dos axônios mielínicos regenerados nos nervos tibial, fibular e sural 30 e 60 dias após o esmagamento do nervo isquiático mostrou que os grupos tratados com TAT-CNTF e CNTF durante 5 dias, ou TAT-CNTF durante 15 dias, possuíam um maior número de axônios quando comparados aos dos grupos que receberam tratamento com PBS (Tabela 10). Por outro lado, o número total de axônios mielínicos dos nervos tibial, fibular e sural computados nos animais íntegros foi superior ao dos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF. Contudo, vale destacar que após 60 dias da lesão o percentual de axônios mielínicos regenerados nestes animais encontrava-se na faixa de 71% a 86% relativamente ao dos animais íntegros, contrastando com o observado nos animais controle, para os quais esse percentual correspondeu ao mínimo de 51% a ao máximo de 55%.

**TABELA 10 – Contagem do número de axônios mielínicos regenerados nos nervos tibial, fibular e sural**

Tratamento	Tempo de tratamento (dias)	Tempo após a lesão (dias)	Número de Axônios			Percentual Relativo aos Animais Íntegros		
			Tibial	Fibular	Sural	Tibial	Fibular	Sural
CNTF	5	30	4187±272 A	1826±102 A	753±39 A	75	87	78
CNTF	5	60	4419±249 A	1924±90 A	794±42 A	86	80	72
TAT-CNTF	5	30	3713±156 A	1770±136 A	704±17 A	67	84	73
TAT-CNTF	5	60	4294±218 A	1788±86 A	774±42 A	84	74	71
TAT-CNTF	15	30	3770±106 A	1840±77 A	758±41 A	68	88	80
TAT-CNTF	15	60	4287±224 A	1811±63 A	781±36 A	84	75	71
PBS	5	30	2316±109 B	1137±42 B	504±10 B	42	54	52
PBS	5	60	2662±105 B	1274±67 B	603±37 B	52	53	55
PBS	15	30	2414±107 B	1163±34 B	507±23 B	44	55	52
PBS	15	60	2602±138 B	1218±52 B	575±35 B	51	51	52
ÍNTEGROS (32d)			5549±183 C	2097±156 C	967±77 C			
ÍNTEGROS (62d)			5132±196 C	2409±85 C	1097±55 C			

As letras maiúsculas anotadas ao lado da média correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas com os diferentes tratamentos e tempos de tratamento e de sobrevida.

#### **4.11.2. Parâmetros morfométricos dos axônios mielínicos regenerados (Tabela 11)**

A análise morfométrica revelou que 30 e 60 dias após a lesão a média do diâmetro dos axônios mielínicos (DA) regenerados nos nervos tibial, fibular e sural dos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF foi superior ao dos animais que receberam PBS ( $p < 0,01$ ). Essa análise também mostrou que duração do tratamento com TAT-CNTF durante 5 ou 15 dias teve efeito similar sobre os valores dos DA.

Entretanto, algumas diferenças puderam ser observadas no DA entre os diferentes nervos segundo os diferentes tratamentos. Neste sentido, vale destacar que 60 dias após a lesão o nervo tibial dos animais que receberam CNTF exibiu DA superior aos tratados com TAT-CNTF durante 5 ou 15 dias ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, 30 dias após a lesão os axônios do nervo fibular dos animais que receberam TAT-CNTF por 5 ou 15 dias apresentavam DA superior ao registrado nos animais tratados com CNTF ( $p < 0,05$ ).

Notadamente, nos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF houve aumento de DA entre o 30º e o 60º dia após a lesão em todos os nervos analisados. Nos animais controle (PBS) este aumento não foi observado no nervo fibular. Por sua vez, os animais íntegros também exibiram aumento do valor do DA com a idade, que se mostrou superior ao verificado nos animais dos demais grupos correspondentes ( $p < 0,001$ ). Contudo, a distribuição dos diâmetros dos axônios nos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF se aproximou à dos animais íntegros.

Os dados obtidos na avaliação do diâmetro da fibra mielínica seguiram basicamente o padrão observado para o diâmetro dos axônios. Porém, destaca-se o fato de não terem sido observadas diferenças na média do diâmetro das fibras mielínicas (DF), como foi

verificado para o DA entre os animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF, acima relatadas.

Por sua vez, a média da espessura da bainha de mielina (EBM) se mostrou maior nos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF quando comparada à dos animais controle 30 e 60 dias após a lesão ( $p < 0,001$ ) em todos os nervos analisados. Embora, após 30 dias da lesão, os animais tratados com CNTF apresentavam EBM superior à dos animais que receberam TAT-CNTF nos nervos tibial e sural. O valor da EBM aumentou em todos os grupos tratados com CNTF ou TAT-CNTF entre o 30° e 60° dias após esmagamento do nervo isquiático. Este aumento da EBM também foi observado nos animais íntegros com a idade, e se manteve superior às dos demais grupos. Neste contexto, é importante destacar que nos animais controle, que receberam PBS durante 5 ou 15 dias, não foi observado aumento da EBM com o tempo.

A Razão “g” (RZG) verificada após 30 e 60 dias nos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF foi inferior à dos animais que receberam PBS ( $p < 0,01$ ). Além disso, os valores da RZG nos animais que receberam as moléculas neurotróficas durante os 5 ou 15 primeiros dias após a lesão se aproximaram dos valores observados nos animais íntegros. Em particular, no nervo sural dos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF o valor da RZG não diferiu da registrada nos animais íntegros após 30 e 60 dias após o esmagamento do nervo isquiático. Também se deve notar que a RZG praticamente não se alterou com o tempo, embora se tenha observado redução da mesma entre o 30° e 60° dia após a lesão no nervo fibular dos animais tratados com TAT-CNTF durante 15 dias.

**TABELA 11 – Diâmetro axonal (DA), diâmetro da fibra (DF), espessura da bainha de mielina (EBM) e Razão “g” (RZG)**

Tratamento	Tempo de tratamento (dias)	Tempo após a lesão (dias)	Tibial			
			DA	DF	EBM	RZG
CNTF	5	30	3,39±0,05 A	5,21±0,20 A	0,91±0,03 A	0,64±0,01 A
CNTF	5	60	4,22±0,06* <sup>a</sup>	6,12±0,24* <sup>a</sup>	0,95±0,04 <sup>a</sup>	0,67±0,01 <sup>a</sup>
TAT-CNTF	5	30	3,29±0,05 A	4,78±0,20 A	0,74±0,04 B	0,68±0,01 A
TAT-CNTF	5	60	3,77±0,06* <sup>β</sup>	5,58±0,15* <sup>a</sup>	0,91±0,02* <sup>a</sup>	0,67±0,004 <sup>a</sup>
TAT-CNTF	15	30	3,31±0,05 A	4,85±0,30 A	0,77±0,02 B	0,68±0,01 A
TAT-CNTF	15	60	3,81±0,05* <sup>β</sup>	5,74±0,18* <sup>a</sup>	0,96±0,03* <sup>a</sup>	0,66±0,005 <sup>a</sup>
PBS	5	30	2,57±0,04 B	3,51±0,14 C	0,47±0,03 C	0,73±0,01 B
PBS	5	60	2,85±0,05* <sup>γ</sup>	4,01±0,20* <sup>β</sup>	0,58±0,02 <sup>β</sup>	0,71±0,01 <sup>β</sup>
PBS	15	30	2,55±0,03 B	3,54±0,07 C	0,49±0,03 C	0,72±0,01 B
PBS	15	60	2,89±0,05* <sup>γ</sup>	3,98±0,15* <sup>β</sup>	0,55±0,04 <sup>β</sup>	0,73±0,03 <sup>β</sup>
ÍNTEGROS (32d)			4,05±0,04 C	6,43±0,22 D	1,19±0,05 D	0,63±0,004 C
ÍNTEGROS (62d)			4,76±0,06* <sup>δ</sup>	7,47±0,22* <sup>γ</sup>	1,35±0,03* <sup>γ</sup>	0,63±0,01 <sup>γ</sup>

Tratamento	Tempo de tratamento (dias)	Tempo após a lesão (dias)	Fibular			
			DA	DF	EBM	RZG
CNTF	5	30	3,22±0,04 A	4,65±0,11 A	0,71±0,02 A	0,69±0,01 A
CNTF	5	60	4,04±0,07* <sup>a</sup>	5,93±0,20* <sup>a</sup>	0,93±0,01* <sup>a</sup>	0,68±0,01 <sup>a</sup>
TAT-CNTF	5	30	3,51±0,04 B	4,81±0,12 A	0,65±0,01 A	0,72±0,01 A
TAT-CNTF	5	60	4,36±0,07* <sup>a</sup>	6,07±0,14* <sup>a</sup>	0,86±0,03* <sup>β</sup>	0,70±0,005 <sup>a</sup>
TAT-CNTF	15	30	3,55±0,05 B	4,95±0,10 A	0,70±0,01 A	0,71±0,01 A
TAT-CNTF	15	60	4,00±0,05* <sup>a</sup>	5,98±0,15* <sup>a</sup>	0,99±0,04* <sup>β</sup>	0,66±0,01* <sup>a</sup>
PBS	5	30	2,81±0,04 C	3,71±0,05 B	0,45±0,01 B	0,75±0,002 B
PBS	5	60	3,02±0,06 <sup>γ</sup>	3,98±0,12 <sup>β</sup>	0,48±0,01 <sup>γ</sup>	0,75±0,01 <sup>β</sup>
PBS	15	30	2,75±0,04 C	3,67±0,07 B	0,46±0,01 B	0,74±0,001 B
PBS	15	60	2,91±0,05 <sup>γ</sup>	3,91±0,14 <sup>β</sup>	0,50±0,02 <sup>γ</sup>	0,74±0,01 <sup>β</sup>
ÍNTEGROS (32d)			4,11±0,05 D	6,48±0,17 C	1,18±0,03 C	0,63±0,01 C
ÍNTEGROS (62d)			5,92±0,08* <sup>δ</sup>	8,81±0,29* <sup>γ</sup>	1,45±0,01* <sup>δ</sup>	0,67±0,01* <sup>γ</sup>

Tratamento	Tempo de tratamento (dias)	Tempo após a lesão (dias)	Sural			
			DA	DF	EBM	RZG
CNTF	5	30	3,18±0,07 A	4,77±0,10 A	0,80±0,03 A	0,66±0,02 A
CNTF	5	60	4,41±0,08* <sup>a</sup>	6,28±0,16* <sup>a</sup>	0,94±0,03* <sup>a</sup>	0,70±0,01 <sup>a</sup>
TAT-CNTF	5	30	3,16±0,07 A	4,55±0,10 A	0,69±0,03 B	0,69±0,01 A
TAT-CNTF	5	60	4,26±0,07* <sup>a</sup>	6,13±0,11* <sup>a</sup>	0,93±0,03* <sup>a</sup>	0,69±0,01 <sup>a</sup>
TAT-CNTF	15	30	3,35±0,06 A	4,77±0,08 A	0,71±0,04 B	0,69±0,01 A
TAT-CNTF	15	60	4,28±0,09* <sup>a</sup>	6,09±0,13* <sup>a</sup>	0,92±0,01* <sup>a</sup>	0,70±0,01 <sup>a</sup>
PBS	5	30	2,59±0,07 B	3,53±0,16 B	0,47±0,03 C	0,73±0,01 B
PBS	5	60	3,18±0,07* <sup>β</sup>	4,22±0,09* <sup>β</sup>	0,52±0,01 <sup>β</sup>	0,75±0,004 <sup>β</sup>
PBS	15	30	2,52±0,06 B	3,39±0,12 B	0,44±0,03 C	0,74±0,01 B
PBS	15	60	3,29±0,08* <sup>β</sup>	4,24±0,09* <sup>β</sup>	0,47±0,02 <sup>β</sup>	0,77±0,01 <sup>β</sup>
ÍNTEGROS (32d)			4,21±0,06 C	6,48±0,09 C	1,13±0,02 D	0,65±0,01 A
ÍNTEGROS (62d)			5,49±0,10* <sup>γ</sup>	8,24±0,30* <sup>γ</sup>	1,38±0,03* <sup>γ</sup>	0,66±0,01 <sup>a</sup>

As letras maiúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas com os diferentes tratamentos 30 dias após a lesão. As letras gregas correspondem ao significado da comparação entre as médias registradas com os diferentes tratamentos 60 dias após a lesão. Os asteriscos indicam a existência de diferença entre as médias registradas 30 e 60 dias após a lesão.

## 5. DISCUSSÃO

O emprego do CNTF como potente agente neuroprotetor no tratamento de doenças neurodegenerativas exige a investigação de vias alternativas para sua administração em virtude dos efeitos colaterais (SENDTNER E COLS., 1990; SENDTNER E COLS., 1992A,B; KUZIS E ECKENSTEIN, 1996; TAN E COLS., 1995; AEBISCHER E COLS., 1996; PENN E COLS., 1997; HAASE E COLS., 1999; BACHOUD-LEVI E COLS., 2000). Uma via alternativa promissora parece ser a administração do CNTF conjugado com peptídeos que possuem um domínio de transdução ou translocação de proteínas (PTD-*protein transduction domain*). As proteínas que possuem esse domínio são capazes de cruzar a membrana celular através de mecanismos independentes de receptores específicos (SCHWARZE E COLS., 1999, 2000; BECKER-HAPAK E COLS., 2001; DIETZ E BÄHR, 2004). Embora os mecanismos de internalização das proteínas associadas com o PTD da TAT do HIV não estejam ainda completamente elucidados, o grande número de investigações realizadas nos últimos anos forneceu evidências para a proposição de três modelos básicos: i) penetração direta através da porção lipídica da membrana, ii) penetração através da formação de micelas invertidas na membrana e iii) penetração por endocitose. Os três modelos propostos levam em conta a interação eletrostática não específica do PTD com a porção lipídica da membrana, já que os aminoácidos arginina (R) e lisina (K) da seqüência PTD da TAT (YGRKKRRQRRR) lhe conferem natureza eletropositiva, que a capacita interagir com a porção eletronegativa dos lipídios da membrana. Outro fator que parece ser determinante para internalização de proteínas associadas a TAT-PTD é a interação desta com as glicosaminoglicanas sulfatadas heparan sulfato e heparina (para revisão vide DIETZ E BÄHR, 2004).

### **5.1. Ações do tratamento com CNTF e TAT-CNTF em animais íntegros**

Em estudo prévio mostramos que o tratamento de ratos neonatos por 5 dias (P2-P5) com CNTF conjugado a um peptídeo contendo domínio de translocação de proteína (TAT-CNTF) promoveu neuroproteção aos motoneurônios após transecção do nervo isquiático (P2). Além disso, esse efeito não produziu intensa mobilização de gordura e baixo crescimento corporal observado nos animais tratados com CNTF (LANGONE E COLS., 2004; REZENDE, 2005; REZENDE E COLS., 2009). A ausência destes efeitos colaterais é particularmente importante. De fato, o CNTF é capaz de reduzir o peso corporal em ratos e camundongos adultos por inibir o apetite e aumentar a taxa metabólica (GLOAGUEN E COLS., 1997; LAMBERT E COLS., 2001; KOKOEVA E FLIER, 2005; AHIMA, 2006). Assim, considerando que não existem dados do efeito do CNTF e TAT-CNTF sobre o perfil de substratos energéticos em ratos recém nascidos, iniciamos nossa investigação dentro do presente trabalho analisando os valores das concentrações de glicose, triglicérides, ácidos graxos e colesterol plasmático em animais neonatos íntegros. Esses animais foram tratados com doses CNTF e TAT-CNTF iguais às utilizadas nos protocolos definidos para os estudos da ação neuroprotetora (1,2µg/g/dia).

Em virtude do intenso efeito do CNTF reduzindo o ganho de peso dos animais neonatos, estes foram tratados apenas durante 5 dias (P2 a P7). Os demais foram tratados com TAT-CNTF, durante 5 ou 15 dias, ou PBS também por 5 ou 15 dias (P2 a P17).

A avaliação da evolução ponderal, além de confirmar nossas prévias observações sobre o efeito do CNTF administrado durante 5 dias e os dados da literatura (HENDERSON E COLS., 1994A; KWONE E GURNEY, 1994; VEJSADA E COLS., 1995; ZHANG E COLS., 1995; ULENKATE E COLS. 1996), mostrou que a interrupção

do tratamento na idade P7 permitiu a recuperação do ganho de peso. Contudo, estes continuaram inferiores ( $p < 0,01$ ) aos dos demais grupos até a idade P17. Por sua vez, o tratamento com TAT-CNTF não modificou a curva de crescimento até o 5º dia de tratamento (P7), quando comparada à dos animais controle (PBS e Sem Tratamento - ST). Porém, a continuidade do tratamento até P17 produziu uma ligeira queda no ganho de peso que, embora significativa ( $p < 0,05$ ), foi totalmente recuperada em P16.

Estes resultados mostram que o tratamento com TAT-CNTF por um período três vezes superior ao tratamento com CNTF não produziu os acentuados efeitos deste último sobre a evolução ponderal. Além disso, tais efeitos foram transitórios, conforme evidenciado pela recuperação do peso corporal mesmo após 15 dias de tratamento. Por outro lado, o efeito inibidor do CNTF sobre o ganho de peso persistiu mesmo com a interrupção do tratamento. Este resultado confirma o obtido por outros autores em animais adultos, nos quais os efeitos do tratamento com CNTF persistem por vários dias depois do fim do tratamento (LAMBERT E COLS., 2001; ETTINGER E COLS., 2003; BLÜHER E COLS., 2004; KOKOEVA E COLS., 2005). Interessantemente, Kokoeva e cols. (2005) associaram a ação prolongada do CNTF à geração de novos neurônios no hipotálamo de camundongos adultos. Por sua vez, a ausência do efeito da TAT-CNTF em nossos experimentos poderia ser explicada pela propriedade de internalização da TAT-CNTF nas células, que produziu uma rápida redução de sua disponibilidade para atuar como o CNTF no organismo dos animais.

É necessário considerar também que o CNTF pode induzir perda de peso através de uma ação no sistema nervoso central, reduzindo a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e da proteína relacionada ao agouti (AGRP) em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo

envolvidos no controle alimentar (XU E COLS., 1998; DUFF E BAILE, 2003). Evidências dessa possibilidade foram obtidas por Duff e cols. (2004) os quais mostraram que a injeção intracerebroventricular (*ivc*) de CNTF em ratos adultos foi capaz de induzir a morte de adipócitos no tecido adiposo epididimal, inguinal e retroperitoneal. Esse efeito foi significativamente mais potente que o produzido pela administração de leptina pela mesma via. Recentemente, verificamos em nosso laboratório que tanto a injeção *icv* de CNTF como de TAT-CNTF provoca perda de peso em ratos adultos, embora esse efeito seja significativamente inferior nos animais que receberam TAT-CNTF (VIEIRA, 2007). Desta forma, não podemos descartar que no presente trabalho os efeitos observados com o tratamento subcutâneo de ratos neonatos se devam também à ação central do CNTF ou TAT-CNTF. Embora, dentro deste contexto, quanto à diferente intensidade dos efeitos TAT-CNTF, podemos supor que ela seja decorrente de sua menor disponibilidade, causada pelos fatores já apontados, ou de uma menor afinidade pelo receptor CNTFR $\alpha$ , minimizando sua ação nas regiões centrais de controle alimentar.

A análise do perfil de substratos energéticos nos ratos neonatos revelou que o tratamento com CNTF dos animais com sobrevida de 5 dias (P7) reduziu os níveis de glicose e triglicérides quando comparados com os grupos controle. Por outro lado, não alterou significativamente os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres, embora tenhamos evidenciado uma tendência de aumento em relação aos grupos controle (PBS e ST). Os níveis de colesterol também não foram alterados. A interrupção do tratamento após 5 dias e a avaliação desses parâmetros na idade P17 mostrou que os níveis de ácidos graxos livres e triglicérides assumiram valores semelhantes aos dos grupos controle (PBS e ST). Por outro

lado, os níveis plasmáticos de colesterol foram ligeiramente maiores que nos animais controle na idade P17, e os níveis de glicose no sangue foram menores.

O efeito do CNTF sobre o metabolismo de animais adultos tem sido intensamente investigado devido a sua possível aplicação no tratamento da obesidade (GLOAGUEN E COLS., 1997; XU E COLS., 1998; LAMBERT E COLS., 2001; DUFF E BAILE, 2003; BLÜHER E COLS., 2004; FLIER, 2004; GRAEWIN E COLS., 2006). Contudo, conforme apontamos acima, não existem dados sobre o efeito da administração de CNTF no metabolismo energético de ratos neonatos.

A dieta de animais neonatos é constituída pela ingestão de leite, o qual é rico em gordura e pobre em carboidratos, de modo que a gordura corresponde a mais de 50% da ingesta energética e os carboidratos a menos de 10%. Por outro lado, após o desmame ocorre uma inversão da dieta, sendo agora rica em carboidratos e pobre em gorduras, proporcionada pela ração comercial padrão. Desta forma, após o desmame apenas 15% da ingesta energética corresponde a lipídeos e 60% a carboidratos (GIRARD E COLS., 1992; NEHLIG E PEREIRA DE VASCONCELOS, 1993).

Estudos com animais adultos mostram que o tratamento com CNTF, fornecido através do transplante de células geneticamente modificadas ou administrado durante 3 a 7 dias (s.c ou i.p.; 0,1-1,0 µg/g) diminui os níveis de glicose e triglicérides em animais obesos e em camundongos normais (HENDERSON E COLS., 1996; GLOAGUEN E COLS., 1997; LAMBERT E COLS., 2001; BLÜHER E COLS., 2004; GRAEWIN E COLS., 2006). Nossos resultados após 5 dias de tratamento mostraram que o CNTF produziu efeitos semelhantes sobre a glicemia e a concentração de triglicérides plasmáticos na idade P7. Por outro lado, tal redução não correspondeu a um aumento significativo de ácidos

graxos livres como verificado em animais adultos (SLEEMAN E COLS., 2003). Esta aparente discrepância poderia ser explicada pelo intenso aumento da taxa metabólica produzida pelo CNTF (GLOAGUEN E COLS., 1997; LAMBERT E COLS., 2001). Ou seja, em paralelo à intensa mobilização de triglicérides, o CNTF provocaria também a rápida produção e utilização dos ácidos graxos livres para a geração de corpos cetônicos no fígado, principal fonte energética utilizada pelos tecidos extra-hepáticos, especialmente cérebro e músculo, durante período neonatal (MAYOR E CUEZVA, 1985; GIRARD E COLS., 1992; NEHLIG E PEREIRA DE VASCONCELOS, 1993). Corroborando esta hipótese, Henderson e cols. (1994, 1996) mostraram que a presença de CNTF (10 ng/ml) no plasma sanguíneo de camundongos que receberam células C6 modificadas para produzir e secretar CNTF induz eventos catabólicos que levam à caquexia, associada à queda da glicemia e de triglicérides plasmáticos.

Além disso, a interrupção do tratamento com CNTF na idade P7 levou as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres e triglicérides a valores semelhantes aos dos animais controle (PBS e ST) na idade P17, reforçando as evidências sobre a ação do CNTF no metabolismo lipídico. Por outro lado, nesta idade os níveis plasmáticos de colesterol foram ligeiramente maiores que nos animais controle e os níveis glicêmicos foram menores. Estes resultados, associados à não recuperação total do peso corporal são concordes com a literatura sobre a duração dos efeitos do CNTF no metabolismo energético (LAMBERT E COLS., 2001; ETTINGER E COLS., 2003; BLÜHER E COLS., 2004; KOKOEVA E COLS., 2005).

Por sua vez, o tratamento com TAT-CNTF, embora não tenha produzido efeitos relevantes sobre o ganho de peso corporal após 5 ou 15 dias, promoveu alterações no nível plasmático dos ácidos graxos livres, glicose e colesterol na idade P7.

A redução nas concentrações da glicose produzida pela TAT-CNTF após 5 dias de tratamento (P7) - similarmente ao observado no tratamento com CNTF durante igual período - evidencia que a mesma alterou o metabolismo energético nos animais. Porém, ao contrário do notado nos animais tratados com CNTF, tal redução foi acompanhada pela diminuição da concentração plasmática de ácidos graxos livres quando comparada à dos animais controle. Este quadro sugere que o metabolismo dos ratos tratados com TAT-CNTF deve ter sido direcionado preferencialmente para vias anabólicas. Hipótese que é corroborada pela curva de ganho de peso corporal e pelas características da gordura marrom interescapular (GMI) desses animais discutida abaixo. Em particular, a morfologia da GMI é um forte indício do armazenamento de ácidos graxos na forma de triglicérides nos adipócitos, que levaria à redução dos seus níveis plasmáticos durante o período de tratamento.

O transporte de lipídeos no organismo é realizado pelo plasma sanguíneo na forma de lipoproteínas plasmáticas, que são agregados moleculares de proteínas transportadoras específicas, chamadas apolipoproteínas, com combinações variadas de fosfolipídios, colesterol, ésteres do colesterol e triglicérides. As apolipoproteínas combinam com os lipídeos para formar várias classes de lipoproteínas. Diferentes combinações de lipídeos e proteínas produzem partículas com densidades diferentes, variando de lipoproteínas com densidade muito baixa (VLDL – *very low-density lipoprotein*) até lipoproteínas com densidade muito alta (VHDL – *very high-density lipoprotein*). Este transporte é essencial

para efetiva entrega dos lipídeos para armazenamento ou consumo nos tecidos (LEHNINGER E COLS., 1995; WILSON E COLS., 1998). Especificamente, para que os triglicérides plasmáticos possam ser utilizados pelas células adiposas, musculares e hepáticas, estes devem ser transformados em ácidos graxos. Nas superfícies endoteliais dos capilares do tecido adiposo, músculo e fígado os triglicérides são hidrolisados por lipases (lipase lipoprotéica; lípase hepática), produzida por esses tecidos, gerando ácidos graxos livres. Para que as lipases possam atuar sobre os triglicérides, primeiramente ela deve se ligar às células endoteliais através da glicosaminoglicanas heparan sulfato (HSPG). Esta ligação se faz através de seqüências de aminoácidos da lipase carregadas positivamente, formadas principalmente por arginina e lisina (WILSON E COLS., 1998).

É interessante lembrar que o domínio PTD da TAT apresenta seqüência semelhante de aminoácidos e que sua interação com as HSPG tem sido considerada um dos fatores determinantes para a internalização celular das proteínas fusionadas com a TAT (Dietz e Bähr, 2004). Em nossos experimentos observamos que não houve alteração dos níveis de triglicérides e redução dos níveis de ácidos graxos livres nos animais tratados com TAT-CNTF durante 5 dias quando comparados com os animais controle. Por sua vez, nos animais tratados durante 15 dias houve importante aumento dos níveis de triglicérides plasmáticos sem alteração significativa dos ácidos graxos. Desta forma, é plausível supor que o tratamento diário tenha disponibilizado quantidades suficientes de TAT-CNTF na circulação capazes de competir com as lipases pela ligação com as HSPG das células endoteliais, neutralizando e/ou modificando sua ação hidrolítica sobre os triglicérides. Paralelamente, devemos considerar também a hipótese de que o tratamento por 15 dias com TAT-CNTF tenha promovido mobilização de ácidos graxos das células adiposas,

contribuindo assim para a elevação dos seus níveis plasmáticos a valores semelhantes aos dos animais controle.

O colesterol também é distribuído pelo organismo através das lipoproteínas plasmáticas e sua internalização celular depende da interação desta com receptor específicos para LDL (*low-density lipoprotein*) na superfície das células. Esse receptor é expresso pelas células dependendo dos níveis intracelulares de esteróis. Desta forma, se os níveis de esteróis diminuem, a expressão dos receptores para LDL na superfície celular aumenta, aumentando assim a internalização do colesterol. O domínio de ligação do receptor LDL com a lipoproteína é uma interação iônica entre aminoácidos das apolipoproteínas específicas apo-B100 e apo-E carregados positivamente (arginina e lisina) com os aminoácidos do receptor LDL carregados negativamente (ácido aspártico e ácido glutâmico) (WILSON E COLS., 1998). A grande presença dos aminoácidos arginina e lisina na seqüência PTD da TAT, conferindo-lhe natureza eletro-positiva, talvez possa também explicar o aumento de colesterol plasmático dos animais tratados com TAT-CNTF durante 5 ou 15 dias. A possível interação entre a TAT-CNTF e os receptores para LDL pode ter interferido nos mecanismos de internalização do colesterol e/ou na própria expressão desse receptor.

Estas nossas hipóteses de interação da TAT-CNTF com HSPG e com receptores de LDL deverão ser futuramente testadas através de experimentos bioquímicos atualmente em planejamento.

## **5.2 Ação do CNTF e TAT-CNTF sobre o peso corporal de animais lesados**

Os animais lesados e tratados com CNTF durante 5 dias (P7) exibiram redução do ganho de peso a partir do 3º dia de tratamento e este efeito se manteve até a idade P25. Por outro lado, os animais tratados durante 5 ou 15 dias com TAT-CNTF o ganho de peso desses animais foi semelhante ao dos animais controle (PBS e íntegros) até a idade P7. Após este período seu ganho de peso passou a ser inferior ao destes grupos, porém superior ao dos animais tratados com CNTF ( $p < 0,001$ ). Este padrão se manteve até a idade P25. Após esta data os animais de todos os grupos passaram a apresentar ganho de peso similar.

É interessante notar que o padrão de ganho de peso dos animais tratados por 15 dias com TAT-CNTF foi semelhante ao dos animais tratados com TAT-CNTF por apenas 5 dias. Este dado sugere que o tratamento com TAT-CNTF mais prolongado foi relativamente bem tolerado pelos animais. Além disso, entre a idade P7 e P17 o ganho de peso dos animais tratados com TAT-CNTF foi expressivamente superior ao dos animais tratados com CNTF, cujo tratamento foi interrompido em P7 ( $p < 0,001$ ).

Por outro lado, conforme considerado acima, é importante notar que, quando comparados com os animais controle, os animais tratados com TAT-CNTF por 5 dias (P2-P7) apresentaram redução do ganho de peso a partir da interrupção do tratamento até a idade P25 ( $p < 0,05$ ). Este resultado indica que a TAT-CNTF parece conservar a propriedade do CNTF de atuar sobre o metabolismo do animal. Contudo, a intensidade dos seus efeitos e retardo da expressão destes mostram que tal capacidade está diminuída.

Dentro deste contexto é interessante considerar que a partir aproximadamente a idade P21 a dieta dos animais mudou substancialmente. O fato de deixarem de mamar e passarem alimentar-se da ração comercial pode ter exercido alguma influência sobre a recuperação do padrão de ganho de peso nos animais tratados por 5 dias com CNTF, ou por 5 e 15 dias com TAT-CNTF.

O prolongamento do tempo de sobrevivência dos animais após a interrupção dos tratamentos acrescentou dados importantes às nossas primeiras investigações sobre os efeitos do CNTF e TAT-CNTF (LANGONE E COLS., 2004; REZENDE, 2005, REZENDE E COLS., 2009). Naqueles experimentos os animais foram sacrificados após o último dia de tratamento (P7), o que não permitia avaliar os efeitos tardios de ambas moléculas sobre o ganho de peso corporal. Além disso, os dados agora obtidos mostram que, na vigência dos tempos de tratamento empregados, os efeitos são reversíveis e não há diferenças entre os grupos ao final de 37 ou 67 dias de sobrevivência.

Quanto ao(s) mecanismo(s) que produz(em) os efeitos do CNTF e TAT-CNTF relatados acima, foi verificado em nosso laboratório que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de CNTF ou TAT-CNTF em ratos adultos durante 4 dias promoveu a redução de peso nestes animais (VIEIRA, 2007). Contudo, esse efeito produzido pela TAT-CNTF também expressivamente inferior ao produzido pelo CNTF. O estudo de sinalização intracelular mostrou que há ativação da via JAK/STAT no hipotálamo, com a fosforilação da STAT-3 semelhante à induzida pela Leptina (HAAS E COLS. 1999; DOLCET E COLS., 2001; LAMBERT E COLS., 2001; OTT E COLS., 2002; JIAO E COLS., 2003; ZVONIC E COLS., 2003). Contudo, recentemente realizamos estudos de sinalização intracelular no hipotálamo de animais neonatos que foram lesados, tratados subcutaneamente com CNTF ou TAT-CNTF e sacrificados com dois dias de vida. Nossos dados mostraram que o tratamento com CNTF foi capaz de promover a fosforilação da STAT-3 na região hipotalâmica. Contudo, não foi verificado esse efeito após o tratamento com TAT-CNTF (REZENDE E COLS. 2009). As modificações estruturais e funcionais induzidas pela fusão da proteína TAT ao CNTF não são conhecidas. Desta forma, é plausível supor que após o tratamento, a TAT-CNTF pode ter seguido por outras

rotas diferentes das normalmente utilizadas pelo CNTF para chegar até o sistema nervoso central (PAN E COLS., 1999). Além disso, considerando as propriedades da TAT-CNTF nossos dados permitem supor que a rápida internalização da mesma pelas células do animal tenha levado sua concentração extracelular para valores nos quais sua ação sobre os centros hipotalâmicos é minimizada ou nula. Por outro lado, não podemos descartar a possibilidade de atuação do CNTF e da TAT-CNTF diretamente sobre o tecido adiposo.

Finalmente, nos experimentos com animais íntegros tivemos que utilizar ninhadas formadas por 8-12 animais, em virtude dos protocolos bioquímicos empregados, enquanto que nos experimentos com animais lesados as ninhadas foram de 5-6 animais. É provável que os animais de ninhadas menores tenham tido mais acesso à alimentação. Isto poderia explicar o maior crescimento corporal dos animais que tiveram o nervo isquiático esquerdo esmagado em P2 e tratados com CNTF, TAT-CNTF ou PBS durante 5 e 15 dias, quando comparado ao dos animais íntegros submetidos aos mesmos tratamentos, respectivamente.

### **5.3 Efeito do tratamento com CNTF e TAT-CNTF sobre o tecido adiposo**

A análise da gordura marrom interescapular (GMI) corrobora nossas observações sobre os efeitos do CNTF e TAT-CNTF no crescimento corporal. O peso da GMI foi maior nos animais tratados com TAT-CNTF, por 5 ou 15 dias, quando comparados aos animais que receberam CNTF. Adicionalmente, o quociente entre o peso da GMI e o peso corporal ( $GMI_i$ ) nas idades P7 e P17 foi superior nos animais tratados com TAT-CNTF comparado com os animais tratados com CNTF. Por outro lado, o  $GMI_i$  dos animais que receberam TAT-CNTF foi inferior aos animais controle na idade P7, porém não houve diferença significativa entre esses grupos na idade P17. A histologia da GMI revelou que os animais

tratados com CNTF possuíam adipócitos com poucas e pequenas gotas de gordura. Contrariamente, nos animais tratados com TAT-CNTF estas células exibiam abundantes gotas lipídicas, de tamanhos variados e semelhantes às observadas nos animais controle (PBS e Sem Tratamento), mesmo depois de 15 dias de tratamento. Desta forma, este conjunto de resultados sugere que a TAT-CNTF promova a mobilização de lipídios dos adipócitos. Contudo, é importante notar que tal mobilização foi expressivamente inferior à promovida pelo CNTF. Embora não estejam elucidados os mecanismos deste efeito do CNTF sobre a fisiologia dos adipócitos, têm evidências de que ele possa ser decorrente de sua ação direta sobre essas células (GLOAGUEN E COLS., 1997; LAMBERT E COLS., 2001; OTT E COLS., 2002; ZVONIC E COLS., 2003, DUFF E COLS., 2004), ou indiretamente através da sua atuação em núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle alimentar (XU E COLS., 1998; DUFF E BAILE, 2003). A verificação do efeito atenuado da TAT-CNTF sugere que esta manteve sua capacidade de atuação sobre o tecido adiposo, provavelmente através dos mesmos mecanismos utilizados pelo CNTF.

O uso de análises morfométricas para avaliação do tecido adiposo tem sido aplicado para o estudo do número, volume e dimensões das células adiposas e vacúolos lipídicos no desenvolvimento e após tratamento com substâncias para o tratamento da diabetes e obesidade (S BARBATI E COLS., 1991; OKAMOTO E COLS., 2007). Recentemente, Okamoto e cols. (2007) desenvolveram um método de análise quantitativa de imagens automatizado (eCognition) que permite quantificar e medir as células adiposas, assim como os vacúolos lipídicos. O programa SigmaScan (V 5.0) que utilizamos nos permitiu fazer as quantificações e medições com precisão, contudo, tivemos que medir cada vacúolo individualmente pois o mesmo não conseguia discriminar cada vacúolo individualmente. O

programa desenvolvido por Okamoto e cols., (2007) resolve esse problema em separar cada vacúolo individualmente e automatiza a análise das células adiposas.

A ação do CNTF sobre a fisiologia dos adipócitos tem sido estudada por vários laboratórios que verificaram que essas células possuem o complexo-receptor específico para CNTF e que sua ativação pode modificar a expressão gênica e protéica nas mesmas (GLOAGUEN E COLS., 1997; LAMBERT E COLS., 2001; OTT E COLS., 2002; ZVONIC E COLS., 2003 e 2005). Nossos dados da ação do CNTF sobre a morfologia e morfometria dos tecidos adiposos marrom interescapular e branco retroperitoneal de ratos neonatos confirmam estes estudos. Realmente, o tratamento por 5 dias com CNTF atuou sobre as células adiposas e depletou expressivamente a gordura evidenciada pela análise morfométrica dos vacúolos lipídicos do tecido adiposo marrom e branco. Além disso, as dimensões teciduais diminuíram com o tratamento, fato esse evidenciado pela contagem de células adiposas. O número de núcleos de células adiposas por campo analisado foi maior nos animais tratados com CNTF em relação ao observado nos outros grupos. Outro fator que confirma esse dado é o maior número de vacúolos contados no grupo tratado com CNTF e de dimensões menores. De fato, o tratamento com uma forma modificada do CNTF (Axokina – CNTF<sub>AX15</sub>) provocou a redução da massa do tecido adiposo branco epididimal em camundongos quando comparado com o grupo que recebeu veículo de diluição (SLEEMAN E COLS., 2003). Nossos dados confirmam esse achado embora não tenhamos analisado a gordura branca epididimal, pois não encontramos a sua presença nos animais com 7 dias de vida.

Por outro lado, não foi observada nenhuma diferença nas áreas ocupadas pela gordura nos vacúolos do tecido marrom interescapular nos animais tratados com TAT-

CNTF comparativamente com os animais controle. Adicionalmente, o número de núcleos de células adiposas e vacúolos por campo analisado nos animais tratados com TAT-CNTF e controles foi estatisticamente igual. Contudo, a média da área ocupada pelos vacúolos lipídicos da GBR dos animais que receberam TAT-CNTF foi inferior ao apresentado pelos animais tratados com PBS e ST. Este dado pode indicar uma possível atuação da TAT-CNTF, embora bem inferior à apresentada pelo tratamento com CNTF, sobre o tecido adiposo branco.

É necessário considerar também que o CNTF pode induzir esses efeitos através de uma ação central, reduzindo a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo envolvidos no controle alimentar (XU E COLS., 1998). Evidências dessa possibilidade foram reportadas por Duff e cols. (2004). Estes autores mostraram que a injeção intracérebroventricular de CNTF em ratos adultos foi capaz de induzir a morte de adipócitos no tecido gorduroso do epidídimo e das regiões inguinais, retro-peritoniais e inter-escapular. Esse efeito foi significativamente mais potente que o produzido pela administração de leptina pela mesma via. Corroborando estes resultados recentemente também constatamos que a injeção de CNTF pelas mesmas vias provocou a morte de células adiposas do tecido adiposo branco retroperitonal (VIEIRA, 2007). Contudo, este dado não foi constatado nos animais que receberam TAT-CNTF. Também recentemente foi documentado pelo grupo de Kuo e cols. (2007) que o NPY é liberado pelos nervos simpáticos a partir de estressores, tais como frio e agressão, e estimula o crescimento da gordura no tecido adiposo branco e medeia o ganho de peso associado com o estresse e dieta hipercalórica. Dessa forma, é plausível supor que o tratamento com CNTF além de atuar centralmente no sistema nervoso, pode também estar atuando diretamente

sobre os adipócitos reduzindo a expressão do NPY e promovendo assim a redução do tecido adiposo e morte destas células. Da mesma forma, também podemos afirmar que o tratamento com TAT-CNTF pode estar atuando centralmente nos núcleos hipotalâmicos e diretamente no tecido adiposo branco, mas de forma expressivamente inferior à produzida pelo CNTF.

#### **5.4 Efeito do tratamento com CNTF e TAT-CNTF sobre o do tecido adiposo de animais neonatos íntegros com sobrevida de 17 dias**

Conforme discutido acima, descrevemos os efeitos do CNTF e TAT-CNTF sobre o tecido adiposo de ratos neonatos quando administrados em dose diárias durante 5 dias (P2-P7). As análises, morfológica e morfométrica, da gordura desses animais mostraram que o tratamento com CNTF reduziu expressivamente a gordura dos vacúolos lipídicos do tecido adiposo marrom interescapular e branco retroperitoneal. Este fato foi evidenciado pela contagem de um maior número de núcleos de células adiposas e de vacúolos lipídicos pequenos nestes animais em comparação aos grupos controle. Vale destacar que tais efeitos foram observados sobre a gordura branca retroperitoneal, mas não na gordura marrom dos animais tratados com TAT-CNTF.

Analisamos a ação do CNTF e da TAT-CNTF sobre a morfologia e morfometria do tecido adiposo marrom interescapular e branco retroperitoneal e epididimal de ratos neonatos, tratados durante 5 dias com CNTF e durante 5 ou 15 dias com TAT-CNTF. Estes animais foram sacrificados na idade P17.

Nossos resultados, além de confirmarem os dados prévios, mostraram que mesmo com a interrupção do tratamento após 5 dias o efeito do CNTF persistiu sobre as células

adiposas. Este fato foi evidenciado na análise morfométrica pela redução áreas dos vacúolos lipídicos no tecido adiposo marrom interescapular e branco retroperitoneal. Além disso, o número de núcleos e de vacúolos lipídicos nestas células foi maior nos animais tratados com CNTF em relação ao observado nos demais grupos. Este resultado confirma, como já reportamos, o obtido por outros autores em animais adultos, nos quais também os efeitos do tratamento com CNTF persistiram por vários dias após a interrupção do tratamento (LAMBERT E COLS., 2001; ETTINGER E COLS., 2003; BLÜHER E COLS., 2004; KOKOEVA E COLS., 2005).

Por outro lado, não verificamos diferença nas características morfológicas e nos parâmetros morfométricos no tecido adiposo branco epididimal dos animais tratados com CNTF neste período quando comparados com os demais grupos. Sleeman e cols. (2003) relataram resultados semelhantes ao tratarem camundongos com uma forma modificada do CNTF (Axokina – CNTF<sub>AX15</sub>). Porém, estes autores verificaram que os animais tiveram uma redução da massa do tecido adiposo branco epididimal quando comparados ao grupo controle que recebeu veículo de diluição. Em nosso trabalho não avaliamos a massa desse tecido pela dificuldade que se tem em removê-la integralmente do animal na idade de 17 dias.

A avaliação morfológica e morfométrica do tecido adiposo marrom interescapular dos animais tratados com TAT-CNTF revelou vacúolos lipídicos com áreas maiores que os observados nos animais que receberam CNTF. Curiosamente, as áreas dos vacúolos lipídicos dos animais tratados com TAT-CNTF se mostram menores que as dos animais que receberam PBS e dos animais sem tratamento (ST). Além disso, o número de núcleos e de vacúolos lipídicos nos animais que receberam TAT-CNTF foi menor em relação aos

animais tratados com CNTF e maior quando comparado aos animais tratados com PBS e ST.

Adicionalmente, a análise do tecido adiposo branco retroperitoneal revelou que os grupos tratados com TAT-CNTF por 5 ou 15 dias possuíam vacúolos lipídicos com áreas inferiores aos apresentados pelos animais tratados com PBS e ST. Por outro lado, não houve diferenças significativas entre os animais tratados com TAT-CNTF e CNTF. Em concordância com esses dados, o número de núcleos e vacúolos lipídicos por  $\text{mm}^2$  nos animais que receberam TAT-CNTF foi superior ao registrado nos grupos controle, mas semelhante ao dos animais tratados com CNTF. Por sua vez, a avaliação do tecido adiposo branco epididimal revelou não haver diferença das características morfológicas e morfométricas entre todos os grupos, inclusive quando comparados com os animais ST.

Ainda, devemos destacar também que o efeito produzido pelo tratamento com TAT-CNTF sobre a gordura marrom interescapular mostra que esta molécula possui a capacidade do CNTF de atuar sobre esse tecido. O retardo na manifestação dessa ação pode ser devido às diferenças farmacocinéticas de ambas. Ou seja, a presença do peptídeo TAT deve ter contribuído para sua retenção em outros tecidos, diminuindo assim sua disponibilidade na gordura marrom interescapular.

Quanto à ação do CNTF diretamente sobre os adipócitos, sabe-se que estas células expressam o complexo-receptor para CNTF e que a ativação deste receptor modifica a expressão gênica e protéica nos adipócitos (GLOAGUEN E COLS., 1997; LAMBERT E COLS., 2001; OTT E COLS., 2002; ZVONIC E COLS., 2003 e 2005). Em particular, o CNTF promove na gordura marrom o aumento da expressão da isoforma-1 da proteína desacopladora da cadeia respiratória da mitocôndria (UCP1) (OTT E COLS., 2002;

BLUHER E COLS., 2004). Esse aumento é importante para a manutenção da temperatura corpórea independente de tremor muscular (NEDERGAARD E COLS., 2001). Verificamos recentemente no nosso laboratório que administração intracerebroventricular de CNTF aumentou a expressão da UCP1 no tecido adiposo marrom interescapular de ratos adultos, ao passo que nos animais que receberam TAT-CNTF tal aumento não ocorreu (VIEIRA, 2007). Em função disto e à luz dos dados morfológicos e morfométricos da gordura marrom obtidos em animais com 7 dias de vida, propusemos que apenas o CNTF teria aumentado a expressão da UCP1, mas não a TAT-CNTF. Contudo, pelos resultados obtidos nos animais tratados por 5 ou 15 dias com TAT-CNTF não podemos descartar a possibilidade de que a TAT-CNTF tenha também alterado a expressão da UCP1.

Quanto ao tecido adiposo branco, recentemente foi reportado que o tratamento com CNTF reduziu a massa do tecido adiposo branco epididimal de camundongos tornados obesos por dieta (CROWE E COLS., 2008). Esta redução foi acompanhada pela diminuição da dimensão dos adipócitos e do conteúdo de triglicérides. Além disso, o tratamento não afetou a lipólise, mas resultou em uma diminuição da esterificação de gordura e lipogênese, melhora da oxidação de ácidos graxos e aumento da biogênese mitocondrial. Estes autores propuseram que o CNTF deve reprogramar o tecido adiposo, promovendo a geração de mitocôndrias, melhorando a capacidade oxidativa e reduzindo lipogênese, resultando na perda de triglicérides. Embora não tenhamos realizado estas avaliações, nossos dados morfológicos e morfométricos do tecido adiposo branco epididimal não dão suporte a que tais fenômenos tenham ocorrido neste tecido dos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF. Essa aparente discrepância por ter sido causada pela diferentes espécies utilizadas e pelas diferentes idades e condições metabólicas dos animais.

Por outro lado, nossos achados morfológicos e morfométricos sobre o tecido adiposo branco retroperitoneal parecem corroborar as observações de Crowe e cols. (2008).

### **5.5. Ação protetora do CNTF e TAT-CNTF em motoneurônios**

Nossos resultados mostraram que a administração de CNTF por 5 dias e TAT-CNTF por 5 e 15 dias no período imediatamente pós-natal garantiu a sobrevivência dos motoneurônios axotomizados mesmo dois meses depois de cessado o tratamento. De fato, 67 dias após axotomia esses animais apresentaram um número de motoneurônios contendo BDA, aproximadamente, 65% maior que os animais controle (PBS). Esses dados evidenciam que a adição do domínio PTD da TAT do HIV ao CNTF manteve seu potencial neurotrófico, confirmando nossos resultados prévios da ação neuroprotetora da TAT-CNTF verificada imediatamente após a interrupção do tratamento (P2 a P7) (REZENDE, 2005; REZENDE E COLS., 2009).

Interessantemente, sabe-se que durante a primeira semana de vida não há expressão detectável de CNTF por técnicas de imunistoquímica e de biologia molecular, embora o CNTFR $\alpha$  esteja presente desde o período embrionário na medula espinal (STÖCKLI E COLS. 1991; DOBREA E COLS, 1992; MACLENNAM E COLS., 1996; SENDTNER E COLS., 1997). O déficit de CNTF durante a primeira semana pode ser uma das principais causas da intensa morte de neurônios motores e sensitivos provocada pela axotomia nessa idade. Esta hipótese é fortemente corroborada pelo fato de que a vulnerabilidade dos neurônios a axotomia diminui com a idade, quando tal lesão é produzida relativamente distante do corpo celular (SCHMALBRUCH, 1984,1987,1988; LOWRIE E VRBOVÁ, 1992; LOWRIE E COLS., 1994).

Nossos resultados relativos aos animais controle (PBS) confirmam amplamente

estes dados da literatura, já que, 37 e 67 dias após o esmagamento do nervo isquiático na idade P2, estes animais apresentam, respectivamente, ao redor de 26% e 22% do número de motoneurônios contados nos animais íntegros.

O tratamento com CNTF ou TAT-CNTF promoveu efeito neuroprotetor semelhante. Em ambos os casos o percentual de neurônios sobreviventes a axotomia 67 dias após a lesão correspondeu ao redor de 35% do número de motoneurônios contados nos animais íntegros. Embora este percentual possa ser considerado relativamente baixo, ele é aproximadamente 65% superior ao dos animais tratados com PBS, conforme já referido. Além disso, devemos destacar que enquanto nos animais tratados com PBS continuou a haver morte de motoneurônios ao longo do tempo, nos animais que receberam CNTF ou TAT-CNTF isto não ocorreu. Ainda, a análise morfométrica dos motoneurônios 67 dias após a lesão revelou que estas células possuíam diâmetros semelhantes ao dos animais íntegros e superiores aos observados nos animais tratados com PBS. Estes últimos dados reforçam a evidência de que a ação neuroprotetora do TAT-CNTF sobre motoneurônios axotomizados é semelhante ao do CNTF.

A constatação de que o tratamento com CNTF ou TAT-CNTF não tenha promovido a sobrevivência de 100% dos motoneurônios axotomizados pode ser explicado pelo fato de que tais células são dependentes da ação protetora de outros fatores neurotróficos (KUNO, 1990; LOWRIE E VRBOVÁ, 1992; OORSCHOT E MCLENNAN, 1998). A disponibilidade de tais fatores e/ou expressão desses receptores durante primeira semana pós-natal também parece não ser suficiente para garantir a sobrevivência dos neurônios lesados (Sendtner e cols., 2000). Por outro lado, nossas observações reforçam a importância do tratamento precoce com CNTF ou TAT-CNTF, pois o CNTFR $\alpha$  está presente nos

motoneurônios já no período pós natal, podendo exercer seu papel como “fator de lesão” (FRIEDMAN E COLS., 1992; SENDTNER E COLS., 1992C; SMITH E COLS., 1993). Tal ação durante esse período, que podemos caracterizar como aguda, permitiria que outros fatores neurotróficos, derivados do microambiente do nervo e dos alvos do motoneurônios, possam ser sintetizados em tempo hábil para garantir sua sobrevivência (KUNO, 1990; LOWRIE E VRBOVÁ, 1992; OORSCHOT E MCLENNAN, 1998). De fato, isto poderia explicar o efeito de neuroproteção a longo prazo produzido pela administração de CNTF ou TAT-CNTF na fase pós natal, que verificamos em nossos experimentos.

Recentemente, demonstramos que a ação neuroprotetora do CNTF sobre motoneurônios da intumescência lombar de ratos neonatos após secção do nervo isquiático seria através de sua atuação sobre a expressão gênica e protéica das proteínas anti- e pro-apoptóticas Bcl-2 e Bax, respectivamente (REZENDE E COLS., 2008). O tratamento com CNTF por 5 dias após a lesão na idade P2 de ratos neonatos diminuiu a expressão da proteína Bax e seu mRNA na intumescência lombar. Além disso, observamos um aumento na expressão gênica da Bcl-2 e da interação da Bcl-2 com a Bax (Bcl-2/Bax). A heterodimerização da Bcl-2/Bax inibe a ação pro-apoptótica da Bax prevenindo a morte celular (Yang et al. 1995). Acredita-se que a proporção de Bcl-2/Bax é determinante para a sobrevivência ou morte seguido de um sinal apoptótico (ADAMS E CORY, 1998; CHAO E KORSMEYER, 1998; SENDTNER E COLS., 2000; BECKER E BONNI, 2004). Até o momento, verificamos também que o tratamento com TAT-CNTF por 5 dias após a lesão na idade P2 promoveu aumento da expressão de mRNA da Bcl-2 (dado não publicado). Embora não tenhamos realizado ainda os demais experimentos para avaliação a ação da

TAT-CNTF sobre as vias apoptóticas, este dado nos permite levantar a hipótese de que os mecanismos de ação da mesma devam ser os mesmos ativados pelo CNTF.

A constatação do efeito neurotrófico da TAT-CNTF sugere fortemente que esta manteve sua afinidade pelos receptores do CNTF presentes nos motoneurônios. Estes receptores são complexos protéicos compostos por três subunidades: CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$  e gp130. Especificamente, o CNTF se liga no seu receptor CNTFR $\alpha$  e uma vez formado o complexo CNTF-CNTFR $\alpha$  ocorre o recrutamento da gp130 e em seguida do LIFR $\beta$ . O complexo receptor formado desencadeia a ativação de sinais intracelulares da via JAK/STAT promovendo a ativação processos de sinalização intracelular com a fosforilação do fator de transcrição STAT3 (DAVIS E COLS., 1993A,B; MACLENNAN E COLS., 1996; SLEEMAN E COLS., 2000). De fato, dados recentes do nosso laboratório mostraram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) da TAT-CNTF promoveu a fosforilação da STAT3 após 20 minutos na região hipotalâmica, evidenciando assim que ela foi capaz de ativar o complexo receptor na membrana e, conseqüentemente a via de sinalização intracelular (VIEIRA, 2007). Além disso, recentemente também verificamos que o tratamento subcutâneo com CNTF ou TAT-CNTF promoveu a fosforilação da STAT3 na intumescência lombar de ratos neonatos com dois dias de vida. Contudo, a fosforilação da STAT3 promovida pela TAT-CNTF foi menos intensa que a observada pelo tratamento com CNTF (REZENDE E COLS., 2009). Assim, é plausível supor que o mesmo tenha ocorrido em nossos experimentos. Além disso, a presença da seqüência TAT acoplada ao CNTF pode ter inclusive contribuído para aumentar a probabilidade deste se ligar ao seu receptor CNTFR $\alpha$  na membrana celular dos motoneurônios. De fato, ao promover a translocação de proteínas para o interior da célula, por inserção na matriz lipídica da

membrana, a seqüência TAT pode facilitar a eventual interação destas com outros elementos protéicos da membrana (DIETZ E BÄHR, 2004). Neste mesmo cenário, tal mecanismo pode ter facilitado a interação da região ligante da TAT-CNTF com receptores do LIF (LIFR $\beta$  e gp130), exercendo importante efeito neurotrófico sobre os motoneurônios após axotomia (LI E COLS., 1995; HAAS E COLS., 1999; MONVILLE E COLS., 2001).

Neste sentido, a distribuição de TAT-CNTF após administração subcutânea pode dificultar que atinja concentrações semelhantes à do CNTF na medula espinal e no hipotálamo. Contudo, a quantidade de TAT-CNTF que atingiu a medula espinal foi suficiente para produzir a proteção dos motoneurônios nos ratos neonatos.

Nossos resultados, até o momento, da ação neuroprotetora da TAT-CNTF sobre motoneurônios axotomizados suportam seu potencial terapêutico para o tratamento de lesões periféricas e de doenças que afetam os motoneurônios como a esclerose lateral amiotrófica. Estes dados parecem ganhar ainda maior relevância quando considerado juntamente com nossas observações sobre seus efeitos na recuperação sensorial e motora, como será discutido posteriormente, e ao fato de que a TAT-CNTF não promoveu efeitos metabólicos deletérios mesmo quando empregado por 15 dias.

## **5.6 Ação protetora do CNTF e TAT-CNTF sobre neurônios sensitivos**

A administração de CNTF por 5 dias ou de TAT-CNTF por 5 e 15 dias em ratos neonatos que sofreram esmagamento do nervo isquiático na idade P2 promoveu a sobrevivência dos neurônios sensitivos dos gânglios das raízes dorsais (GRD) L4 e L5. O número de neurônios sensitivos nos gânglios L4 e L5 dos animais tratados com essas moléculas foi superior aos computados nos animais controle (PBS) 60 dias após a lesão.

Além disso, o efeito neurotrófico das mesmas foi também evidenciado pelo valor do diâmetro médio dos neurônios sensitivos dos gânglios L4 e L5. Os neurônios sensitivos nos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF exibiram diâmetro médio semelhante ao observado nos animais íntegros e significativamente superiores ao registrado nos animais que receberam PBS. Esses dados reforçam a hipótese de que a adição do domínio PTD da TAT do HIV ao CNTF manteve seu potencial neurotrófico, conforme previamente verificado em motoneurônios da intumescência lombar de animais neonatos no nosso laboratório (REZENDE, 2005; REZENDE E COLS., 2009).

Sabe-se que a presença de CNTF é capaz de promover a sobrevivência e o crescimento de neuritos de neurônios sensitivos dos GRD de aves e roedores mantidos em cultura (SIMON E COLS., 1995; THIER E COLS., 1999; SANGO E COLS. 2008). Em camundongos transgênicos com expressão aumentada de CNTF há redução da apoptose de neurônios sensitivos dos GRD durante o desenvolvimento embrionário (TOLOSANO E COLS., 1996). Além disso, a ação neuroprotetora do CNTF foi observada em neurônios do GRD de embriões de pintainhos e de camundongos neonatos (P5) após a axotomia (LO E COLS., 1995). Pudemos verificar efeitos semelhantes quando fornecemos TAT-CNTF, a culturas primárias de neurônios dos GRD de embrião de galinha. A presença da TAT-CNTF impediu a morte destas células, evidenciando que a mesma conservou a ação neurotrófica que o CNTF exerce sobre neurônios sensitivos (LANGONE E COLS., 2004; REZENDE E COLS., 2009). Desta forma, nossos dados *in vivo* corroboram os achados *in vitro* e confirmam nossos resultados prévios sobre a ação do CNTF e da TAT-CNTF na sobrevivência de neurônios sensitivos dos GRD. Além disso, mostram pela primeira vez que o tratamento iniciado na idade P2, e mantido por pelo menos 5 dias após axotomia,

garantiu a sobrevivência dos neurônios sensitivos a longo prazo (60 dias).

Em particular, estas observações corroboram nossos resultados de que o tratamento com CNTF ou TAT-CNTF é capaz de estimular a recuperação da sensibilidade, como será discutido posteriormente, nos quais verificamos que o limiar de resposta ao estímulo elétrico após 20, 30, 45 e 60 dias da lesão foi aproximadamente 50% inferior nos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF quando comparados com os animais tratados com PBS.

Neste contexto é importante lembrar que as porções central e lateral da região plantar da pata do rato são territórios de inervação dos nervos tibial e sural, respectivamente, ao passo que a porção medial é inervada pelo nervo safeno, que é um ramo do nervo femoral. Quando é realizada a denervação sensitiva pelo esmagamento ou secção do nervo isquiático, o território inervado pelo nervo tibial pode ser invadido por brotamentos do nervo safeno antes da sua eventual reinervação pelo nervo tibial (DEVOR E COLS., 1979). Contrariamente, o território correspondente ao nervo sural parece ser preservado dessa invasão (DE KONING E COLS., 1986). Em virtude disso as avaliações funcionais sensitivas foram realizadas estimulando-se somente a região inervada pelo nervo sural. Esta escolha foi importante, pois aproximadamente 93% dos axônios presentes no nervo sural do rato pertencem a neurônios sensitivos do GRD L5 (SWETT E COLS., 1991). Assim, o fato de verificarmos que o número de neurônios BDA<sup>+</sup> foi sempre superior nos gânglios L5 quando comparado ao dos gânglios L4 em todos os animais analisados corrobora este dado da literatura e reforça nossos achados sobre a recuperação funcional sensitiva.

Quanto ao possível mecanismo que permite a ação neuroprotetora do CNTF e TAT-CNTF, é importante considerar primeiramente que, embora o receptor específico do CNTF,

o CNTFR $\alpha$ , já esteja presente nos gânglios das raízes dorsais de ratos durante período embrionário, a expressão do CNTF só é detectável após a primeira semana de vida (STÖCKLI E COLS. 1991; DOBREA E COLS, 1992; MACLENNAN E COLS., 1996; SENDTNER E COLS., 1992C). Desta forma, o suprimento com CNTF ou TAT-CNTF durante os períodos iniciais após o esmagamento do nervo isquiático (P2 a P7) parece ter sido decisivo para a sobrevivência dos neurônios sensitivos. Além disso, constatação do efeito neurotrófico da TAT-CNTF sobre neurônios sensitivos dos GRD sugere que esta manteve a afinidade pelos receptores do CNTF presentes nesses neurônios (MACLENNAN E COLS., 1996). Lembrando que tais receptores são complexos protéicos formados pelo receptor específico CNTFR $\alpha$ , pelo receptor do específico LIFR $\beta$  e pela subunidade gp130 (SLEEMAN E COLS., 2000). É plausível supor que a interação da TAT-CNTF com o CNTFR $\alpha$  tenha desencadeado a formação e a ativação do complexo receptor. Este, por sua vez, promoveu a sinalização intracelular através da via JAK/STAT fosforilando o fator de transcrição STAT3 (DAVIS E COLS., 1993A,B; MACLENNAN E COLS., 1996; SLEEMAN E COLS., 2000). Recentemente, Sango e cols. (2008) mostraram que a sobrevivência de neurônios de GDR de ratos adultos dependeu da fosforilação da STAT3 (pSTAT3) induzida pelo CNTF adicionado ao meio de cultura. Conforme já reportado e reforçando esta hipótese, também verificamos em nosso laboratório que a administração subcutânea e intracerebroventricular (i.c.v.) da TAT-CNTF promoveu a fosforilação da STAT3 na intumescência lombar (REZENDE E COLS., 2009) e na região hipotalâmica (VIEIRA E COLS, 2007).

Assim, estes resultados dão suporte ao potencial terapêutico da TAT-CNTF no tratamento de lesões periféricas e de doenças que afetam os neurônios sensitivos espinais.

### **5.7. Ação do CNTF e TAT-CNTF sobre a recuperação funcional motora**

Nossos resultados mostram que a recuperação funcional motora ocorre em ratos que sofreram esmagamento do nervo isquiático aos dois dias de vida (P2) e pode ser avaliada através do *walking track test*. Além disso, pudemos verificar que a recuperação funcional motora é muito baixa quando nenhuma intervenção é feita para estimulá-la. Desta forma, tal metodologia mostra-se adequada para avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas que têm como objetivo promover a sobrevivência neuronal e a regeneração axonal. Até onde pudemos investigar esta abordagem não havia sido ainda realizada no modelo experimental em questão. Assim, os dados aqui obtidos são originais.

É importante destacar que, no seu conjunto, os dados obtidos com o V-WTT e com o P-WTT permitiram obter informações similares. Porém, a comparação entre os dois métodos revelou que os dados obtidos com P-WTT apresentaram maior variabilidade. Tal variabilidade tem sido atribuída à menor precisão das medidas obtidas a partir da impressão das pegadas do animal no papel. Nossos resultados confirmaram o reportado por outros autores (DIJKSTRA E COLS., 2000; VAREJÃO E COLS., 2001) e validaram as adaptações por nós implementadas ao V-WTT para aumentar a precisão na medida das pegadas. Desta forma, os dados discutidos abaixo correspondem àqueles resultantes do V-WTT.

Inicialmente, o teste funcional mostrou que o protocolo de tratamento com CNTF ou TAT-CNTF, com início no momento da lesão, promoveu a recuperação motora desses animais. Este efeito pode ser verificado aos 20 dias pós-lesão quando o SFI dos animais tratados estava ao redor de -40, contrastando com o registrado para os

animais controle (PBS) que apresentaram SFI ao redor de -52 ( $p < 0,01$ ). Ao longo do tempo o valor de SFI aumentou gradativamente para todos os grupos experimentais. Porém, o valor de SFI dos grupos tratados com CNTF ou TAT-CNTF aumentou de maneira mais acentuada que o observado nos grupos que receberam PBS ( $F_{4,60}=35,28$ ;  $p < 0,0001$ ). Sendo que, 60 dias após a lesão o valor de SFI para o grupo tratado por 15 dias com TAT-CNTF ficou ao redor de -14 e o dos animais controle foi de aproximadamente -40.

Tais observações estão amplamente de acordo com o fato do tratamento com CNTF ou TAT-CNTF ter promovido à sobrevivência dos motoneurônios axotomizados e a regeneração axonal, como discutido anteriormente. Além disso, nossos resultados referentes à proteção de neurônios sensitivos e à recuperação funcional sensitiva, promovida igualmente pelo CNTF e TAT-CNTF, permitem supor que a melhora da recuperação funcional motora possa ser atribuída também à otimização do processamento medular. Corroborando esta hipótese tem-se que o tratamento de ratos neonatos com CNTF reduz morte de interneurônios medulares após a secção do nervo isquiático na idade P2 (WESTSIDE E COLS., 1998; OLIVEIRA E COLS., 2002 )

Nossos resultados também evidenciaram que a TAT-CNTF exerceu efeito semelhante ao CNTF na recuperação funcional motora. É interessante notar também que os animais tratados com TAT-CNTF por 15 dias não apresentaram ganho na recuperação funcional motora quando comparados com aqueles que foram tratados por apenas 5 dias. Este dado concorda com o fato de não termos encontrado diferenças no número de motoneurônios BDA<sup>+</sup> e no número total de axônios mielínicos regenerados entre os grupos tratados com CNTF durante 5 dias ou com TAT-CNTF durante 5 e 15 dias.

## **5.8 Ação do CNTF e TAT-CNTF sobre a recuperação funcional sensitiva**

Após a padronização do método para avaliação da resposta à estimulação elétrica da pata, adaptado do proposto por De Koning e cols. (1986), analisamos o efeito do tratamento com CNTF, TAT-CNTF e PBS sobre a recuperação funcional sensitiva dos animais lesados em P2 com sobrevida de 67 dias.

Para a padronização do método e obtenção do limiar de resposta em animais normais utilizamos animais íntegros com a mesma idade dos animais lesados em cada tempo de avaliação. Nestes animais observamos aumento gradual do limiar para resposta ao estímulo elétrico segundo a idade do animal. Tal aumento pode ser atribuído ao aumento da impedância da pata do animal à medida que o animal cresce e não a uma eventual alteração funcional dos neurônios sensitivos.

Os animais lesados e tratados com PBS apresentaram um alto limiar de resposta 20 dias após a lesão, que correspondeu a 10 vezes o valor observado nos animais íntegros. Nos tempos de avaliação subsequentes houve uma gradativa diminuição do limiar de resposta, evidenciando a regeneração do nervo isquiático e recuperação funcional ao longo do tempo. Contudo, o limiar de resposta ao estímulo elétrico não diferiu entre o 45º e 60º dia pós-lesão.

Por sua vez, os resultados obtidos nos animais que receberam CNTF e TAT-CNTF evidenciam um claro efeito estimulador destas moléculas sobre a recuperação da sensibilidade. O limiar de resposta ao estímulo elétrico foi aproximadamente 50% inferior ao dos animais tratados com PBS. Embora, esse valor corresponda a aproximadamente 5

vezes superior ao dos animais íntegros 20 dias após a lesão, ele atingiu um valor apenas 0,5 vezes superior ao destes animais 60 dias após a lesão.

A sensibilidade a estímulos nocivos é a primeira modalidade de recuperação funcional sensitiva depois de lesões de nervos periféricos e o método de avaliação utilizado neste trabalho é comprovadamente eficaz para a investigação do efeito da administração de agentes neurotróficos após lesões nervosas periféricas (DE KONING E COLS., 1986; DIJKSTRA E COLS., 2000). Interessantemente, o CNTF é apontado como um fator crítico para o brotamento axonal após axotomia traumática ou devido ao bloqueio químico das junções neuromusculares pela toxina botulínica (JORDAN, 1996; SIEGEL E COLS., 2000; ENGLISH, 2003). Em particular, Siegel e cols. (2000) verificaram que em camundongos que não tinham o gene para o CNTF falharam na geração de brotamentos depois da denervação parcial e paralisia muscular por aplicação da toxina botulínica. Além disso, a capacidade de brotamento pôde ser restaurada pela aplicação exógena de CNTF.

Nossos resultados sugerem fortemente que CNTF e TAT-CNTF contribuíram para a recuperação sensorial protegendo os neurônios sensitivos axotomizados e estimulando do brotamento axonal e o crescimento dessas fibras em regeneração. Desta forma podemos supor que o tratamento com CNTF ou TAT-CNTF pode ter acelerado a reinervação das regiões alvo, possibilitando que ambiente tissular dessas regiões estimulasse ainda mais sua própria reinervação. Além disso, sabe-se que o CNTF reduz a atrofia muscular induzida pela denervação e atenua na redução da contração e tensões tetânicas que resultam da denervação do músculo (HELGREN E COLS., 1994). Embora não tenhamos realizado nenhuma avaliação da reinervação e do trofismo muscular, a musculatura da pata dos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF mostrava-se mais trófica do que a dos animais tratados com PBS (dados não mostrados). Este fato é particularmente importante para a

adequada interpretação dos resultados da avaliação sensitiva, já que este se baseia na resposta motora do animal ao estímulo aplicado.

### **5.9 Regeneração dos axônios mielínicos**

A contagem do número total de axônios mielínicos nos nervos tibial, fibular e sural mostrou que o CNTF e a TAT-CNTF estimularam igualmente a regeneração axonal. Este efeito foi expressivo considerando-se que após 60 dias da lesão o número total de axônios mielínicos correspondeu a aproximadamente de 71% a 86% do computado nos nervos tibial, fibular e sural dos animais íntegros, enquanto que nos ratos controle (PBS) este percentual correspondeu a aproximadamente de 51% a 55%.

A capacidade de o CNTF estimular a regeneração axonal em nervos periféricos esta bem documentada (SAHENK E COLS., 1994; NEWMAN E COLS., 1996). Assim, também sob este ângulo nossos resultados reforçam que a TAT-CNTF manteve essa importante capacidade do CNTF. Vale considerar que a constatação do efeito neuroprotetor de ambas as moléculas sobre motoneurônios e neurônios sensitivos foi obtida através do transporte retrógrado de BDA aplicado nos nervos regenerados.

Desta forma, a presente avaliação do número de axônios mielínicos regenerados evidencia que a ação estimuladora do CNTF e da TAT-CNTF foi exercida indistintamente sobre ambos os tipos de neurônios. De fato, sabe-se que o CNTF estimula a formação e crescimento de brotamentos axonais em neurônios sensoriais e motores e que sua presença é necessária para adequada reinervação muscular (KWNON E COLS., 1994; DAVEY E COLS., 2000; SIEGEL E COLS., 2000; ENGLISH, 2003; SANGO E COLS., 2008). Além disso, o CNTF exerce também importante ação trófica sobre músculos denervados (HELGREN E COLS., 1994, VERGARA E RAMIREZ, 2004). Embora estes dados da literatura tenham sido obtidos a partir de experimentos *in*

*vitro* e com animais adultos, é razoável supor que estas ações do CNTF e da TAT-CNTF tenham ocorrido no nosso modelo experimental com animais neonatos. Além disso, nossos dados sobre a regeneração de axônios mielínicos estão de acordo com os resultados obtidos na avaliação da recuperação funcional sensorial e motora.

Por sua vez, a morfometria dos axônios mielínicos sugere que a ação neurotrófica do CNTF e TAT-CNTF pode ter estimulado a formação do citoesqueleto e a mielinização dos axônios. Existem poucos estudos correlacionando a ação de fatores neurotróficos, e do CNTF em particular, sobre a expressão proteínicas do citoesqueleto axonal (ROBERT E COLS. 2001; KELLEHER E COLS., 2006). Contudo, é interessante notar que o diâmetro axonal depende da organização e quantidade de neurofilamentos (HOFFMAN E GRIFFIN, 1993, FRESSINAUD E COLS., 2002). A administração de CNTF e TAT-CNTF durante 5 dias após lesão pode ter sido suficiente para manter ativa a via de sinalização JAK/STAT e, conseqüentemente, a ativação de genes relacionados com sobrevivência dos neurônios e a expressão e processamentos de proteínas do citoesqueleto (SHEU E COLS., 2000; SCHWEIZER E COLS., 2002; TENG E TANG, 2006; CHEN E COLS. 2007). Contudo, esta é uma questão em aberto e que esta sendo abordada por estudos no nosso laboratório.

A importância do CNTF no processo de remielinização axonal tem sido evidenciada por vários autores no sistema nervoso central e periférico (LINKER E COLS. 2002, CHEN E COLS. 2007). Nos últimos anos tem despertado especial interesse a participação do CNTF no processo de remielinização na esclerose múltipla (STANKOFF E COLS, 2002; LINKER E COLS. 2002). Contudo, poucos estudos morfométricos foram realizados com o objetivo de quantificar esse efeito no sistema nervoso central ou periférico. Especificamente, apenas dois grupos de pesquisadores fizeram esta abordagem em modelos

experimentais de tubulização do nervo isquiático (ZHANG E COLS., 2004) e de avulsão e reimplante de raízes cervicais ventrais de ratos adultos (LANG E COLS., 2008). Ambos os autores mostraram que a presença de CNTF no tubo (ZHANG E COLS., 2004) e que uma única dose de CNTF aplicada nos ratos avulsionados estimulou a mielinização dos axônios em regeneração (LANG E COLS., 2008). Nossos resultados corroboram estas observações e representam um dado original, não só pelo fato de evidenciarem que a TAT-CNTF promove efeito semelhante ao CNTF, mas também reportarem esse efeito pela primeira vez no modelo empregado neste estudo. O mecanismo iniciador e promotor de mielinização no sistema nervoso periférico não é ainda totalmente claro e tem sido proposto que depende tanto de sinais provenientes do axônio em regeneração como das células de Schwann (ROSENBERG E COLS., 2006; CHEN E COLS., 2007). Nossos dados sugerem que o CNTF ou TAT-CNTF, por estimularem a regeneração axonal, pode ter secundariamente estimulado as células de Schwann a desencadarem seu comportamento mielinizante, considerando que este comportamento se correlaciona com o diâmetro do axônio (BRADY E QUARLES, 1973; RAINE, 1984). Outro aspecto interessante que pode ser considerado neste contexto é que o estímulo a mielinização pode também ter contribuído à maturação funcional da fibra nervosa mielínica. Os dados de recuperação funcional motora e sensitiva observada nos grupos tratados com CNTF e TAT-CNTF corroboram esta hipótese. É interessante notar que com a mielinização e amadurecimento da fibra nervosa, as células de Schwann passam a expressar CNTF (LEE E COLS., 1995). Gatzinsky e cols. (2003) mostraram que CNTF é necessário para a estabilidade estrutural e funcional dos nodos de Ranvier da fibra nervosa. Estes autores propuseram que o CNTF possa ser liberado nesta região pelas células de Schwann (por vias não convencionais) e atuar de forma autócrina/parácrina. Esta atuação poderia intermediar a ação da Reg-2, uma molécula

neurotrófica que atua em motoneurônios (NISHIMUNE E COLS., 2000), que contribuiria para a manutenção da estabilidade funcional dos motoneurônios.

Por sua vez, os valores de razão “g” corroboram os dados referentes ao diâmetro dos axônios e a mielinização. Este parâmetro, que corresponde ao cociente DA/DF, fornece informações sobre a adequação da espessura da bainha de mielina em relação ao diâmetro axonal e à distância internodal (SCHMIDTT E BEAR, 1937; FRIEDE E BISCHHAUSEN, 1982; BEUCHE E FRIEDE, 1985). Estas relações têm importância funcional, pois a velocidade de condução do impulso nervoso depende do compromisso entre elas (WAXMAN, 1980; BEUCHE E FRIEDE, 1985). Ou seja, a propagação da corrente gerada pela deflagração do potencial de ação num nódulo de Ranvier dependerá do valor da resistência elétrica longitudinal e transversal da fibra nervosa (WAXMAN, 1980). Sendo que a primeira depende do diâmetro do axônio e a segunda da espessura da bainha de mielina. Em geral, nos nervos regenerados de ratos adultos há uma redução da velocidade de condução do impulso nervoso devido à redução da distância internodal (WAXMAN, 1987). Embora ainda não se conheça bem os mecanismos envolvidos, acredita-se que a relação funcional que se verifica durante a regeneração entre axônio e células de Schwann tem como finalidade ajustar os demais parâmetros (DA e EBM) à distância internodal que vai se estabelecendo (WAXMAN, 1980). Os autores têm considerado que os axônios possuem uma bainha adequada ao seu diâmetro quando valores da razão “g” se encontrem entre 0,60 e 0,75. Em geral o valor médio da razão “g” se estabelece entre 0,60 e 0,70 para fibras de nervos normais e tende a se elevar para as fibras nervosas regeneradas (FRIEDE E BISCHHAUSEN, 1982; BEUCHE E FRIEDE, 1985; MAZZER E COLS., 2008). Nossos resultados mostram que os animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF exibiram médias da razão “g” dentro da faixa de 0,65 a 0,70. Em particular, a média da razão “g” do nervo sural desses animais foi semelhante à dos animais íntegros. Este

resultado corrobora aqueles obtidos na avaliação da recuperação funcional sensitiva, especialmente se considerarmos que os estímulos foram aplicados na região plantar da pata do animal inervada por ramos do nervo sural. Estes resultados mostram que nestes últimos a mielinização promoveu um ajuste adequado das relações entre o diâmetro axonal, a espessura da bainha de mielina e da distância internodal. Por outro lado os animais que receberam PBS apresentaram valores médios da razão “g” superiores (0,71 a 0,77) ao dos animais tratados com CNTF ou TAT-CNTF ( $P < 0,01$ ).

## 6. CONCLUSÕES

O conjunto dos nossos resultados permitem afirmar que no modelo experimental utilizado neste estudo:

- 1) A adição do peptídeo contendo um domínio de transdução de proteínas à molécula do CNTF não modificou suas propriedades neurotróficas.
- 2) A capacidade de neuroproteção da TAT-CNTF foi semelhante à do CNTF tanto sobre neurônios motores como sobre neurônios sensitivos.
- 3) A proteção produzida pela TAT-CNTF sobre os neurônios motores e sensitivos durante as primeiras semanas de vida contribuíram à recuperação funcional motora e sensitiva de maneira semelhante ao CNTF.
- 4) A administração da TAT-CNTF pôde ser realizada por um período expressivamente superior ao do CNTF sem a ocorrência dos importantes efeitos colaterais produzidos por este último sobre o crescimento dos animais.
- 5) O tratamento com TAT-CNTF ou CNTF por igual período (P2 a P7) produziu modificações no metabolismo energético, contudo diferiram quanto à intensidade dos efeitos produzidos.
- 6) O tratamento prolongado com TAT-CNTF (P2-P17) produziu importantes alterações nas concentrações plasmáticas de triglicérides e de colesterol.
- 7) O tratamento prolongado com TAT-CNTF (P2-P17) produziu efeitos sobre a gordura marrom e branca semelhantes aos observados no tratamento por curto período (P2-P7), sempre inferiores aos produzidos pelo tratamento com CNTF.

No nosso entender, este conjunto de dados abre perspectivas para futuras investigações sobre os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos neuroprotetores e metabólicos da TAT-CNTF, bem como a investigação desses efeitos em outros modelos experimentais de neurodegeneração. Além disso, estes dados reforçam ainda mais o uso da TAT-CNTF no tratamento de doenças que afetam o sistema nervoso e neurotraumas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE M. E. Estimation of nuclear population from microtome sections. **Anatomical Record**, **94**:239-247, 1946.

ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281,1322-6, 1998.

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)**:696-9, 1996.

AHIMA RS. Overcoming insulin resistance with CNTF. **Nat. Med.**, **12(5)**:511-512.

ALDSKOGIUS H, KOZLOVA EN. Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury. **Prog Neurobiol.**, **55(1)**:1-26, 1998.

APFEL SC, AREZZO JC, MORAN M, KESSLER JA. Effects of administration of ciliary neurotrophic factor on normal motor and sensory peripheral nerves in vivo. **Brain Res.**, **604(1-2)**:1-6, 1993.

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)**:1723-9, 2000.

BARBACID M. The Trk family of neurotrophin receptors. **J Neurobiol.**, **25(11)**:1386-403, 1994.

BARBIN G, MANTHORPE M, VARON S. Purification of the chick eye ciliary neurotrophic factor. **J Neurochem.**, **43(5)**:1468-78, 1984.

BECK M, KARCH C, WIESE S, SENDTNER M. Motoneuron cell death and neurotrophic factors: basic models for development of new therapeutic strategies in ALS. **Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.**, **2(Suppl1)**:S55-68, 2001.

BECKER-HAPAK M, MCALLISTER SS, DOWDY SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. **Methods**, **24(3)**:247-56, 2001.

BECKER EBE, BONNI A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog. Neurobiol.* 72 (1), 1-25, 2004.

BENNET MR, GIBSON WG, LEMON G. Neuronal cell death, nerve growth factor and neurotrophic models: 50 years on. **Auton Neurosci.**, **95(1-2)**:1-23, 2002.

BEUCHE W, FRIEDE RL. A new approach toward analyzing peripheral nerve fiber populations. II. Foreshortening of regenerated internodes corresponds to reduced sheath thickness. **J Neuropathol Exp Neurol.**, **44(1)**:73-84, 1985.

BLESCH A, GRILL RJ, TUSZYNSKI MH. Neurotrophin gene therapy in CNS models of trauma and degeneration. **Prog Brain Res.**, **117**:473-84, 1998.

BLÜHER S, MOSCHOS S, BULLEN JJr, KOKKOTOU E, MARATOS-FLIER E, WIEGAND SJ, SLEEMAN MW, MANTZOROS CS. Ciliary neurotrophic factor<sub>Ax15</sub> alters energy homeostasis, decrease body weight, and improves metabolic control in diet-induced obese and UCP1-DTA mice. **Diabetes**, **53**:2787-2796, 2004.

BOTHWELL M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. **Annu Rev Neurosci.**, **18**:223-53, 1995.

BRADY RO, QUARLES RH. The enzymology of myelination. **Mol Cell Biochem.**, **2(1)**:23-9, 1973.

BROOKS BR, SANJAK M, MITSUMOTO, H. Recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients: phase I-II safety, tolerability and pharmacokinetic studies. **Neurology**; **43(suppl)** A416, 1993.

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)**:5423-31, 2002.

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

CHAO MV. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci.**, **4(4)**:299-309, 2003.

CHAO DT, KORSMEYER SJ. Bcl-2 family: Regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 395-419, 1998.

CHEN ZL, YU WM, STRICKLAND S. Peripheral regeneration. **Annu Rev Neurosci.**, **30**:209-33, 2007.

CROWE S, TURPIN SM, KE F, KEMP BE, WATT MJ. Metabolic remodeling in adipocytes promotes ciliary neurotrophic factor-mediated fat loss in obesity. **Endocrinology**, **149(5)**:2546-56, 2008

CURTIS R, ADRYAN KM, ZHU Y, HARKNESS PJ, LINDSAY RM, DISTEFANO PS. Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. **Nature.**, **365(6443):**253-5, 1993.

DALLNER C, WOODS AG, DELLER T, KIRSCH M, HOFMANN HD. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. **Glia.**, **15;37(4):**374-8, 2002.

DANTAS DV. Efeito da melatonina na sobrevivência de motoneurônios espinais e regeneração axonal em ratos neonatos. Campinas, 2004, 75 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Funcional, área de Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

DA-SILVA CF, LANGONE F. Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration in vivo. **Braz J Med Biol Res.**,**22(6):**691-4, 1989.

DAVEY F, HILTON M, DAVIES AM. Cooperation between HGF and CNTF in promoting the survival and growth of sensory and parasympathetic neurons. **Mol. Cell. Neurosci.**, **15(1):**79-87, 2000.

DAVIS S, ALDRICH TH, IP NY, STAL N, SCHERER S, FARRUGGELLA T, DISTEFANO PS, CURTIS R, PANAYOTatOS N, GASCAN H, CHEVALIER S, YANCOPOULOS GD. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. **Science**, 259:1736-1739, 1993a.

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**, 260:1805-1808, 1993b.

DE KONING P, BRAKKEE JH, GISPEN WH. Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function. Beneficial effects of melanocortins. **J Neurol Sci.**, **74(2-3):**237-46, 1986.

DECKWERTH TL, JOHNSON EM JR. Neurotrophic factor deprivation-induced death. **Ann N Y Acad Sci.**, **679:**121-31, 1993.

DEROSSI D, JOLIOT AH, CHASSAING G, PROCHIANTZ A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. **J Biol Chem.**, **269(14):**10444-50, 1994.

DEVOR M, SCHONFELD D, SELTZER Z, WALL PD. Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. **J. Com. Neurol.**, 185:211-220, 1979.

DIETZ GPH, BÄHR M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. **Mol. Cell. Neurosci.**, **27**:85-131, 2004.

DIJKSTRA JR, MEEK MF, ROBISON PH, GRAMSBERGEN A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. **J Neurosci Methods.**, **96(2)**:89-96, 2000. Erratum in: **J Neurosci Methods**, **98(2)**:175, 2000.

DiSTEFANO, PS\_ Neurotrophic factors in the treatment of motor neuron disease and trauma. **Exp Neurol.**, **124(1)**:56-9, 1993.

DITTRICH F, THOENEN H, SENDTNER M. Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. **Ann Neurol.**, **35(2)**:151-63, 1994.

DOBREA GM, UNNERSTALL JR, RAO MS. The expression of CNTF message and immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of the rat. **Dev. Brain Res.**, **66**:209-219, 1992.

DOLCET X, SOLER RM, GOULD TW, EGEA J, OPPENHEIM RW, COMELLA JX. Cytokines promote motoneurons survival through the Janus Kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase pathway. **Mol. Cell Neurosci.**, **18**:619-31, 2001.

DUFF E, BAILE CA. Ciliary neurotrophic factor: a role in obesity? **Nutr. Rev.**, **61(12)**:423-426, 2003.

DUFF E, LI L, HAARTZELL DL, CHOI Y-H, DELLA-FERA MA, BAILE CA. Ciliary neurotrophic factor injected icv induces adipose tissue apoptosis in rats. **Apoptosis**, **9**:629-634, 2004.

ELLIOTT G, O'HARE P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. **Cell.**, **88(2)**:223-33, 1997.

ENGLISH AW. Cytokines, growth factors and sprouting at the neuromuscular junction. **J Neurocytol.**, **32(5-8)**:943-60, 2003.

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**:R185-90, 1996.

ETTINGER MP, LITTLEJOHN TW, SCHWARTZ SL, WEISS SR, MCILWAIN HH, HEYMSFIELD SB, BRAY GA, ROBERTS WG, HEYMAN ER, STAMBLER N, HESHKA S, VICARY C, GULER HP. Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. **JAMA.**, **9;289(14)**:1826-32, 2003. Comment in: **JAMA.**, **9;289(14)**:1763-4, 2003.

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 U S A.**, **91(2)**:664-8, 1994.

FLAIER JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, **166**:337-350, 2004.

FRANKEL AD, PABO CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell.**, **55(6)**:1189-93, 1988.

FRESSINAUD C, VIGNERON I, LETOURNEL F, NICOLAS G, JEAN I, DUBAS F. Cytoskeleton abnormalities in axonopathies of unknown aetiology: correlations with morphometry. **J Neurol Sci.**, **196(1-2)**:53-61, 2002.

FRIEDE RL, BISCHHAUSEN R. How are sheath dimensions affected by axon caliber and internode length? **Brain Res.**, **235(2)**:335-50, 1982.

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

FRIEDMAN B, KLEINFELD D, IP NY, VERGE VM, MOULTON R, BOLAND P, ZLOTCHENKO E, LINDSAY RM, LIU L. BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. **J Neurosci.**, **15(2)**:1044-56, 1995.

FUNAKOSHI H, FRISEN J, BARBANY G, TIMMUSK T, ZACHRISSON O, VERGE VM, PERSSON H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **J Cell Biol.**, **123(2)**:455-65, 1993.

GATZINSKY KP, HOLTSMANN B, DARAIE B, BERTHOLD CH, SENDTNER M. Early onset of degenerative changes at nodes of Ranvier in alpha-motor axons of Cntf null (-/-) mutant mice. **Glia**, **42(4)**:340-9, 2003.

GIRARD J, FERRÉ P, PÉGORIER JP, DUEÉ PH. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. **Physiol. Rev.**, **72(2)**:507-562, 1992.

GLOAGUEN I, COSTA P, DEMARTIS A, LAZZARO D, DI MARCO A, GRAZIANI R, PAONESSAG, CHEN F, ROSENBLUM CI, VAN DER PLOEG LH, CORTESE R, CILIBERTO G, LAUFER R. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94(12)**:6456-61, 1997.

GORDON N. Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. **Brain Dev.**, **17(1)**:73-7, 1995.

GORIO A, VERGANI L, DE TOLLIS A, DI GIULIO AM, TORSELLO A, CATTANEO L, MULLER EE. Muscle reinnervation following neonatal nerve crush. Interactive effects of glycosaminoglycans and insulin-like growth factor-I. **Neuroscience** **82(4)**:1029-37, 1998.

GRAEWIN SJ, KIELY JM, SVATEK CL, PITT HA. Ciliary neurotrophic factor restores gallbladder contractility in leptin-resistant obese diabetic mice. **J. Surg. Res.**, **130**:146-151, 2006.

GREEN M, LOEWENSTEIN PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. **Cell.**, **55(6)**:1179-88, 1988.

GREENSMITH L, VRBOVA G. Motoneurone survival: a functional approach. **Trends Neurosci.**, **19(11)**:450-5, 1996.

GURNEY ME, YAMAMOTO H, KWON Y. Induction of motor neuron sprouting in vivo by ciliary neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor. **J Neurosci.**, **12(8)**:3241-7, 1992.

HAAS CA, HOFMANN HD, KIRSCH M. Expression of CNTF/LIF-receptor components and activation of STAT3 signaling in axotomized facial motoneurons: evidence for a sequential postlesional function of the cytokines. **J. Neurobiol.**, **41(4)**:559-71, 1999.

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)**:145-58, 1992.

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

HARDING DI, GREENSMITH L, CONNOLD AL, VRBOVA G. Stabilizing neuromuscular contacts increases motoneuron survival after neonatal nerve injury in rats. **Neuroscience** **70(3)**:799-805, 1996.

HELGREN ME, SQUINTO SP, DAVIS HL, PARRY DJ, BOULTON TG, HECK CS, ZHU Y, YANCOPOULOS GD, LINDSAY RM, DISTEFANO PS. Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. **Cell.**, **76(3)**:493-504, 1994.

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)**:2632-8, 1994a.

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)**:151-65, 1994b.

HIRUMA S, SHIMIZU T, HURUTA T, SATOU T, HU J, TANJI K, HASHIMOTO S. Ciliary neurotrophic factor immunoreactivity in rat intramuscular nerve during reinnervation through a silicone tube after severing of the rat sciatic nerve. **Exp Mol Pathol.**, **64(1)**:23-30, 1997.

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.

HOFFMAN PN, GRIFFIN JW. The control of axonal caliber. In: **Peripheral Neuropathy**, P. J. Dych et al., 3rd ed., Ed. W. B. Saunders Company – Harcourt Brace Jovanovich, p. 389-402, 1993.

HUANG S, WANG F, HONG G, WAN S, KANG H. Protective effects of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.**, **22(2)**:148-51, 2002.

HUGHES SM, LILLIEN LE, RAFF MC, ROHRER H, SENDTNER M. Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. **Nature.**, **335(6185)**:70-3, 1988.

IJKEMA-PAASSEN J, JANSEN K, GRAMSBERGEN A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. **Biomaterials.**, **25(9)**:1583-92, 2004.

INOUE M, NAKAYAMA C, NOGUCHI H. Activating mechanism of CNTF and related cytokines. **Mol Neurobiol.**, **12(3)**:195-209, 1996.

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.

IP NY, YANCOPOULOS GD. Neurotrophic factors and their receptors. **Prog Brain Res.**, **105**:189-95, 1995.

IP NY, YANCOPOULOS GD. The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. **Annu Rev Neurosci.**, **19**:491-515, 1996.

JIAO J, KAUR N, LU B, REEVES SA, HALVORSEN SW. Initiation and maintenance of CNTF-Jak/Stat signaling in neurons is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors. **Mol. Brain Res.**, **116**:135-46, 2003.

JOHNSON EM Jr, DECKWERTH TL. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. **Annu Rev Neurosci.**, **16**:31-46, 1993.

KASHIHARA Y, KUNO M, MIYATA Y. Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats, and its prevention by peripheral reinnervation **J Physiol.**, **386**:135-48, 1987.

JORDAN CL. Morphological effects of ciliary neurotrophic factor treatment during neuromuscular synapse elimination. **J Neurobiol.**, **31(1)**:29-40, 1996.

KAHN BB, ALQUIER T, CARLING D, HERDIE DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab.**, **1**:15-25, 2005.

KELLEHER MO, MYLES LM, AL-ABRI RK, GLASBY MA. The use of ciliary neurotrophic factor to promote recovery after peripheral nerve injury by delivering it at the site of the cell body. **Acta Neurochir (Wien)**, **148(1)**:55-60; discussion 60-1, 2006.

KILIC U, KILIC E, DIETZ GP, BAHR M. Intravenous TAT-GDNF Is Protective After Focal Cerebral Ischemia in Mice. **Stroke**. May 3, 2003. [epub ahead of print] (manuscripto acessível no endereço <http://stroke.ahajournals.org/cgi/reprint/34/5/1304>).

KIRSCH M, HOFMANN HD. Expression of ciliary neurotrophic factor mRNA and protein in the early postnatal and adult rat nervous system. **Neurosci. Lett.**, **180**: 163-166, 1994.

KORSCHING S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. **J Neurosci.**, **13(7)**:2739-2748, 1993.

KOKOEVA MV, YIN H, FLIER JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. **Science**, **310**:679-683, 2005.

KUNO M. Target dependence of motoneuronal survival: the current status. **J Neurosci Res.**, **9**, 155-172, 1990.

KUO LE, KITLINSKA JB, TILAN JU, LI L, BAKER SB, JOHNSON MD, LEE EW, BURNETT MS, FRICKE ST, KVETNANSKY R, HERZOG H, ZUKOWSKA Z. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med.* 2007 Jul 1, (in print).

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)**:789-92, 1994.

LAMBERT PD, ANDERSON KD, SLEMAN, 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)**:4652-57, 2001.

LANG EM, SCHLEGEL N, REINERS K, HOFMANN GO, SENDTNER M, ASAN E. Single-dose application of CNTF and BDNF improves remyelination of regenerating nerve fibers after C7 ventral root avulsion and replantation. **J Neurotrauma.**, **25(4)**:384-400, 2008.

LANGONE F., REZENDE ACS, ROGÉRIO F., CASTILHO R., PERONI D., SKAPER S.D., NEGRO A. Ciliary Neurotrophic Factor Fused With Protein Transduction Domain Has Neuroprotective Action Without Side Effects. **Soc Neurosci Abstr**, **34**:944.18, 2004.

LEE DA, ZURAWEL RH, WINDEBANK AJ. Ciliary neurotrophic factor expression in Schwann cells is induced by axonal contact. **J Neurochem.**, **65(2)**:564-8, 1995.

LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM. Princípios de Bioquímica. Ed. Sarvier, 2<sup>a</sup> Ed., p. 477-513, 1995.

LEVI-MONTALCINI R. From Turin to Stockholm via St. Louis and Rio de Janeiro. **Science.**, **287(5454)**:809, 2000.

LEWIN GR, BARDE YA. Physiology of the neurotrophins. **Annu Rev Neurosci.**, **19**:289-317, 1996.

LI M, SENDTNER M, SMITH A. Essential function of LIF receptor in motor neurons. **Nature**, **378(6558)**:724-7, 1995.

LILLIEN LE, RAFF MC. Differentiation signals in the CNS: type-2 astrocyte development in vitro as a model system. **Neuron.**, **5(2)**:111-9, 1990.

LILLIEN LE, SENDTNER M, RAFF MC. Extracellular matrix-associated molecules collaborate with ciliary neurotrophic factor to induce type-2 astrocyte development. **J Cell Biol.**, **111(2)**:635-44, 1990.

LIN 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)**:1023-5, 1989.

LINDSAY, RM Specificity, synergy and autocrine roles of the neurotrophins and CNTF. In: LIFE and Death in Nervous System. Eds. Ibáñez CF, Hökfelt T, Olson L, Fuxe K, Jörnvall H, Ottoson D. New York, Pergamon, 1995 (Wenner-Gren International Series, v. 67). p.363-378.

LINDSAY RM, WIEGAND SJ, ALTAR CA, DISTEFANO PS. Neurotrophic factors: from molecule to man. **Trends Neurosci.**, **17(5)**:182-90, 1994.

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.

LO AC, LI L, OPPENCHEIM RW, PREVETTE D, HOUENOU LJ. Ciliary neurotrophic factor promotes the survival of spinal sensory neurons following axotomy but not during the period of programmed cell death. **Exp Neurol.**, **134(1)**:49-55, 1995.

LOWRIE MB, LAWSON SJ. Cell death of spinal interneurons. **Prog Neurobiol.**, **61(6)**:543-55, 2000.

LOWRIE MB, LAVALETTE D, DAVIES CE. Time course of motoneurone death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. **Dev Neurosci.**, **16(5-6)**:279-84, 1994.

LOWRIE, M. B. AND VRBOVA, G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. **Trends Neurosci.**, **15 (03)**: 80-84, 1992.

MACLENNAN AJ, VINSON EN, MARKS L, MCLAURIN DL, PFEIFER M, LEE N. Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha expression in the rat nervous system. **J. Neurosci.**, **16**: 621-630, 1996.

MANTHORPE M, SKAPER SD, WILLIAMS LR, VARON S. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor. **Brain Res.**, **367(1-2)**:282-6, 1986.

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**:R1422-8, 1996.

MATTHYS P, BILLIAU A. Cytokines and cachexia. **Nutrition.**, **13(9)**:763-70, 1997

MAYOR F, CUEZVA JM. Hormonal and metabolic changes in the perinatal period. **Biol Neonate**, **48(4)**:185-96, 1985.

MAZZER PY, BARBIERI CH, MAZZER N, FAZAN VP. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. **J Neurosci Methods.**, **173(2)**:249-58, 2008.

MILLER RG, BRYAN WW, DIETZ MA. Safety, tolerability and pharmacokinetics of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) **Ann Neurol.**, **34**:P241, 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)**:1329-31, 1996.

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)**:256-60, 1996.

MONVILLE C, COULPIER M, CONTI L, DE-FRAJA C, DREYFUS P, FAGES C, Riche D, Tardy M, Cattaneo E, Peschanski M. Ciliary neurotrophic factor may activate mature astrocytes via binding with the leukemia inhibitory factor receptor. *Mol. Cell Neurosci.*, 17(2):373-84, 2001.

MORIS, G & VEGA, J Neurotrophic factors: basis for their clinical applications. *Neurologia.*, 18 (1):18-28, 2003.

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):1449-52, 1998.

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

NEGRO A, CORONA G, BIGON E, MARTINI I, GRANDI C, SKAPER SD, CALLEGARO L. Synthesis, purification, and characterization of human ciliary neurotrophic factor from *E. coli*. *J Neurosci Res.*, 29(2):251-60, 1991a.

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

NEGREDO P, CASTRO J, LAGO N, NAVARRO X, AVENDAÑO C. Differential growth of axons from sensory and motor neurons through a regenerative electrode: a stereological, retrograde tracer, and functional study in the rat. *Neuroscience*, 128:605-615, 2004.

NEHLIG A, DE VASCONCELOS AP. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog. Neurobiol.*, 40:163-221, 1993.

NEUHAUS O, ARCHELOS JJ, HARTUNG HP. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci.*, 24(3):131-8, 2003.

NEWMAN JP, VERITY AN, HAWATMEH S, FEE WE JR, TERRIS DJ. Ciliary neurotrophic factors enhances peripheral nerve regeneration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 122(4):399-403, 1996.

NISHIMUNE H, VASSEUR S, WIESE S, BIRLING MC, HOLTMANN B, SENDTNER M, IOVANNA JL, HENDERSON CE. Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nat Cell Biol.*, 2(12):906-14, 2000.

OLIVEIRA AL, RISLING M, DECKNER M, LINDHOLM T, LANGONE F, CULLHEIM S. Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. *Neuroreport.*, 8(13):2837-40, 1997.

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

OKAMOTO Y, HIGASHIYAMA H, INOUE H, KANEMATSU M, KINOSHITA M, ASANO S. Quantitative image analysis in adipose tissue using an automated image analysis system: Differential effects of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma agonist on white and brown adipose tissue morphology in AKR obese and db/db diabetic mice. **Pathol Int.**, **57(6)**:369-77, 2007.

OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. **Ann. Rev. Neurosci.**, **14**, 453-501, 1991.

OORSCHOT DE, MCLENNAN IS. The trophic requirements of mature motoneurons. **Brain Res.**, **789**:315-321, 1998.

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

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)**:94-9, discussion 99-100, 1997.

PETTMANN B, HENDERSON CE. Neuronal cell death. **Neuron.**, **20(4)**:633-47, 1998.

PRADAT PF. Treatment of peripheral neuropathies with neurotrophic factors: animal models and clinical trials. **Rev Neurol.**, **159(2)**:147-61, 2003.

RAINE CS. Morphology of myelin and myelination. In: MYELIN. Ed. P. Morel. New York, Plenum Press, p. 1-50, 1984.

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

REZENDE ACS, ROGÉRIO F., NEGRO A., LANGONE F. Effect Of CNTF Administered Locally Or Systemically After Sciatic Nerve Lision. XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular e IX Congresso Íbero-Americano de Biologia Celular, w12:152, 2004.

REZENDE ACS. Estudo comparativo da ação neurotrófica do CNTF e TAT-CNTF sobre motoneurônios de ratos neonatos apos axotomia periférica. Campinas, 2005, 73 p.

Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, área de Biologia Celular). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

REZENDE ACS, VIEIRA AS, ROGÉRIO F, REZENDE LF, BOSCHERO AC, NEGRO A, LANGONE F. Effects of systemic administration of ciliary neurotrophic factor on Bax and Bcl-2 proteins in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(11):1024-8, 2008.

REZENDE AC, PERONI D, VIEIRA AS, ROGERIO F, TALAISYS RL, COSTA FTM, LANGONE F, SKAPER SD, NEGRO A. Ciliary neurotrophic factor fused to a protein transduction domain retains full neuroprotective activity in the absence of cytokine/like side effects. *J. Neurochem.*, 2009 *In press*

RICHARDSON PM. Ciliary neurotrophic factor: a review. *Pharmacol Ther.*, **63(2)**:187-98, 1994.

RIGGS JE. Trauma, axonal injury, and amyotrophic lateral sclerosis: a clinical correlate of a neuropharmacologic model. *Clin Neuropharmacol.*, **18(3)**:273-6, 1995.

ROBERT P, PETERSON AC, EYER J. Neurofilament cytoskeleton disruption does not modify accumulation of trophic factor mRNA. *J Neurosci Res.*, **64(5)**:487-92, 2001.

ROGERIO F, DE SOUZA QUEIROZ L, TEIXEIRA SA, OLIVEIRA AL, DE NUCCI G, LANGONE F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. *Brain Res.*, **926(1-2)**:33-41, 2002.

ROSENBERG SS, NG BK, CHAN JR. The quest for remyelination: a new role for neurotrophins and their receptors. *Brain Pathol.*, **16(4)**:288-94, 2006.

RUDGE JS, ALDERSON RF, PASNIKOWSKI E, MCCLAIN J, IP NY, LINDSAY RM. Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *Eur J Neurosci.*, **4(6)**:459-471, 1992.

SAHENK Z, SEHARASEYON J, MENDELL JR. CNTF potentiates peripheral nerve regeneration. *Brain Res.*, **655(1-2)**:246-50, 1994.

SALEHI A, DELCROIX JD, MOBLEY WC. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci.*, **26(2)**:73-80, 2003.

SANGO K, YANAGISAWA H, KOMUTA Y, SI Y, KAWANO H. Neuroprotective properties of ciliary neurotrophic factor for cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem Cell Biol.*, **130(4)**:669-79, 2008.

SBARBATI A, MORRONI M, ZANCANARO C, CINTI S. Rat interscapular brown adipose tissue at different ages: a morphometric study. *Int J Obes.*, **15(9)**:581-7, 1991.

SCHMALBRUCH H. Motoneuron death after sciatic nerve section in newborn rats. **J Comp Neurol.**, **224**:252-258, 1984.

SCHMALBRUCH H. The number of neurons in dorsal root ganglia L4-L6 of the rat. **Anat Rec.**, **219(3)**:315-22, 1987a.

SCHMALBRUCH H. Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in the rat. **Anat Rec.**, **219(3)**:323-9, 1987b.

SCHMALBRUCH H. The effect of peripheral nerve injury on immature motor and sensory neurons and on muscle fibres. Possible relation to the histogenesis of Werdnig-Hoffmann disease. **Rev Neurol.**, **144(11)**:721-9, 1988.

SCHMALBRUCH H. Growth and denervation response of skeletal muscle fibers of newborn rats. **Muscle Nerve.**, **13(5)**:421-32, 1990.

SCHMIDTT FO, BEAR RS. The optical properties of vertebrate nerve axons as related to fiber size. **J. Cell Comp. Physiol.**, **9**:261-73, 1937.

SCHOOLTING H, STOYAN T, ROEB E, HEINRICH PC, ROSE-JOHN S. Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. **FEBS Letters**, **314**:280-284, 1992.

SCHWEIZER U, GUNNERSEN J, KARCH C, WIESE S, HOLTSMANN B, TAKEDA K, AKIRA S, SENDTNER M. Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. **J Cell Biol.**, **156(2)**:287-97, 2002.

SCHWARZE SR, DOWDY SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. **Trends Pharmacol Sci.**, **21(2)**:45-8, 2000.

SCHWARZE SR, HO A, VOCERO-AKBANI A, DOWDY SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. **Science.**, **285(5433)**:1569-72, 1999.

SCHWARZE SR, HRUSKA KA, DOWDY SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? **Trends Cell Biol.**, **10**:290-295, 2000.

SEMKOVA I, KRIEGLSTEIN J. Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. **Brain Res Brain Res Rev.**, **30(2)**:176-88, 1999.

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

SENDTNER M, GOTZ R, HOLTSMANN B, THOENEN H. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. **J Neurosci.**, **17(18)**:6999-7006, 1997.

SENDTNER M, HOLTSMANN B, KOLBECK R, THOENEN H, BARDE YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. **Nature.**, **360(6406)**:757-9, 1992a.

SENDTNER, M., KREUTZBERG, G. W., THOENEN, H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. **Nature.**, **345**:4401, 1990.

SENDTNER M, PEI G, BECK M, SCHWEIZER U, WIESE S. Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. **Cell Tissue Res.**, **301(1)**:71-84, 2000.

SENDTNER M, SCHMALBRUCH H, STOCKLI KA, CARROLL P, KREUTZBERG GW, THOENEN H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. **Nature.**, **358(6386)**:502-4, 1992b.

SENDTNER M, STOCKLI KA, THOENEN H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. **J Cell Biol.**, **118(1)**:139-48, 1992c.

SIEGEL SG, PATTON B, ENGLISH AW. Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. **Exp Neurol.**, **166(2)**:205-12, 2000.

SIMON R, THIER M, KRUTTGEN A, ROSE-JOHN S, WEIERGRABER O, HEINRICH PC SCHRODER JM, Weis J. Human CNTF and related cytokines: effects on DRG neurone survival. **Neuroreport.**, **7(1)**:153-7, 1995.

SLEEMAN MW, ANDERSON KD, LAMBERT PD, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR $\alpha$ . **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, **74**:265-272, 2000.

SLEEMAN MW, GARCIA K, LIU R, MURRAY JD, MALINOVA L, MONCRIEFFE M, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ. Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, **100(24)**:14297-302, 2003.

SMITH GM, RABINOVSKY ED, MCMANAMAN JL, SHINE HD. Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury. **Exp Neurol.**, **121(2)**:239-47, 1993.

STAHL N, YANCOPOULOS GD. The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. **J Neurobiol.**, **25(11)**:1454-66, 1994.

- STANKOFF B, AIGROT MS, NOËL F, WATTILLIAUX A, ZALC B, LUBETZKI C. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. **J Neurosci.**, **22(21)**:9221-7, 2002.
- STOCKLI KA, LILLIEN LE, NAHER-NOE M, BREITFELD G, HUGHES RA, RAFF MC, THOENEN H, SENDTNER M. Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. **J Cell Biol.**, **115(2)**:447-59, 1991.
- STOCKLI KA, LOTTSPREICH F, SENDTNER M, MASIAKOWSKI P, CARROLL P, GOTZ R, LINDHOLM D, THOENEN H. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. **Nature.**, **342(6252)**:920-3, 1989.
- SWETT JE, WIKHOLM RP, BLANKS RHI, SWETT AL, CONLEY LC. Motoneurons of the rat sciatic nerve. **Exp. Neurol.**, **93**:227-252, 1986.
- TAGA T, KISHIMORE T. Cytokine receptors and signal transduction. **FASEB J.**, **6**:3387-3396, 1992.
- 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)**:577-87, 1996.
- TENG FY, TANG BL. Axonal regeneration in adult CNS neurons--signaling molecules and pathways. **J Neurochem.**, **96(6)**:1501-8, 2006.
- THIER M, MÄRZ P, OTTEN U, WEIS J, ROSE-JOHN S. Interleukin-6 (IL-6) and its soluble receptor support survival of sensory neurons. **J Neurosci Res.** **55(4)**:411-22, 1999.
- THOENEN H. The changing scene of neurotrophic factors. **Trends Neurosci.**, **14(5)**:165-70, 1991.
- TODOROVA N, RODZIEWICZ GS. Biotin-dextran: fast retrograde tracing of sciatic nerve motoneurons. **J. Neurosci. Meth.**, **61**:145-150, 1995.
- TOLOSANO E, CUTUFIA MA, HIRSCH E, STEFANUTO G, VOYRON S, FASOLO A, SILENGO L, ALTRUDA F. Ciliary neurotrophic factor constitutively expressed in the nervous system of transgenic mice protects embryonic dorsal root ganglion neurons from apoptosis. **Eur J neurosci.**, **8(3)**: 521-9, 1996.
- ULENKATE HJLM, GISPEN WHG, JENNEKENS FGI. Effects of ciliary neurotrophic factor on retrograde cell reaction after facial nerve crush in young adult rats. **Brain Res.**, **717**:29-37, 1996.
- UNGER RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. **TRENDS Endocrinol. Metab.**, **14(9)**:398-403, 2003.

VANTINI G & SKAPER, SD Neurotrophic factors: from physiology to pharmacology? **Pharmacol Res.**, **26(1)**:1-15, 1992.

VAREJÃO AS, MEEK MF, FERREIRA AJ, PATRÍCIO JA, CABRITA AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **J Neurosci Methods**, **108(1)**:1-9, 2001.

VARON S, MANTHORPE M, ADLER R. Cholinergic neuronotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. **Brain Res.**, **173(1)**:29-45, 1979.

VEJSADA R, SAGOT Y, KATO AC. Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. **Eur J Neurosci.**, **7(1)**:108-15, 1995.

VERGANI L, DI GIULIO AM, LOSA M, ROSSONI G, MULLER EE, GORIO A. Systemic administration of insulin-like growth factor decreases motor neuron cell death and promotes muscle reinnervation. **J Neurosci Res.** **54(6)**:840-7, 1998.

VERGARA C, RAMIREZ B. CNTF, a pleiotropic cytokine: emphasis on its myotrophic role. **Brain Res Brain Res Rev.**, **47(1-3)**:161-73, 2004.

VIEIRA AS, ROGÉRIO F, REZENDE ACS, VELLOSO LA, NEGRO A, LANGONE F. Efeitos da administração intracerebroventricular do TAT-CNTF. **XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE**, 2007.

WATT MJ, DZAMKO N, THOMAS WG, ROSE-JOHN S, ERNST M, CARLING D, KEMP BE, FEBBRAIO MA, STEINBERG GR. CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. **Nat. Med.**, **12(5)**:541-548, 2006.

WAXMAN SG. Structure-function relations in nerve and nerve injuries. In: **Nerve repair and regeneration: its clinical and experimental basis**. Eds. D. L. Jewett, H. R. MacCarroll, Jr. St. Louis, Mosby, p. 186-98, 1980.

WAXMAN SG. Rules governing membrane reorganization and axon-glial interactions during the development of myelinated fibers. **Prog Brain Res.** **71**:121-41, 1987.

WILSON JD, FOSTER DW, KRONENBERG HM, LARSEN PR. Williams Textbook of Endocrinology. Ed. W.B. Saunders Company, 9<sup>a</sup> ed., p.1099-1153, 1998.

WHITESIDE G, DOYLE CA, HUNT SP, MUNGLANI R. Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. **Eur J Neurosci.**, **10(11)**:3400-8, 1998.

WILSON JD, FOSTER DW, KRONENBERG HM, LARSEN PR. Williams Textbook of Endocrinology. Ed. W.B. Saunders Company, 9<sup>a</sup> ed., p.1099-1153, 1998.

WINTER CG, SAOTOME Y, LEVISON SW, HIRSH D. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, **92(13)**:5865-9, 1995.

XU B, DUBE MG, KALRA PS, FARMERIE WG, KAIBARA A, MOLDAWER LL, MARTIN D, KALRA SP. Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotrophic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin. **Endocrinology**, **139(2)**:466-73, 1998.

YAN Q, ELLIOTT JL, MATHESON C, SUN J, ZHANG L, MU X, REX KL, SNIDER WD. Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. **J Neurobiol.**, **24(12)**:1555-77, 1993.

YAN Q, ELLIOTT J, SNIDER WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. **Nature.**, **360(6406)**:753-5, 1992.

YANG E, ZHA J, JOCKEL J, BOISE LH, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. **Cell**, **80(2)**:285-91, 1995.

YUAN Q, WU W, SO KF, CHEUNG AL, PREVETTE DM, OPPENHEIM RW. Effects of neurotrophic factors on motoneuron survival following axonal injury in newborn rats. **Neuroreport.**, **11(10)**:2237, 2000.

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)**:564-70, 1995.

ZHANG J, LINEAWEAVER WC, OSWALD T, CHEN Z, CHEN Z, ZHANG F. Ciliary neurotrophic factor for acceleration of peripheral nerve regeneration: an experimental study. **J Reconstr Microsurg.**, **20(4)**:323-7, 2004.

ZVONIC S, CORNELIUS P, STEWART WC, MYNATT RL, STEPHENS JM. The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. **J. Biol. Chem.**, **278(4)**:2228-35, 2003.

ZVONIC S, BAUGH JE JR, ARBOUR-REILY P, MYNATT RL, STEPHENS JM. Cross-talk among gp130 cytokines in adipocytes. **J Biol Chem.**, **280(40)**:33856-63, 2005.

## DECLARAÇÃO

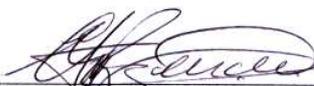
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada “Investigação da ação neuroprotetora do fator neurotrófico ciliar (CNTF) conjugado com peptídeo contendo domínio de translocação de proteína (PTD)”.

( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1851-1).

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº \_\_\_\_\_).



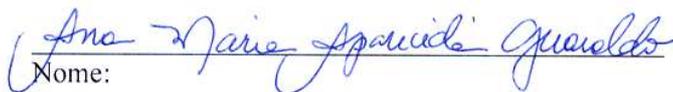
Aluno: Alexandre César Santos de Rezende



Orientador: Profa. Dra. Laurecir Gomes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido



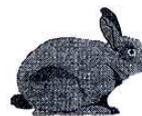
Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEAI/IB - UNICAMP



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

**CERTIFICADO**

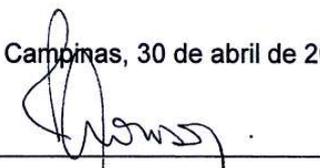
Certificamos que o Protocolo nº 1851-1, sobre "Investigação da ação neuroprotetora do fator neurotrófico ciliar (CNTF) conjugado com peptídeo contendo domínio de translocação de proteína (PTD)", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francesco Langone / Alexandre César Santos de Rezende, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 30 de abril de 2009

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 1851-1, entitled "Investigation of neuroprotective action of ciliary neurotrophic factor (CNTF) fused to a protein transduction domain (PTD)", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on April 30, 2009

Campinas, 30 de abril de 2009.

  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

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