INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CNTF E DA leptina SOBRE A GORDURA MARROM DE RATOS NEONATOS: ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS ADIPÓCITOS E DA EXPRESSÃO DA UCP1.

UNICAMP

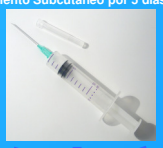
[1]Ignarro, R. S. ; [1]Vieira, A. S. ; [1]Rezende, A. C. S. ; [1] Facchini, G. ; [1]Furuzawa, K. M. ; [1]Sartori C. R. ; [1]Langone, F. [1]Departamento de Fisiologia e Biofísica, UNICAMP.

INTRODUÇÃO

Além de sua reconhecida ação neuroprotetora, o fator neurotrófico ciliar (CNTF) tem a capacidade de atuar sobre o metabolismo energético (1, 2, 10,11). Esta propriedade do CNTF tem atraído grande interesse em virtude da similaridade de seus efeitos com aqueles produzidos pelo hormônio leptina sobre o comportamento alimentar e a manutenção do peso corpóreo (12). Em camundongos obesos da linhagem ob/ob, que não produzem a forma funcional da leptina, bem como em camundongos da linhagem db/db, cujo receptor para a leptina não é funcional, o tratamento com CNTF é capaz de induzir perda de massa corpórea (4). Recentemente, verificou-se que o CNTF também é capaz atuar sobre os mecanismos responsáveis pela termogênese dependente do metabolismo da gordura marrom (GM) (2,7). A aplicação subcutânea de CNTF em camundongos adultos que apresentavam obesidade induzida por dieta levou a um aumento da expressão da proteína desacopladora mitocondrial UCP1 na gordura marrom (2). Contudo, ainda não se conhece o mecanismo pelo qual o CNTF aumenta a expressão da UCP1 nesse tecido. Quanto à leptina, sabe-se que sua capacidade de aumentar a expressão gênica da UCP1 é dependente de inervação simpática da gordura marrom (9). Recentemente, verificamos em nosso laboratório que o tratamento com CNTF reduziu a quantidade de lipídeos nos adipócitos da gordura marrom e o crescimento corporal de ratos neonatos (8). Outros autores observaram que o tratamento desses animais com leptina também reduziu seu crescimento corporal (13). Contudo, não se sabe se tais efeitos estão relacionados com possíveis alterações da expressão da UCP1 na gordura marrom dos ratos neonatos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a expressão da UCP1 durante o tratamento desses animais com CNTF ou leptina.

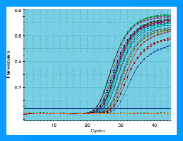
MATERIAIS E MÉTODOS

Tratamento Subcutâneo por 5 dias (P2-P7)



CNTF 0,25 µg/g/dia | PBS | leptina 0,3 µg/g/dia

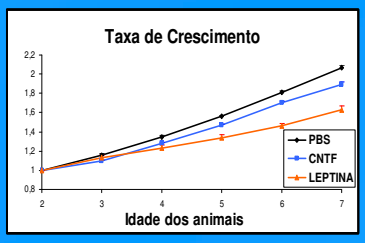
Gordura Marrom Interescapular



Análise Histológica, Western Blot para UCP-1 e Real-Time PCR (mRNA UCP1)

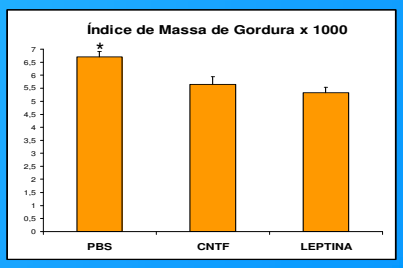
RESULTADOS

Efeito dos tratamentos sobre o crescimento dos animais



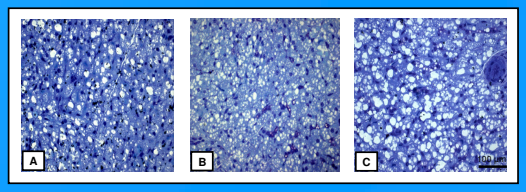
O acompanhamento do crescimento dos animais entre P2 e P7 mostrou que os ratos tratados subcutaneamente com CNTF tiveram um ganho de peso significativamente maior que os tratados com leptina e menor que os animais do grupo controle (PBS). O crescimento dos animais do grupo CNTF começou a apresentar diferença significativa em relação ao grupo controle na idade P4 (p<0,01). Tal diferença se manteve até a idade P6 e aumentou na idade P7 (p<0,001). Por sua vez, os animais do grupo tratado com leptina também exibiram menor crescimento corporal a partir da idade P4, quando comparados ao grupo controle (p<0,001). Além disso, a partir da idade de P5, o peso corporal dos animais tratados com leptina foi significativamente inferior ao dos animais tratados com CNTF (p<0,001). Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

Efeito dos tratamentos sobre o Índice de Massa de Gordura



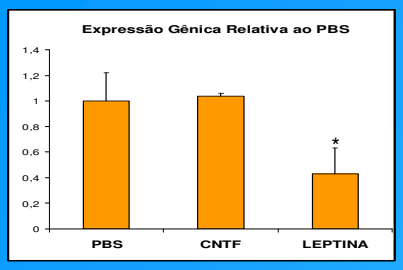
A análise do índice de massa de gordura (GMIi) na idade P7, definido como sendo o cociente entre peso da gordura marrom (PG) e peso corporal (PC), não evidenciou diferenças entre os grupos tratados com CNTF ou leptina (0,0056±0,0003 e 0,0053±0,0002, respectivamente; p>0,05). Por outro lado, ambos os grupos apresentaram GMIi significativamente menor que os animais do grupo controle (0,0067±0,0002;p<0,01), (média±e.p.m.; * p<0,01). Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

Análise morfológica dos adipócitos



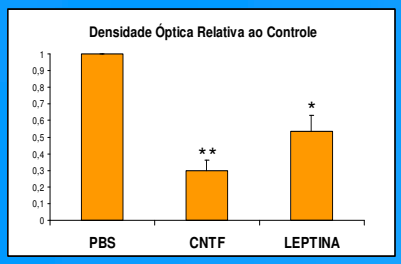
A análise histológica da gordura marrom interescapular evidenciou que nos animais tratados com CNTF (Figura A) ou leptina (Figura B) durante 5 dias (P2-P7) houve redução do tamanho das vesículas lipídicas dos adipócitos, quando comparado ao observado nos animais controle (Figura C). Nestes últimos, todos os adipócitos apresentaram vesículas lipídicas de tamanho grande, médio ou pequeno, com predominância dos dois primeiros; sendo sua distribuição relativamente homogênea no tecido. Nos animais tratados com CNTF predominavam os adipócitos contendo vesículas médias. Estes se distribuíam de maneira não homogênea no tecido. Além disso, pôde ser observada grande quantidade de adipócitos contendo vesículas lipídicas muito pequenas, ou mesmo destituídos delas. Por sua vez, nos animais tratados com leptina, predominavam os adipócitos de tamanho médio, com distribuição mais homogênea quando comparada ao observado no grupo CNTF. Ainda, diversamente deste último grupo, nos animais que receberam leptina foram observados poucos adipócitos com depleção total de lipídeos. Barra=100µm.

Real-Time PCR



Os resultados do real-time PCR mostraram que houve redução significativa da expressão gênica da UCP1 nos animais tratados com leptina em relação aos animais controle (0,4286±0,12; p<0,01). Além disso, não foi encontrada diferença significativa comparando-se os animais tratados com CNTF ao grupo PBS (1,038±0,01; p>0,05). Asterisco indica diferença significativa: * p<0,01. Análise estatística: teste *t* pareado comparando-se o grupo controle aos demais grupos.

Análise da Expressão de UCP1 por Western Blot



Expressão da UCP1 após 5 dias de tratamento s.c. com PBS, CNTF ou leptina. Os valores correspondem à densidade óptica obtida da expressão da UCP1 dividida pela densidade óptica do controle (PBS) (média±e.p.m). Foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo CNTF (0,2993±0,0613; p<0,0003). Do mesmo modo, o tratamento com leptina (0,5344±0,0957; p<0,0082) também diminuiu a expressão da UCP1 em relação aos animais do grupo controle. Asterisco indica diferença significativa: ** p<0,0003, * p<0,0082. Análise estatística: teste *t* pareado comparando-se o grupo controle aos demais grupos.

RESUMO

O Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF) tem reconhecida ação neuroprotetora sobre motoneurônios. Porém, testes clínicos em portadores de esclerose lateral amiotrófica verificaram efeitos colaterais importantes, como a redução do peso corporal. Sendo este efeito similar ao produzido pela leptina (LEP), cresceu o interesse por sua ação no tecido adiposo. Sabe-se que CNTF e LEP estimulam a capacidade termogênica do tecido adiposo marrom pelo aumento da expressão da proteína UCP1 em ratos adultos. Contudo, há poucos estudos sobre a ação destas moléculas na expressão de UCP1 em ratos neonatos. Este estudo investigou o efeito do tratamento com CNTF e LEP sobre a expressão da UCP1 na gordura marrom desses animais. Ratos Wistar neonatos (P2) foram tratados por 5 dias com dose diária (s.c.) de CNTF (0,25 µg/g; n=13), LEP (0,30 µg/g; n=11) ou PBS (n=11). O peso corporal (pC) foi verificado diariamente e 24hs após a última dose (P7) a gordura marrom interescapular (GMI) foi coletada e pesada (pGM) para obtenção do índice de gordura marrom (GMIi=pGM/pC). Foi realizada a análise da histologia e da expressão da UCP1, por Western Blot, neste tecido. Os ratos tratados com CNTF ou LEP tiveram ganho de peso corporal (P2 a P7) inferior ao dos controles. Em P7, ratos tratados com CNTF, LEP ou PBS tiveram taxas de crescimento de 1,89±0,03; 1,63±0,04 e 2,07±0,02 (média±epm; p<0,001), respectivamente. O GMIi também foi inferior nos grupos CNTF (5,6±0,3) e LEP (5,3±0,2) quando comparados ao grupo PBS (6,7±0,2; p<0,01). A histologia da GMI corroborou estes resultados ao evidenciar redução das vesículas lipídicas nos grupos CNTF e LEP em comparação ao controle. Por sua vez, ambos os tratamentos reduziram a expressão protéica de UCP1 (CNTF 0,30±0,06; LEP 0,53±0,10; Densidade Óptica Relativa ao PBS; p<0,0003 e p<0,0082, respectivamente). No que se refere à expressão gênica, verificou-se que a LEP diminuiu a expressão de UCP1 (0,4286±0,12; p<0,01) em relação aos animais controle (PBS), ao passo que o CNTF não a alterou significativamente (1,038±0,01; p>0,05). Sabe-se que em ratos neonatos há uma redução da expressão de mRNA UCP1 a partir do nascimento. Embora não tenha sido demonstrado, o mesmo deve ocorrer com a expressão da proteína. Nossos resultados sugerem que a administração de CNTF e LEP acelerou este processo, pelo menos com relação à proteína. Além disso, a redução da proteína UCP1 nos animais neonatos pode não depender apenas da redução da transcrição do seu mRNA, mas também de mecanismos de regulação pós-traducionais, como o sistema proteossomo-ubiquitina. Neste sentido, uma hipótese plausível é a de que em virtude da importância da gordura marrom para a termogênese em ratos neonatos, exista neste tecido um mecanismo de controle da quantidade de gordura estocada, que depende da regulação da quantidade de UCP1.

CONCLUSÕES E HIPÓTESES

- Ambos os tratamentos provocaram diminuição do crescimento corporal e da massa da gordura marrom em relação ao grupo controle (PBS).

- Interessantemente, o CNTF e a leptina não induziram aumento de expressão gênica e protéica de UCP1 como observado em roedores adultos (2, 3, 9).

- A redução da expressão gênica de UCP1 causada pela leptina foi acompanhada de queda da quantidade de proteína. O mesmo não ocorreu com o CNTF, pois a redução na expressão da proteína UCP1 por Western Blot não foi acompanhada de diminuição na expressão gênica.

- Sendo assim, a redução da UCP1 nos animais neonatos não depende apenas da diminuição da transcrição do seu mRNA, mas devem existir mecanismos de regulação pós-traducionais sobre os quais o CNTF e a leptina parecem ter atuado. Neste sentido, ambos os tratamentos podem ter ativado o sistema proteassomo-ubiquitina (5,6), que estaria envolvido na degradação de UCP1.

- Portanto, em virtude da importância do tecido adiposo marrom para a termogênese em ratos neonatos, pode existir neste tecido um mecanismo de controle da quantidade de gordura estocada, que depende da regulação da quantidade de UCP1.

REFERÊNCIAS

1. ADLER R., LANDA K.B., MANTHORPE M., VARON S. Cholinergic neurotrophic factors: intracellular distribution of soluble trophic activity for ciliary neurons. Science. (204):1434–1436, 1979. 2. BLÜHER S., MOSCHOS S., BULLEN J., KÖKKOTOU E., MAÑATOS-FLIER E., WIEGAND S. J., SLEEMAN M. W., MANTZOROS C. S. Ciliary neurotrophic factor×A15 alters energy homeostasis, decreases body weight, and improves metabolic control in diet-induced obese and UCP-DTA mice. Diabetes 53 (11): 2787-2796. 2004. 3. COMMINS S. P., WATSON P. M., PADGETT M. A., DUDLEY A., ARGYROPOULOS G., GETTYS T. W. Induction of Uncoupling Protein Expression in Brown and White Adipose Tissue by Leptin. Endocrinology (140): 292-300. 1999. 4. CLOAGUEN I., COSTA P., DEMARTIS A., LAZZARO D., MARCO A.D., GRAZIANI R., PACNESSA G., CHEN F., ROSENBLUM C.I., VAN DER PLOEG L.H.T., 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): 6456–6461, 1997. 5. JHO D.H., ENGELHARD H.H., GANDHI R., CHAO J., BABOOR T., ONG E., ESPAT N. J. Ciliary neurotrophic factor upregulates ubiquitin-proteasome components in a rat model of neuronal injury. Cytokine 27: 142-151, 2004. 6. MAYR, R.H. CHEUNG W. Cachexia in chronic kidney disease: role of inflammation and neuropeptide signaling. Current Opinion in Nephrology & Hypertension 16 (1):27-31, 2007. 7. OTT V., FASSHAUER M., DALSKI K., KLEIN H. H., 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):R1-6, 2002. 8. REZENDE A. C. S. Estudo comparativo da ação neurotrófica do CNTF e TAT-CNTF sobre motoneurônios de ratos neonatos após axotomia periférica. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, área de Biologia Celular), Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 2005. 9. SCARPACE P. J., MATHEW M. Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. Am. J. Physiol (275): E259-E264, 1998. 10. SENDTNER M., KREUTZBERG, G.W., THOENEN H., Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. Nature (345): 440-441, 1990. 11. SENDTNER M., SCHMALBRUCH H., STOCKLI K.A., CARROLL P., KREUTZBERG G.W., THOENEN H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. Nature 358 (6386):502-504, 1992a. 12. XU B., DUSE M.D., KALRA P.S., FARMERE W.D., HASSAN A., MOLDAWER L.L., MARTIN D. KALRA S.P. Anorectic Effects of the Cytokine, Ciliary Neurotrophic Factor, are Mediated by hypothalamic Neuropeptide Y: Comparison with Leptin. Endocrinology 139 (2):466-473,1998. 13. YUAN C.-S., ATTELE A. S., ZHANG L., LYNCH J. P., XIE J.-T., SHI Z. Q. Leptin reduces body weight gain in neonatal rats. Pediatric Research (48):380-383, 2000.

Apoio Financeiro: CNPq FAPESP