DANIELLA SABINO BATAGELLO

**DISTRIBUIÇÃO DOS NEURÔNIOS E CAMPOS
TERMINAIS QUE EXPRESSAM A UROCORTINA 3 NO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE PRIMATA NÃO-
HUMANO (*Cebus apella*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

DANIELLA SABINO BATAGELLO

**DISTRIBUIÇÃO DOS NEURÔNIOS E CAMPOS TERMINAIS
QUE EXPRESSAM A UROCORTINA 3 NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE PRIMATA NÃO-HUMANO
(*Cebus apella*)**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais
Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt
Versão corrigida. Versão original encontra-se no
Serviço de Comunicação do ICB

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Batagello, Daniella Sabino.

Distribuição dos neurônios e campos terminais que expressam a urocortina 3 no sistema nervoso central de primata não-humano (*Cebus apella*) / Daniella Sabino Batagello. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Organização anatômica e funcional no sistema nervoso central de mamíferos de neuropeptídeos e/ou hormônios.

Versão do título para o inglês: Distribution of neurons and terminal fields that express the urocortin 3 in the central nervous system of primate non-human (*Cebus apella*).

Descritores: 1. Hipotálamo 2. Neuropeptídeos 3. Macacos-prego 4. CRH 5. Neuroanatomia 6. Primatas I. Bittencourt, Prof. Dr. Jackson Cioni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0214/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniella Sabino Batagello.

Título da Dissertação: Distribuição dos neurônios e campos terminais que expressam a urocortina 3 no sistema nervoso central de primata não-humano (*Cebus apella*).

Orientador(a): Prof. Dr.Jackson Cioni Bittencourt.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: usp@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **40** nas fls. **69** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Jackson Cioni Bittencourt, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Distribuição da Urocortina 3 no sistema nervoso central de primata (Cebus apella)** do qual participou(aram) o(s) alunos **Daniella Sabino Batagello**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **28.04.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 29 de abril de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

NÚCLEO DE PROCRIAÇÃO DE MACACOS-PREGO
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
Departamento de Ciências Básicas

DECLARAÇÃO

Declaro, para todos os fins, que o Núcleo de Procriação de Macacos-Prego do Departamento de Ciências Básicas desta Faculdade, analisou e autorizou o desenvolvimento do projeto de pesquisa “Distribuição da urocortina 3 (UCN 3) no sistema nervoso central de primata (*Cebus apella*)”, sob a responsabilidade da C.D. Daniella Sabino Batagello, sob orientação do Prof. Dr. Jackson C. Bittencourt, por estar de acordo com as normas de cessão de macacos, de que trata a Portaria FOA 087/95. Acrescento que os encéfalos foram removidos de animais já utilizados em pesquisa desenvolvida anteriormente, cujo parecer favorável foi emitido por este Núcleo.

A manipulação dos animais seguiu o protocolo de rotina empregado neste Núcleo, com os seguintes procedimentos:

1) Captura e Anestesia: os macacos foram capturados das gaiolas individuais, pré-anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (10 mg/Kg peso corporal) e anestesiados através de uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico (30 mg/quilograma de peso corporal). Injeção intramuscular de diazepínico, na dosagem de 0,3 mg/ quilograma de peso corporal, complementou os procedimentos de anestesia.

2) Sacrifício e perfusão: os mesmos procedimentos para captura e anestesia e perfusão via intracardiaca de líquidos fixadores por meio de uma bomba peristáltica.

Informamos que este Núcleo atende às disposições básicas contidas no “Guide to the Care and Use of Experimental Animals”, vols 1 e 2, do Canadian Council on Animal Care, bem como a normativas dispostas na Portaria 016/94 do IBAMA.

Araçatuba, 01 de julho de 2008.

José Américo de Oliveira
Responsável pelo
Núcleo de Procriação de Macacos-Prego do
Departamento de Ciências Básicas da
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
UNESP

À Deus, que se faz presente em cada passo que tenho realizado durante toda a minha vida, mostrando que cada dia vivido é um milagre, que posso realizar meus sonhos, e que sem Fé e Perseverança nada é possível.

À Jesus, instrumento de Deus para chegar ao Pai, por ter ouvido sempre minhas preces e tornado minhas angústias e incertezas em paz e realizações.

Aos meus queridos e amados pais, Meu Pai Pedro, Minha Mãe Iza. Nada teria sido possível sem sua proteção, carinho, cuidados, dedicação, incentivos e Amor. São exemplos de Dedicação e Amor à Família, um amor incondicional que foi e sempre será a base de nossa família.

Ao meu querido e amado irmão, Carlos. Palavras seriam poucas para agradecer por todo apoio, carinho, amor, ensinamentos, a me fazer entender e compreender a vida de uma maneira mais clara. Tenho a certeza de que Deus te enviou para ser meu anjo da guarda quando nossos pais não estão tão por perto!

Obrigada por estar sempre comigo!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Jackson Cioni Bittencourt, por ter me recebido tão bem em seu laboratório; por ter proporcionado a oportunidade da realização deste estudo; por toda doação de seu tempo, conhecimento e orientação, e principalmente, por acreditar que eu pudesse realizar este trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos ao Professor Doutor José Américo de Oliveira, um mestre que tive a honra de conhecer durante minha graduação na Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP. Sem seus ensinamentos em Anatomia, durante meu primeiro ano de graduação, e posteriormente a inestimável colaboração através do Núcleo de Procriação de Macacos-Prego, este trabalho nunca poderia ter sido realizado.

Ao Professor Doutor Cláudio Aparecido Casatti e ao Professor Doutor Edilson Ervolino, pelo incentivo ao início da carreira científica na Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP. Obrigada por toda orientação, paciência, atenção, prestatividade, conhecimento e sabedoria ao ensinar e proporcionar oportunidades de aprendizado futuras.

Ao Professor Doutor Renato Paulo Chopard, por cada orientação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), exemplo de dedicação, paciência e sabedoria.

À Professora Doutora Luciane Valéria Sita, por cada orientação solicitada, por cada dúvida respondida, por ter estado sempre presente quando mais precisei, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Professor Paulo Laino Cândido, por toda prestatividade, atenção e inestimável ajuda quando da padronização da reação imuno-histoquímica, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Wylie Vale (*in memoriam*) e Dra. Joan Vaughan, Salk Institute for Biological Studies”, La Jolla, Califórnia – EUA, pela gentileza em nos fornecer o anticorpo anti-UCN 3, dentre outros reagentes, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Jean Rivier, "Salk Institute for Biological Studies”, La Jolla, Califórnia – EUA, pela gentileza em nos fornecer os peptídeos da família CRF, imprescindíveis para nosso estudo.

Ao Professor Doutor Luiz Roberto Georgetti Britto pelos ensinamentos em neurofisiologia e pelas consideráveis sugestões a este trabalho.

À Professora Doutora Maria Tereza Nunes pela gentileza e prestatividade ao nos fornecer o anticorpo anti-insulina, sem o qual não poderíamos ter respondido a um dos objetivos desse trabalho.

A todos os Docentes do Departamento de Anatomia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, cada qual com seu exemplo, nortearam meus passos no Estudo da Anatomia.

As Secretarias de Pós-graduação e Graduação pela constante prestatividade, prontidão e eficiência ao fornecer todos os documentos e pedidos solicitados, em especial à Patrícia Rocha.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia, cada qual com sua função, me auxiliaram durante a minha permanência nessa Instituição, em especial ao setor de limpeza e de segurança do Departamento de Anatomia, que nos proporcionam um ambiente agradável e seguro.

A todos os Docentes da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP, em especial aos docentes do Departamento de Ciências Básicas.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências Básicas, em especial ao do Núcleo de Procriação de Macacos-prego, o Senhor Junqueira e Senhor Arnaldo, meus mais sinceros agradecimentos.

A todos os funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas pela constante ajuda, prestatividade e carinho em todas as vezes que precisei.

A todos os discentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia, que proporcionaram um ótimo convívio e momentos de alegria.

Às minhas queridas amigas, as presentes e as que, mesmo distantes, estiveram sempre comigo, provando que “a distância não separa amigos”, e que a amizade se revela quando menos se espera, mas permanece por se basear na confiança mútua e por laços invisíveis aos olhos, que jamais se desfazem, em especial: Patrícia Ide Franzini, Kelly Regina Torres, Cíntia Mukai e Sílvia Honda Takada.

Aos meus estimados colegas de laboratório e departamento, pela constante convivência, aprendizado, paciência e doação: André Valério da Silva, Adriano Polican Ciena, Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle, Débora Nunes Martins Bueno, Fernando Vale, Helder Cravo da Costa, Leila Maria Guissoni Campos, Livia Clemente, Mike Yoshio Hamasaki e Renata Juliana da Silva.

À supervisão técnica, imprescindível, de Joelcimar Martins da Silva. Minha eterna gratidão pelos ensinamentos teóricos e técnicos, pela prestatividade e dedicação a tornar esse trabalho possível, a doar muitas vezes mais do que eu esperava receber.

À supervisão técnica de Amanda Ribeiro de Oliveira, meus mais sinceros agradecimentos por toda ajuda durante a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas, e ao Departamento de Anatomia pela oportunidade da realização deste estudo.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial ao Departamento de Ciências Básicas e ao Núcleo de Procriação de Macacos-prego, colaboração esta que foi imprescindível para este projeto.

Aos primatas não-humanos que são parte principal desse estudo, sem os quais não existiriam meios para realizar este trabalho.

À Coordenadoria do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

À FAPESP, pela concessão da Bolsa de Mestrado, auxílio este que permitiu minha dedicação exclusiva ao estudo (Processo Fapesp 2009/06769-9).

Ao Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) pela oportunidade de realização dos estágios PAE durante meu Mestrado, bem como eu ter realizado esses estágios na condição de Bolsista PAE.

À CAPES pelos incentivos ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais.

À todos, que de forma direta ou indireta, me ajudaram a concretizar as ideias e experimentos deste estudo em resultados efetivos, contribuindo para que se tornasse possível essa pós-graduação.

"Se seus sonhos estiverem alinhados com a sua fé, coisas inexplicáveis e inesquecíveis vão acontecer."

(Diego Eboli)

RESUMO

Batagello DS. Distribuição dos neurônios e campos terminais que expressam a Urocortina 3 no Sistema Nervoso Central de Primata não-humano (*Cebus apella*). [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A urocortina 3 (UCN 3) é um neuropeptídeo pertencente a família de peptídeos do fator liberador de corticotrofina (CRF), com seletividade de ligação a receptor CRF₂. Estudos imuno-histoquímicos e de hibridização *in situ* realizados em roedores relatam neurônios UCN 3 localizados em restritas regiões do sistema nervoso central (SNC) como no núcleo pré-óptico mediano, área perifornical rostral e na região entre o fornix e o núcleo paraventricular do hipotálamo em seu nível médio. Locais extra-hipotalâmicos de expressão do RNAm da UCN 3 são o núcleo medial da amígdala e núcleo paraolivar superior. Os campos terminais imunorreativos a UCN 3 (UCN 3-ir) estão distribuídos em regiões que mais se colocam com a expressão do RNAm de CRF₂. Assim, esses dados sugerem que a UCN 3 possa participar do controle neuroendócrino e da ingestão alimentar, entretanto, mapeamento não foi realizado em modelo do SNC de primata não-humano. A fim de compreender melhor o papel desse neuropeptídeo em modelo de mamífero, o objetivo do presente estudo é realizar o mapeamento da distribuição da UCN 3 no sistema nervoso central do primata não-humano (*Cebus apella*). Foram utilizados macacos adultos jovens da espécie *Cebus apella* (n=6) cujas séries de cortes (40µm) foram submetidas aos métodos de imuno-histoquímicas; hibridização *in situ*, e métodos de coloração de Nissl e hematoxilina-eosina. Células UCN 3 se localizam nas seguintes regiões: núcleo pré-óptico mediano, núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo periventricular do hipotálamo, parte justaparaventricular do hipotálamo lateral, núcleo supra-óptico, parte medial do núcleo amigdalóide central, núcleos intralaminares do tálamo e giro denteado da formação hipocampal. Fibras e campos terminais UCN 3-ir se localizam principalmente em: área pré-óptica medial, núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo ventromedial do hipotálamo, núcleo septal lateral e núcleo arqueado. Houve colocação entre células UCN 3/CRF-ir no PaMD, e em células β imunorreativas para UCN 3/insulina. Nossos resultados corroboram que os locais que apresentaram células imunorreativas e/ou que expressam o RNAm da UCN 3, bem como as fibras UCN 3-ir no nosso modelo experimental de primata estão localizados principalmente em regiões hipotalâmicas, amigdalóides e límbicas e, há colocação entre células UCN 3/CRF no PaV e células β imunorreativas a UCN 3/insulina no pâncreas.

Palavras-chave: Macaco-prego. Fator liberador de corticotrofina. Neuropeptídeos. Hipotálamo.

ABSTRACT

Batagello DS. Distribution of neurons and terminal fields that express the Urocortin 3 in the Central Nervous Systems of Primate non-human (*Cebus apella*). [Masters Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2011.

Urocortin 3 (UCN 3) is a neuropeptide with 38-aa and member of the corticotropin-releasing factor (CRF) peptide family, it is a selective agonist for the CRF₂ receptor. Immunohistochemical and *in situ* hybridization performed in rodents showed containing- neurons found in discrete regions of the central nervous system (CNS) such as the median preoptic nucleus, the rostral perifornical area and in the region between the fornix and the paraventricular nucleus of the hypothalamus at the mid level of it. The extrahypothalamic sites of UCN 3 mRNA expression are the medial nucleus of the amygdala and the superior paraolivary nucleus. The immunoreactive (UCN 3-ir) terminals are distributed to regions that mostly overlap the CRF₂ mRNA expression. Therefore, these data suggest that UCN 3 would participate in the food intake and neuroendocrine controls. However, such mapping was not done in a non-human primate CNS model. In order to better understand such neuropeptide role in a mammalian model we proposed to study the UCN 3 distribution in the brain of a monkey. *Cebus apella* species (n=6), weighing 2200-2700 g. After the perfusion and cutting the brain and spinal cord in a freezing microtome, series of frontal sections (40 µm) were subjected to immunohistochemistry techniques; *in situ* hybridization, Nissl and Hematoxylin-eosin staining. The UCN 3 cells were found in the following regions: median preoptic nucleus, hypothalamic paraventricular nucleus, hypothalamic periventricular nucleus, juxtaparaventricular part of lateral hypothalamus, supra-optic nucleus, medial part of central amigdaloid nucleus, intralaminar nuclei of the thalamus and dentate gyrus of hippocampal formation. UCN 3-ir fibers and terminals were localized mainly in: medial preoptic area, hypothalamic paraventricular nucleus, ventromedial nucleus of the hypothalamus, lateral septum nucleus, and in the arcuate nucleus. We have found double-labeled cells (CRF/UCN 3) in the PaMD and, in β cells (UCN 3/insulin) of pancreas. Our results support that the sites that showed immunoreactive cells and/or which express the mRNA of UCN 3, and UCN 3 fibers in our experimental model of primate (*Cebus apella*) are located mainly in hypothalamic, amygdaloid and limbic sites and, there is colocalization between UCN 3/CRF cells in PaV and UCN 3/insulin β cells of pancreas.

Key-words: Capuchin-monkey. Corticotropin-releasing factor. Neuropeptides. Hypothalamus .

LISTA DE ABREVIATURAS

3V - terceiro ventrículo	LV – ventrículo lateral
AA – área hipotalâmica anterior	Me – núcleo amigdalóide medial
AHi – área amígdalo-hipocampal	ME – eminência mediana
AHiPC – parte parvocelular da AHi	MHb – núcleo habenular medial
AMPO – área pré-óptica antero-medial	MnPO – núcleo pré-óptico mediano
Arc - núcleo arqueado	MPA – área pré-óptica medial
ac – comissura anterior	MS – núcleo septal medial
acp – comissura anterior, parte posterior	opt - trato óptico
BMCC – parte magnocelular do núcleo amigdalóide basomedial	ox – quiasma óptico
CA4 – camada A4 do hipocampo	PAG – substância cinzenta periaquedutal
Cd – núcleo caudado	PaMD – parte magnocelular dorsal do PaV
CeM – parte medial núcleo amigdalóide central	PaPD – parte parvocelular dorsal do PaV
CL – núcleo centro-lateral do tálamo	PaPV – parte parvocelular ventral do PaV
CM – núcleo centro-medial do tálamo	PaV – núcleo paraventricular do hipotálamo
CoV – núcleo cortical da amígdala	PC – núcleo paracentral do tálamo
cp – pedúnculo cerebral	Pe – núcleo hipotalâmico periventricular
CRF – fator liberador de corticotrofina	PVA – núcleo paraventricular do tálamo
fx – fórnice	PFA – área perifornical rostral
GrDG – giro denteado da formação hipocampal	SCh – núcleo supraquiasmático
icv – intracerebroventricular	SFi – núcleo do septo fimbrial
ic – cápsula interna	SHi – núcleo septo-hipocampal
JPLH – parte justaparaventricular do hipotálamo lateral	SI – substância inominata
ko/UCN 3 – camundongo knockout UCN 3	SN – substância negra
LH – área hipotalâmica lateral	SO - núcleo supra-óptico
LHb – núcleo habenular lateral	Sol – núcleo do trato solitário
LPAG – parte lateral da PAG	sox – decussação supra-óptica
LPO – área pré-óptica lateral	Sp5C – parte caudal, núcleo do trato espinal do trigêmeo
LS – núcleo septal lateral	st – estria terminal
LSi – parte intermédia do LS	ST – núcleo intersticial da estria terminal
LTu – núcleo tuberal lateral do hipotálamo	

STLD – parte dorsal, divisão lateral do ST

STMA – núcleo intersticial da estria terminal,
parte anterior

STMV - núcleo intersticial da estria terminal,
parte ventral

UCN 1 – urocortina 1

UCN 3 urocortina 3

v - veia

VCo – núcleo cortical da amígdala

VLPAG – parte ventrolateral da PAG

VMH - núcleo ventromedial do hipotálamo

VMHDM – parte dorsomedial do VMH

VMHVL – parte ventrolateral do VMH

wt/UCN 3 – camundongo wild type UCN 3

LISTA DE SÍMBOLOS

Aminoácidos

Ácido aspártico	D
Ácido glutâmico	E
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Glicina	G
Glutamina	Q
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Prolina	P
Serina	S
Tirosina-ácido aspártico	Y/D
Tirosina	Y
Treonina	T
Valina	V

Bases nitrogenadas dos nucleotídeos

Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Anticorpos primários utilizados neste estudo para as reações imuno-histoquímica ... 39

Tabela 2 - Peptídeos utilizados neste estudo para as reações imuno-histoquímicas durante o teste de adsorção..... 39

Tabela 3 - Características de competição da UCN 3 no sistema nervoso central de primata não-humano (*Cebus apella*) após realização da técnica de adsorção seguida de imunoperoxidase indireta para UCN 3 na concentração de 1:7000 em cortes do nível do paraventricular do hipotálamo (PaV)..... 68

Tabela 4 - Resumo da distribuição dos neurônios e fibras UCN 3-ir, e os neurônios que expressam o RNAm da UCN 3 no sistema nervoso central de *Cebus apella* após ser realizada técnica de imunoperoxidase indireta..... 100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel de eletroforese com o DNAC da UCN 3 de <i>Cebus apella</i>	55
Figura 2 - Mapa da sonda de RNAC da UCN 3 de primata não-humano (<i>Cebus apella</i>)	57
Figura 3 - Análise da identidade da UCN 3 de <i>Cebus apella</i> com as sequências de rato e humano, após o uso do software BLAST.....	58
Figura 4 - Estrutura do prepro-hormônio UCN 3 de <i>Cebus apella</i>	62
Figura 5 – Fotomicrografias representativas, em campo claro, da titulação do anticorpo anti-UCN 3 em cortes do PaV de <i>Cebus apella</i> nas diferentes concentrações pelo método da imunoperoxidase indireta.....	66
Figura 6 - Fotomicrografias representativas, em campo claro, do teste de adsorção para UCN 3 em cortes do PaV de <i>Cebus apella</i> , utilizando o peptídeo UCN 3 nas diferentes concentrações (A-E) demonstradas em menor aumento e, (A'-E') em maior aumento.....	69
Figura 7 - Fotomicrografias representativas, em campo claro, do teste de adsorção para UCN 3 em cortes do PaV de <i>Cebus apella</i> , utilizando o peptídeo UCN 1 nas diferentes concentrações (A-E) demonstradas em menor aumento e, (A'-E') em maior aumento.....	70
Figura 8 - Fotomicrografias representativas, em campo claro, do teste de adsorção para UCN 3 em cortes do PaV de <i>Cebus apella</i> , utilizando o peptídeo CRF nas diferentes concentrações (A-E) demonstradas em menor aumento e, (A'-E') em maior aumento,.....	71
Figura 9 - Fotomicrografias representativas, em campo claro, de cortes do SNC de camundongo selvagem wild type UCN 3 (wt/UCN 3) e camundongo knockout para UCN 3 (ko/UCN 3) após realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3, na concentração de 1:3000	73

Figura 10 - Figura 10 - Escala de graduação para o padrão da análise semi-qualitativa das fibras UCN 3 imunorreativas	75
Figura 11 - Fotomicrografias em microscopia confocal de cortes do PaV de <i>Cebus apella</i> após realização da técnica de dupla imunofluorescência para CRF- Cy2/UCN 3-Cy3.....	80
Figura 12 - Fotomicrografia em campo claro de pâncreas de <i>Cebus apella</i> após a realização do método de coloração de Hematoxilina e Eosina (HE)	81
Figura 13 - Colocalização nas células β de urocortina 3 e insulina no pâncreas de <i>Cebus apella</i> através da técnica de dupla-imunomarcacão	83
Figura 14 – Fotomicrografias, em campo claro, da região pré-óptica do hipotálamo de <i>Cebus apella</i> após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3.....	84
Figura 15 – Fotomicrografias, em campo claro, de regiões hipotalâmicas de <i>Cebus apella</i> após reação de imunoperoxidase indireta para UCN 3.....	85
Figura 16 – Fotomicrografias, em campo claro, de cortes da região do núcleo medial da amígdala (Me) de <i>Cebus apella</i> após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3 na concentração de 1:7000.....	86
Figura 17 - Fotomicrografias representativas,em campo claro, de cortes da região do núcleo supra-óptico (SO) de <i>Cebus apella</i> após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3 na concentração de 1:7000.....	87
Figura 18 - Fotomicrografias representativas demonstrando fibras UCN 3-ir no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) de <i>Cebus apella</i> após a realização de imunoperoxidase indireta.....	88

Figura 19 - Fotomicrografias demonstrando fibras UCN 3-ir na parte intermédia do núcleo septal lateral (LSi) de *Cebus apella* após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN3 89

Figura 20 - Fotomontagem digital das fibras bilaterais do trato hipotálamo-hipofisário de *Cebus apella* após a realização da técnica de imuno-histoquímica para UCN 3 90

Figura 21 - Imagens do filme autorradiográfico para sonda de RNAc da UCN 3 em *Cebus apella*..... 92

Figura 22 - Fotomicrografias em microscopia de luz contra-coradas com o método de Nissl, evidenciando sinal de hibridização para UCN 3 após a realização da técnica de hibridização in situ em cortes do hipotálamo de *Cebus apella*..... 93

Figura 23 - Fotomicrografias em microscopia de luz de região amigdalóide e formação hipocampal de *Cebus apella* após técnica de hibridização *in situ* e contra coradas com o método de Nissl, evidenciando sinal de hibridização in situ para UCN 3..... 94

Figura 24 - Fotomicrografias em microscopia de luz de núcleos intersticiais da estria terminal de *Cebus apella* após técnica de hibridização *in situ* e contra coradas com o método de Nissl, evidenciando sinal de hibridização in situ para UCN 3 95

Figura 25 - Fotomicrografias em microscopia de luz de núcleos amigdalóides de *Cebus apella* após a técnica de hibridização in situ para a localização de corpos celulares que expressam o RNAm da Urocortina 3 96

Figura 26 - Fotomicrografias em microscopia de luz dos núcleos intersticiais da estria terminal e do giro denteado da formação hipocampal de *Cebus apella* após a realização da técnica de

hibridização in situ com o uso de sonda sense da urocortina 3 marcada com S³⁵ e contra-coradas pelo método de Nissl 97

Figura 27 - Fotomicrografias em microscopia de luz de núcleos hipotalâmicos de *Cebus apella* após a realização da técnica de hibridização in situ com o uso de sonda sense da urocortina 3 marcada com S³⁵ e contra-coradas pelo método de Nissl 98

Figura 28 - Fotomicrografias em microscopia de luz de núcleos corticais de *Cebus apella* após a realização da técnica de hibridização in situ com o uso de sonda sense da urocortina 3 marcada com S³⁵ e contra-coradas pelo método de Nissl 99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
2 JUSTIFICATIVAS.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 <i>Objetivo geral</i>	35
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais	36
4.2 Perfusão transcardíaca.....	37
4.3 Microtomia.....	38
4.4 Métodos	39
4.4.1 <i>Imuno-histoquímica</i>	40
4.4.1.1 Técnica de titulação.....	40
4.4.1.2 Técnica de adsorção.....	41
4.4.1.3 Controle negativo da reação de imuno-histoquímica para UCN 3.....	43
4.4.1.4 Controle gênico da Urocortina 3 através do uso de camundongos knockouts.....	44
4.4.1.5 Imuno-histoquímica com o método de imunoperoxidase indireta.....	45
4.4.1.6 Imuno-histoquímica com o método de dupla-imunofluorescência.....	46
4.4.1.7 Imuno-histoquímica com o método da dupla marcação	47
4.4.2 <i>Métodos de Coloração</i>	48
4.4.2.1 Intensificação pelo método de Osmicação.....	48
4.4.2.2 Método de coloração de Nissl.....	48
4.4.2.3 Método de coloração de Hematoxilina e Eosina	49
4.4.3 <i>Hibridização in situ (HIS)</i>	50
4.4.3.1 Extração de DNA	50
4.4.3.2 Subclonagem	51
4.4.3.3 Análise da sequência da UCN 3 de <i>Cebus apella</i>	52
4.4.3.4 Técnica de Hibridização <i>in situ</i>	53
4.4.4 <i>Forma de análise</i>	64
5 RESULTADOS.....	65
5.1 Técnica de imuno-histoquímica.....	65

5.1.1 Titulação do anticorpo anti-UCN 3.....	65
5.1.2 Técnica de adsorção.....	67
5.1.3 Controle gênico	72
5.1.4 Escala de graduação para imunomarcção da UCN 3.....	74
5.1.5 Distribuição dos corpos celulares UCN 3-ir.....	76
5.1.6 Distribuição da fibras UCN 3-ir.....	77
5.1.7 Colocalização de células UCN 3 e/ou CRF imunorreativas no PaV.....	78
5.1.8 Técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE) em pâncreas de <i>Cebus apella</i>	80
5.1.9 Colocalização de células β imunorreativas a UCN 3 e/ou insulina no pâncreas	82
5.2 Técnica de Hibridização in situ.....	91
5.2.1 Localização dos corpos neuronais que expressam o RNAm da UCN 3.....	90
6 DISCUSSÃO.....	103
6.1 Considerações metodológicas.....	103
6.1.1 Anticorpo e controles para técnica de imuno-histoquímica.....	103
6.1.2 Especificidade da sonda de RNAc e controle sense para a técnica de HIS.....	104
6.2 Considerações neuroanatômicas.....	105
6.3 Distribuição dos corpos neuronais e fibras UCN 3-ir e dos neurônios que expressam o RNAm da UCN 3.....	105
7 CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS	113
ANEXOS	120
ANEXO A - Cópia da ata de defesa da dissertação de mestrado	121
ANEXO B - Cópia do resumo de submissão do artigo científico	123
ANEXO C - Cópia do artigo científico submetido	125

1 INTRODUÇÃO

O organismo humano, frente ao estresse físico ou psicológico, sofre alterações neuroendócrinas, comportamentais, autonômicas e imunológicas na tentativa de retornar ao seu equilíbrio homeostático (Hsu e Hsueh, 2001; Lewis et al., 2001) pela ativação do eixo hipotálamo—hipófise—supra-renal. Uma vez “estimulado”, o hipotálamo é induzido a secretar o fator liberador de corticotrofina (CRF), através da região parvocelular do núcleo paraventricular (PVH); por transporte axonal, o CRF é direcionado até a lâmina externa da eminência mediana para alcançar os vasos do sistema porta hipotálamo-hipofisário, local onde ocorre a liberação desse neuropeptídeo, promovendo a ativação da adeno-hipófise, com a conseqüente secreção e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Em seguida, o ACTH chega ao córtex da glândula supra-renal pela circulação sangüínea, causando a secreção de hormônios glicocorticóides. Portanto, sob condições de estresse, o hipotálamo, a hipófise e a glândula supra-renal são rapidamente ativados, resultando num aumento de glicocorticóides na circulação sangüínea (Lightman, 1995).

Desse modo, a compreensão da resposta aos fenômenos de estresse depende do conhecimento das vias e fatores que constituem os sistemas controladores da homeostasia, bem como da secreção de CRF (inclusive os receptores e neuropeptídeos relacionados) e de ACTH (Brown, 1994; Koob et al., 1993).

Em 1980, um polipeptídeo ativo de 40 aminoácidos foi isolado e sequenciado à partir da pele de rã (*Phyllomedusa sauvagei*), denominado de SAUVAGINA (Svg) (Montecucchi et al., 1980). Este polipeptídeo não pertencia a nenhuma família de peptídeos até então descrita em anfíbios. Em 1981 os mesmos autores, dando continuidade aos estudos sobre o recém-descoberto polipeptídeo, descreveram as propriedades farmacológicas da Svg, com ações sobre a diurese, sistema cardiovascular e glândulas endócrinas, sugerindo que a Svg pertença a uma nova família de peptídeos em anfíbios (Montecucchi e Henschen, 1981).

Vale et al. (1981) descreveram a seqüência de aminoácidos e as propriedades funcionais de um neuropeptídeo à partir de hipófise de ovinos, denominado de Fator Liberador de Corticotrofina (CRFo). Esse neuropeptídeo de 41 aminoácidos possui as funções de um neuro-hormônio, liberando ACTH das células da adeno-hipófise, assim como de um neuromodulador em outras regiões do sistema nervoso central, coordenando, por exemplo, as respostas dos

sistemas neuroendócrino, visceral e comportamental, adaptativas ao estresse (Brown, 1994). A descrição do CRF de rato (CRFr) e humano (CRFh) demonstrou a grande homologia existente entre a estrutura destes e a do CRFo (Rivier et al., 1983). O CRF também foi isolado e caracterizado em bovinos (Esch et al., 1984), caprinos (Ling et al., 1984), porcinos (Patthy et al., 1986), anfíbios (Stenzel-Poore et al., 1992) e peixes (Morley et al., 1991).

Em 1983, a clonagem do gene CRF permitiu o uso de uma sonda para mapear o RNAm do CRFr (Rivier et al., 1983), CRFh (Shibahara et al., 1983) e CRFo (Furutani et al., 1983), proporcionando estudos mais detalhados sobre a localização desse peptídeo no sistema nervoso central, o que permitiu um melhor conhecimento das vias centrais que ativam o eixo hipotálamo—hipófise—supra-renal em resposta ao estresse.

Lederis et al., 1985b e Lederis et al., 1982 descreveram a estrutura de um neuropeptídeo isolado do sistema magnocelular neurosecretor localizado na extremidade caudal da medula espinhal de peixes teleósteos (*Catostomus commersoni*). Esse peptídeo foi denominado Urotensina I (Uro-I), em virtude de sua secreção ser realizada na “urophysis” (aglomerado de neurônios secretores na parte caudal da medula espinal de peixes, cuja estrutura é anatomicamente análoga à neuro-hipófise humana (Barsyte et al., 1999; Bern et al., 1985; Lederis et al., 1982; Lederis et al., 1985a-b; Minniti et al., 1989;). A Uro-I não está apenas confinada ao sistema neurosecretor, sendo também localizada em outras regiões do encéfalo de peixes, onde supostamente tem ação neuromoduladora (Yulis e Lederis, 1986; Yulis et al., 1986). Esse neuropeptídeo de 41 aminoácidos foi também localizado por métodos imuno-histoquímicos no sistema neurosecretor caudal de três espécies diferentes de teleósteos (Yamada et al., 1986). A Uro-I é 50% homóloga estruturalmente ao CRF (Lederis et al., 1982, 1985a), apresentando também função semelhante a esse neuro-hormônio, como um fator hipofisiotrópico na liberação de ACTH.

Funcionalmente, a Uro-I e a Svg apresentam funções semelhantes às do CRF em mamíferos. A Uro-I em peixes parece participar no equilíbrio hidro-eletrolítico (Bern et al., 1985; Lederis et al., 1985a-b; Minniti et al., 1989) e na liberação de glicocorticóides (Kelsall e Balment, 1998; Lederis et al., 1985b) e ACTH (Fryer et al., 1983; Woo et al., 1985), bem como na atividade cardiovascular como hipotensor (Platzack et al., 1998). Além disso, esses neuropeptídeos parecem estar envolvidos na regulação do comportamento alimentar, liberação

dos hormônios tireoidianos e locomoção (De Pedro et al., 1995,1998; Larsen et al., 1998); (Lovejoy e Balment, 1999).

As comparações farmacodinâmicas entre a Uro-I, a Svg e o CRFo na hipófise e na periferia, demonstraram que as ações desses neuropeptídeos (vasodilatação, hipotensão e liberação de ACTH) mantiveram-se presentes em uma variedade de vertebrados. Estudos subseqüentes demonstraram, em mamíferos, que além da homologia estrutural, esses três peptídeos apresentavam propriedades biológicas muito próximas. Estes dados sugerem que estas moléculas pertencem a uma mesma “família” de peptídeos, conservando, cada um, estrutura e funções singulares (Lederis et al., 1985b).

Nos anos de 1994 e 1995, vários autores descreveram em roedores a presença, tanto na periferia como no sistema nervoso central, de três formas de receptores para CRF: CRF₁, CRF_{2(a)} e CRF_{2(b)}. O CRF tem alta afinidade para o receptor CRF₁ e menos para o CRF₂ (Chalmers et al., 1995; Lovenberg et al., 1995a,b; Muglia et al., 1995; Potter et al., 1992,1994).

Uma terceira forma do receptor CRF₂, o CRF_{2(c)}, foi clonada à partir de tecido nervoso humano. Este terceiro subtipo de receptor parece ter sua expressão mais evidente na área septal e formação hipocampal, além do corpo amigdalóide, núcleo acumbens, regiões do mesencéfalo e córtex frontal (Kostich et al., 1998). O CRF₁ clonado a partir de células tumorais de hipófise humana apresenta alto grau de homologia (95%) aos receptores identificados em encéfalos de ratos (Chang et al., 1993; Liaw et al., 1996; Lovenberg et al., 1995a,b; Perrin et al., 1993; Potter et al., 1994), de humanos e da hipófise de camundongos (Vita et al., 1993). O CRF₂ possui cerca de 70% de homologia ao CRF₁ (Lovenberg et al., 1995b), e foi identificado também no camundongo (Perrin et al., 1993) e no homem (Liaw et al., 1996).

Em estudos mais recentes, Van Pett et al. (2000) relatam a distribuição do RNAm dos receptores CRF₁ e CRF₂ no sistema nervoso central de rato e camundongo. É importante salientar que a expressão dos receptores nas diferentes espécies é fundamentalmente similar, tanto para a variante CRF₁ quanto para CRF₂. A expressão do RNAm do receptor CRF₁ se encontra principalmente em regiões de córtex cerebral e cerebelar, bem como em núcleos sensoriais. Com relação a expressão do RNAm de CRF₂ é similar entre rato e camundongo e

^{1,2} Nomenclatura e abreviações referentes aos peptídeos e receptores da família do CRF obedeceram à sugestão de Hauger et al., 2003.

mais restrita do que a expressão de CRF₁, se localizando em bulbo olfatório, núcleo septal lateral, núcleo intersticial da estria terminal, núcleo ventromedial do hipotálamo, núcleo cortical posterior e medial da amígdala. Em camundongo, localiza-se no núcleo dorsal da rafe, hipocampo dorsal e ventral, núcleo do trato solitário e área postrema (Van Pett et al., 2000).

Muglia et al. (1995) descreveram a existência de secreção residual de ACTH em camundongos fêmeas mesmo na ausência da expressão do gene do CRF, indicando que o CRF não é o único responsável pela secreção de ACTH.

Linton et al. (1988) detectaram, em análise do sangue de mulheres grávidas, a presença de uma proteína de ligação (“binding protein”) para o CRF (CRF-BP). Foi descrita a presença e caracterizaram a CRF-BP à partir da purificação de plasma humano). (Behan et al., 1995; Potter et al., 1992). A CRF-BP possui alta afinidade para o CRF, inibindo sua atividade biológica de liberar o ACTH.

A Svg e Uro-I têm constantes de ligação similares à do CRF para os receptores CRF₁ e parecem ligar-se mais fortemente ao CRF₂ (Donaldson et al., 1996; Lovenberg et al., 1995b; Turnbull e Rivier, 1997; Vaughan et al., 1995).

Vaughan et al. (1995) demonstraram a presença de um neuropeptídeo em ratos com estrutura e função semelhantes à Uro-I denominada Urocortina (UCN). A homologia estrutural da UCN é de 63% a Uro-I, de 45% ao CRF e de 35% a Svg. A UCN demonstrou afinidade para o receptor CRF₂, além de causar secreção de ACTH e hipotensão arterial. A UCN foi localizada em corpos celulares principalmente em dois sítios no sistema nervoso central: o núcleo visceral do nervo oculomotor (núcleo de Edinger-Westphal - EW) e o núcleo lateral superior olivar (LSO). Um número reduzido de células marcadas também foi encontrado na área hipotalâmica lateral e no núcleo supra-óptico.

A UCN foi clonada também em humanos (UCNh) à partir da biblioteca de DNA, apresentando 88% de identidade de nucleotídeos e 95% de aminoácidos em relação à UCN de ratos (UCNr) (Donaldson et al., 1996). Esses pesquisadores também reportaram que a UCNh libera ACTH *in vitro* e liga-se com alta afinidade aos receptores CRF₁, CRF_{2(a)} e CRF_{2(b)}, bem como à CRF-BP.

A atividade antiinflamatória da UCN foi demonstrada em 1996 (Turnbull et al., 1996), sendo a UCN um potente inibidor do edema provocado pelo calor, função mediada principalmente pelos receptores CRF₂.

Foi demonstrado um potente efeito inibidor do apetite em ratos após a injeção intracerebroventricular de UCN, mais evidente que o do CRF (Spina et al., 1996)

Em 1998 foi descrita a distribuição da UCN no sistema nervoso central de ratos, onde neurônios imunorreativos à UCN (UCN-ir) concentravam-se principalmente no núcleo de Edinger-Westphal (EW) e regiões circunvizinhas, ao redor da substância cinzenta periaquedutal, estendendo-se caudalmente até os núcleos dorsal da rafe, dorsal e laterodorsal do tegmento. Observaram também neurônios UCN-ir marcados na parte magnocelular do núcleo supra-óptico e PVH, parte parvocelular do PVH, além do núcleo ventromedial, periventricular anterior e substância negra. Não foram encontrados neurônios UCN-ir na ponte, bulbo ou medula espinal. Fibras UCN-ir foram reportadas de forma mais evidente no núcleo septal lateral no telencéfalo (Kozicz et al., 1998)

Estudos realizados através dos métodos de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* encontraram neurônios UCN-ir e RNAm principalmente nos núcleos supra-óptico, LSO e EW, como também em núcleos motores no tronco encefálico, como o facial, ambíguo, hipoglosso e trigêmeo. As projeções UCN-ir são principalmente descendentes para áreas ópticas acessórias, auditivas e pré-cerebelares. No hipotálamo, algumas células foram verificadas no núcleo supra-óptico, parte magno-celular do núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo supramamilar - parte lateral, área hipotalâmica lateral e posterior. Em animais previamente tratados com colchicina, foram evidenciadas células com expressão do RNAm da UCN que não foram encontradas em animais que não foram submetidos a esse tratamento e outros locais que houve intensificação da imunomarcação. Dentre os locais, destacaram-se: núcleo supramamilar do hipotálamo, núcleo vestibular medial, substância negra e área hipotalâmica posterior (Bittencourt et al., 1999). Estes autores observaram, ainda, que os sítios celulares principais da expressão do RNAm da UCN no encéfalo de ratos não eram reconhecidos como componentes essenciais da via central relacionada ao estresse. Os mesmos autores encontraram ainda alguns territórios densamente marcados com fibras UCN-ir, como por exemplo, o núcleo septal lateral (parte intermédia), local onde se encontra também expressão do RNAm do CRF₂. Entretanto, foi demonstrado que os principais locais de expressão de RNAm do CRF₂ no encéfalo de roedores recebem poucas projeções UCN-ir, o que sugere a possível existência de um ou mais ligantes adicionais aos receptores de CRF no encéfalo de mamíferos (Bittencourt et al., 1999).

Em 2003 foi demonstrado em primata (*Cebus apella*), através dos métodos de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, que o principal sítio de imunorreatividade e expressão do RNAm da UCN foi o núcleo de EW, além da coluna anterior da medula espinal, sendo interessante notar que ambas as regiões conectam-se com estruturas fora do sistema nervoso central. Quanto às projeções UCN-ir, foi determinado que elas são amplamente distribuídas ao longo do neuroeixo, apresentando projeções descendentes, dentre elas, as que mais se destacam por apresentarem maior densidade de fibras UCN-ir, são: o núcleo vestibular superior, o sistema intersticial do trato espinal do trigêmio e a camada granular do córtex do flóculo cerebelar. Quanto às projeções ascendentes, fibras UCN-ir foram encontradas em alguns sítios prosencefálicos, sendo os núcleos paraventricular e supra-óptico do hipotálamo e a área pré-óptica medial, os mais densamente inervados. De uma forma geral, algumas das projeções UCN 1-ir sugerem algumas possíveis características funcionais para este sistema peptidérgico como a participação em mecanismos relacionados ao estresse e integração sensório-motora (Vasconcelos et al., 2003).

Em 2001, um neuropeptídeo de 38 aminoácidos foi clonado e caracterizado em ratos e camundongos, e representa um novo membro da “família” de peptídeos relacionados ao CRF. Este peptídeo foi denominado Urocortina 2 e distinguiu-se dos outros membros da “família” por ligar-se com alta seletividade aos receptores CRF₂, com nenhuma atividade evidente nos receptores CRF₁. A expressão do RNAm para UCN 2 foi registrada em alguns grupos celulares no hipotálamo relacionados ao estresse (núcleos paraventricular, supra-óptico e arqueado), tronco encefálico (*locus coeruleus* e núcleos do trigêmeo, facial e hipoglosso) e corno anterior da medula espinal (Reyes et al., 2001).

Estudos funcionais iniciais para UCN 2 são concordes com o envolvimento do processamento de informações sensoriais, viscerais e na modulação do fluxo autonômico central. Além disso, a UCN 2 inibe o apetite e não apresenta qualquer efeito sobre a atividade motora (Reyes et al., 2001)

Foi também identificada uma sequência de aminoácidos em humanos intimamente relacionada à UCN 2 de roedores (peptídeo relacionado à urocortina – URP). Apesar da identidade de 76% de aminoácidos da URP para a UCN 2, notou-se na URP a ausência de um sítio de clivagem proteolítico na região C-terminal que proporcionaria a existência de um homólogo humano à UCN 2 (Reyes et al., 2001). É provável que o URP, que está mais

relacionado à UCN 2 de camundongos, seja ortólogo da UCN 2 humana, contudo, a natureza química e funções da UCN 2 humana devem ainda ser investigadas (Lewis et al., 2001).

Em 2001, um neuropeptídeo de 38 aminoácidos foi descrito e caracterizado à partir de genes humanos (à partir da biblioteca de DNA) e de camundongos, sendo relacionado à “família CRF”. Este peptídeo denominado Urocortina-3 (UCN 3) foi também descrito por Hsu & Hsueh (Hsu e Hsueh, 2001) recebendo a denominação de Estressecopina (SCP – Stresscopin). A análise do peptídeo ou das seqüências de nucleotídeos da UCN 2 e UCN 3 parece indicar que estes dois neuropeptídeos relacionam-se mais intimamente um ao outro que aos outros membros da “família CRF” (Lewis et al., 2001).

A expressão do RNAm para UCN 3 foi encontrada em diversos órgãos periféricos e em poucas áreas corticais e subcorticais, tais como no hipotálamo, corpo amigdalóide e tronco encefálico (Hsu e Hsueh, 2001; Kang et al., 2007; Lewis et al., 2001) diferentemente da distribuição do CRF (Bittencourt et al., 1999; Swanson et al., 1983) e UCN 2 (Reyes et al., 2001). Recentemente, foi observado um aumento da regulação da expressão de UCN 3 na área 9 de Brodmann do córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) em pacientes com depressão. Os autores atribuíram essa alteração da regulação de UCN 3 à possível resposta homeostática ao estresse e/ou a outras patologias associadas com a depressão (Kang et al., 2007).

Estudos realizados por Li et al. (2003), com cultura de células, camundongos e ratos, a cerca da expressão de UCN 3 em órgãos periféricos, verificaram a presença de UCN 3 em tecido pancreático, mais especificamente em células β . Esses autores foram os primeiros a relatar a presença e a colocalização de UCN 3 e insulina em células β do pâncreas, mas não em células α , bem como sugerir a participação da UCN 3 no controle da estimulação local da secreção de insulina e glucagon no pâncreas via receptor CRF_2 (Li et al., 2003). Em estudos posteriores, os mesmos autores, utilizando dois modelos de camundongos diabéticos, um *ob/ob* camundongos obesos e camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD), verificaram que houve aumento significativo da expressão de UCN 3 no pâncreas desses animais, sugerindo que há um aumento da expressão de UCN 3 no pâncreas nesses modelos animais. A UCN 3 endógena secretada nessas condições por sua vez, estimula localmente a secreção de insulina, o que sugere que a UCN 3 endógena possa estar envolvida na secreção de insulina em condições de excesso de nutrientes. A longo prazo esses efeitos podem contribuir para a redução da sensibilidade da insulina e de consequências metabólicas nocivas (Li et al., 2006).

Recentes estudos relacionam as urocortinas com o controle cardiovascular, ação antidepressiva e termorregulação, entre outras (Davidson et al., 2009; Tanaka e Telegdy, 2008; Telegdy e Adamik, 2008). Em particular, a UCN 3 parece estar relacionada à uma depressão do sistema cardiovascular através de sua interação com CRF₂ no núcleo do trato solitário (Nakamura e Sapru, 2009).

Várias espécies de primatas não-humanos vem sendo utilizadas como modelos experimentais para diversas linhas de pesquisa. Além da destruição do *habitat* e da caça, a demanda por primatas como animais de laboratório acrescentou mais pressão sob espécies neotropicais (Mittermeir et al., 1994). A espécie *Cebus apella* está entre as espécies de primatas Neotropicais comumente utilizadas para pesquisa biomédica, embora em menor grau que o macaco-esquilo e macaco-coruja (Fragaszy et al., 2004).

Fragaszy et al., 2004 relatam que, dentre as várias pesquisas nas quais a espécie *Cebus apella* vem sendo utilizada, destacam-se: imunologia (de Palermo et al., 1988), biologia reprodutiva (Nagle et al., 1989, 1994), fisiologia (Terpstra et al., 1991), neurociência (Bortoff e Strick, 1993; Leichnetz e Gonzalo Ruiz 1996; Yamada et al., 1996), e ainda como modelo em pesquisa farmacológica para a esquizofrenia (Linn et al., 1999; Linn e Javitt 2001) ou ainda deficits cognitivos associados com doenças do envelhecimento e de Alzheimer (Bartus et al., 1980, 1983; Bartus et al., 1982; Bartus e Dean, 1988).

2. JUSTIFICATIVAS

Tendo em vista a aplicabilidade do uso da espécie *Cebus apella* como modelo experimental em pesquisas biomédicas, à possibilidade de aquisição dos referidos animais comprovadamente autorizada pelos órgãos que regulamentam sua utilização, e devido a escassez de dados morfológicos a cerca da UCN 3 em primatas não-humanos, as justificativas do presente estudo se baseiam:

- a) na possibilidade de um maior entendimento a cerca do sistema neuropeptidérgico da UCN 3 em um primata do novo mundo (neotropical), utilizando-se para isso a espécie *Cebus apella* como modelo experimental;
- b) na realização do mapeamento da distribuição da proteína e do RNAm da UCN 3 no sistema nervoso central de *Cebus apella*;
- c) na possibilidade de se determinar a existência da preservação do sistema neuropeptidérgico da UCN 3 em espécies diferentes;
- d) prover dados morfológicos que podem servir de base para futuros trabalhos funcionais da UCN 3 e,
- e) na possibilidade de contribuir com mais conhecimento sobre o papel da UCN 3 na liberação de insulina e glucagon.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Estabelecer a localização e a distribuição exatas dos neurônios produtores de UCN 3, assim como de seus campos terminais, no sistema nervoso central de primata não-humano (*Cebus apella*).

3.2 *Objetivos específicos*

- a) Verificar a presença de colocalização de neurônios imunorreativos à UCN3 e ao Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) no núcleo paraventricular do hipotálamo de *Cebus apella*;
- b) Verificar a presença de co-localização de insulina e UCN nas células β das ilhotas de Langerhans de *Cebus apella*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados animais da espécie *Cebus apella*, popularmente conhecidos como Macaco-prego. São primatas do Novo Mundo (Neotropicais), pertencentes à família *Cebidae*, da infraordem Platyrrhini. São macacos de tamanho médio, robustos, que apresentam moderado dimorfismo sexual, com braços e pernas de equivalente tamanho, com caudas peludas semi-preensíveis. Podem pesar de 2,5-5kg, estão presentes por toda América Central e do Sul, bem como podem ser considerados primatas neotropicais onívoros (Fragaszi et al., 2004).

Foram utilizados macacos adultos jovens (n=6) da espécie *Cebus apella*, com peso aproximado de 2.200 a 2.700 g. O uso e fornecimento para pesquisa desses animais são fiscalizados e orientados segundo normas e procedimentos do Núcleo de Procriação de Macacos-prego associado ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Araçatuba, segundo a portaria 016/94 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), de 04 de abril de 1995. Os animais destinados à este projeto foram acondicionados em gaiolas individuais de aço inox de contenção, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura ambiente de 25 ± 2 °C, com alimentação (ração, frutos e ovos) e água *ad libitum*. Vale ser ressaltado que este projeto apresenta autorização do IBAMA concedida pelo Prof. Dr. José Américo de Oliveira, professor responsável pelo núcleo de procriação de macacos-prego da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP (anexo A) sendo que o Núcleo atende às disposições básicas contidas no "Guide to the Care and Use of Experimental Animals", vols 1 e 2, do Canadian Council on Animal Care, bem como as normativas dispostas na Portaria 016/94 do IBAMA. Além disso, este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEEa-ICB/USP), com protocolo registrado sob nº 40 nas fls. 69 do livro 02 para uso de experimentação animal, em 24/08/2009 (anexo B).

4.2 Perfusão transcardíaca

A realização da perfusão transcardíaca ocorreu sempre entre o período das 9 h as 12 h dos dias de eutanásia para que não houvesse a interferência de substâncias endógenas que pudessem comprometer os resultados do trabalho, justamente por se tratar de um mapeamento neuroanatômico de um membro da família de peptídeos do CRF, classicamente relacionados ao estresse. Também foram tomados todos os cuidados com os animais, de acordo com as recomendações do Canadian Council on Animal Care, a fim de minimizar qualquer tipo de sofrimento do animal durante os procedimentos. Assim, os animais foram previamente tranquilizados por injeção intramuscular de 5 mg/ml de Diazepan® (União Química, Embu-Guaçu, S.P., Brasil), sendo posteriormente sedados por injeção intramuscular de 10 mg/Kg de peso corporal de Vetaset® (Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, S.P., Brasil) para, em seguida, serem anestesiados por injeção intraperitoneal 30 mg/kg de Pentothal sodium (Hospira S.p.A., Liscate (MI), Italy).

Após ser realizada a anestesia, os animais foram posicionados em suporte destinado à acomodação dos mesmos para ser realizada a perfusão transcardíaca. A cavidade torácica foi rapidamente exposta, e um volume de 1ml de anticoagulante (Heparina sódica 5000 UI) foi inoculado intraventricularmente. O ventrículo esquerdo foi puncionado até a aorta ascendente, através de uma cânula acoplada a um sistema de bomba perfusora (Masterflex ®LS). A seguir, 700 ml de solução salina (0,9%) foi impulsionada, possibilitando a remoção de sangue, tendo como parâmetro a coloração do fígado do animal. Posteriormente, foram perfundidos 4 litros de solução fixadora constituída por 4% de formaldeído (obtido à partir de paraformaldeído aquecido a 60-65 °C) em tampão acetato (0,1M; pH 6,5) e, à seguir, 4 litros de solução fixadora constituída por 4% de formaldeído em tampão tetraborato de sódio (0,1M; pH 9.5) à temperatura ambiente.

Durante e após a perfusão foram tomados todos os cuidados necessários para a não-contaminação por RNases, utilizando-se soluções tamponadas constituídas por Dietilpirocarbonato (DEPC), inibidor de RNases, bem como de luvas para a devida manipulação dos neuroeixos retirados e sendo, os mesmos, pós-fixados em solução de 10% de glicerol e 2% de Dimetilsulfóxido (DMSO) em tampão tetraborato de sódio, 0,1M, pH 9,5, à 4 °C, por 3 dias. Após esse período, essa solução foi trocada por solução de 20% de glicerol e 2% de Dimetilsulfóxido

(DMSO) em tampão tetraborato de sódio a 0,1M, pH 9,5, à 4 °C, por 7 a 10 dias, ou até a realização da microtomia.

4.3 Microtomia

Vale ser ressaltado que nesta etapa também foram tomados todos os devidos cuidados quanto à manipulação dos encéfalos, assim como realizado na etapa de perfusão transcardíaca, tanto no que se refere à conservação do neuroeixo, tanto quanto à não-contaminação dos mesmos por RNases, utilizando para isso as soluções citadas, luvas e recipientes devidamente livres de RNases. Este procedimento é importante, pois as mesmas poderiam interferir em nossos resultados, quando da utilização da técnica de hibridização *in situ*, na qual utilizamos sonda de RNAc.

Para a realização da microtomia, utilizou-se uma base metálica com dimensão de 18,4cm de comprimento por 8,3cm de largura apoiada adequadamente no micrótomo de congelação Leica SM2000R (Leica Microsystems, Alemanha) sendo os planos ântero-posterior e látero-lateral verificados corretamente antes de cada microtomia. Foram realizados cortes no plano frontal de todo neuroeixo, com a obtenção de secções de 40µm. Os cortes foram devidamente acondicionados em recipientes livres de RNases, num total de 8 séries, constituídas por 6 em 4 e, armazenados em solução tamponada de anticongelante, constituída por 1X PBS, 30% de etilenoglicol e 20% de glicerol, em freezer à -20 °C.

Foram também obtidos cortes histológicos, em secções de 20µm de pâncreas fresco emblocado em optimal congelation temperature Tissue-tek® OCT Compound™ (Sakura Finetek, Torrance, C.A., USA) dos referidos animais, cortes estes obtidos pelo uso de criostato (Leica). Os cortes obtidos foram coletados em lâminas SuperFrost plus (Fisher Scientific, Swaanee, G.A., USA) em 6 séries de 3 em 5 e permaneceram em freezer a -20 °C até serem submetidos às técnicas de interesse.

4.4 Métodos

Após a obtenção dos cortes histológicos do neuroeixo, uma série de cada animal foi submetida ao método de imunoperoxidase indireta para a detecção de células e fibras UCN 3-ir, e ao método de hibridização *in situ* (HIS) para se determinar a localização dos neurônios que expressam o RNAm da UCN 3.

4.4.1 Imuno-histoquímica

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados neste estudo para as reações imuno-histoquímicas

Anticorpo	Identificação e fonte	Diluição utilizada
UCN 3	Anticorpo primário policlonal feito em coelho, PBL#6570, Dr. Wylie Vale e Dra. Joan Vaughan, The Salk Institute	1:7000; 1:700
CRF	Anticorpo policlonal feito em coelho, PBL#rC70, Dr. Wylie Vale e Dra. Joan Vaughan, The Salk Institute	1:3000
Insulina	Anticorpo policlonal feito em coelho, H-86 SC-9168, Santa Cruz	1:150

Fonte: Batagello, 2011.

Tabela 2. Peptídeos utilizados neste estudo para as reações imuno-histoquímicas durante o teste de adsorção

Peptídeos	Identificação e fonte	Diluições
UCN 3	hUCN3, 415-174-15, Dr. Jean Rivier, The Salk Institute	1mg/ml; 0,5mg/ml; 0,1mg/ml; 0,05mg/ml; 0,01mg/ml
UCN 1	rUCN1, 351-156-15, Dr. Jean Rivier, The Salk Institute	1mg/ml; 0,5mg/ml; 0,1mg/ml; 0,05mg/ml; 0,01mg/ml
CRF	r/hCRF, 365-198-15, Dr. Jean Rivier, The Salk Institute	1mg/ml; 0,5mg/ml; 0,1mg/ml; 0,05mg/ml; 0,01mg/ml

FONTE: Batagello, 2011.

4.4.1.1 Técnica de titulação

O método de titulação foi uma técnica realizada neste projeto com o intuito de se determinar, através da titulação do anticorpo primário policlonal anti-UCN 3, gerado em coelho (PBL# 6750, Salk Institute for Biological Studies”, La Jolla, Califórnia – EUA) em diferentes concentrações, a concentração ótima para o uso nas reações imuno-histoquímicas para UCN 3. Portanto, seguindo o protocolo do Laboratório de Neuroanatomia Química (LNQ), 12 cortes frontais no nível do núcleo paraventricular do hipotálamo, parte magnocelular dorsal (2 cortes para cada concentração), foram selecionados e designados para cada uma das seis concentrações do anticorpo utilizado, de acordo com a curva de titulação padrão para titulação de anticorpos, que foram: 1:1000, 1:3000, 1:7000, 1:10000, 1:20000 e 1:30000. Os cortes do neuroeixo da região de interesse (PaMD) foram lavados em solução de KPBS 6x5 minutos; inibição da peroxidase endógena por 15 minutos em solução KPBS 0,02M pH 7,4 acrescida de peróxido de hidrogênio a 0,3%. Após isso, os cortes foram lavados em solução de KPBS 6 x 5 minutos. Após o preparo dos cortes para o recebimento das diferentes concentrações de anticorpo, foi realizada a produção da solução mãe do anticorpo anti-UCN 3 (diluído na proporção de 1:1) contendo solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de Albumina Bovina BSA (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA) e heparina na concentração de 1:1.000, sendo em seguida, realizadas diluições dessa solução mãe em concentrações de: 1:3000, 1:7000, 1:10000, 1: 20000 e 1:30000. Os cortes permaneceram nas referidas soluções para cada concentração por 48 horas, sob agitação, a 4 °C. Posteriormente, os cortes foram lavados em solução de KPBS 6 x 5 minutos e incubados em anticorpo secundário biotilado (anti-rabbit) na concentração de 1:800 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de Albumina Bovina (BSA) e heparina em KPBS por 1 h, a seguir lavados em KPBS 6 x 5 minutos e incubados por 1 h em solução do complexo Avidina-Biotina (Vector laboratories, Burlingame, C.A., USA), na concentração de 1:333 em solução de KPBS. Após esses procedimentos, os cortes foram lavados em KPBS 3 x 5 minutos, em seguida lavados em solução de tampão acetato 3 x 5 minutos, estando os mesmos adequados para a reação de marcação sendo o peróxido de hidrogênio na concentração final de 0,003% o responsável pelo fornecimento da peroxidase nesta reação, níquel-amônio-sulfato (NAS) na concentração final de 2,5% para realce das marcações e como cromógeno foi utilizada a diaminobenzidina DAB na concentração final de 0,02% (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA), pelo tempo de 20 minutos, independentemente da

coloração dos cortes. A seguir, as lâminas foram desidratadas em série crescente de álcoois e deslipidificadas em xilol, para que finalmente pudessem ser cobertas com meio de montagem permanente, o DPX (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA) e lamínulas de vidro.

4.4.1.2 Técnica de Adsorção

O método de adsorção foi uma técnica realizada neste projeto com o intuito de se verificar e comprovar a especificidade do anticorpo primário policlonal anti-UCN 3 (descrito anteriormente) utilizado nas reações imuno-histoquímicas. Assim, este procedimento consiste em acrescentar concentrações crescentes do peptídeo à solução do anticorpo primário anti-UCN 3 em uma única concentração (1:7000), esta determinada pelo teste de titulação comentado anteriormente, antes de seu contato com o tecido, de modo a promover uma saturação das moléculas do anticorpo e verificar se, mesmo após a saturação, pode-se observar células imunorreativas ao anticorpo, o que indicaria baixa especificidade do anticorpo. Em nosso trabalho foram utilizados três peptídeos pertencentes à família dos peptídeos do CRF que apresentam homologia estrutural e funcional ao peptídeo por nós estudado, dentre eles: CRF, Urocortina 1 e Urocortina 3. Após realizarmos a adsorção com cada peptídeo supracitado, procedeu-se a reação imuno-histoquímica padrão para UCN 3.

Portanto, seguindo o protocolo, 15 cortes frontais no nível do núcleo paraventricular do hipotálamo, parte magnocelular dorsal, foram selecionados e designados para cada uma das cinco concentrações de peptídeos utilizados, bem como 3 cortes para controle da reação (ausência de peptídeos). Anteriormente ao início da técnica, houve a reconstituição dos peptídeos liofilizados utilizados, que foram: CRF, Urocortina 1 e Urocortina 3, na concentração e 1mg/ml, usando solução tampão de KPBS 0,02M + 0,04% de ácido acético. Posteriormente, houve a distribuição da solução de adsorção para cada peptídeo em 3 placas com 6 cavidades, utilizando as seguintes concentrações:

- 1mg/ml= 200µl da solução do peptídeo reconstituído + 1 µl do anticorpo;
- 0,5mg/ml= 100µl da solução do peptídeo reconstituído + 100µl de KPBS 0,02M + 1µl do anticorpo;
- 0,1mg/ml= 20µl da solução do peptídeo reconstituído + 180µl KPBS 0,02M + 1µl do anticorpo;

- 0,05mg/ml= 10µl da solução do peptídeo reconstituído + 190µl de KPBS 0,02M + 1µl do anticorpo;
- 0,01mg/ml= 2µl da solução do peptídeo reconstituído + 198µl de KPBS 0,02M + 1µl do anticorpo;
- Controle: 200µl de KPBS 0,02M + 1µl do anticorpo.

Essas soluções foram então incubadas (sem nenhum tecido) por 18 a 24h a 4⁰C, sob constante agitação. A seguir, subiu-se o volume de cada cavidade para 5ml, usando solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de Albumina Bovina (BSA) e heparina. Em seguida, os cortes de tecido da região de interesse (PaV) foram lavados em solução de KPBS 3 x 5 minutos; inibição da peroxidase endógena por 15 minutos em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de peróxido de hidrogênio a 3%. Após isso, os cortes foram lavados em solução de KPBS 3 x 5 minutos e incubados nas soluções de adsorção anteriormente citadas por 48 h a 4 °C sob constante agitação. Posteriormente, os cortes foram lavados em solução de KPBS 3 x 5 minutos e incubados em anticorpo secundário biotinilado (anti-rabbit) na concentração de 1:200 em solução de KPBS por 1 h, a seguir lavados em KPBS 3 x 5 minutos e incubados por 1 h em solução do complexo Avidina-Biotina (Vector laboratories, Burlingame, C.A., USA), ambas na concentração de 1:100 em solução de KPBS. Após esses procedimentos, os cortes foram lavados em KPBS 3 x 5 minutos e, 3 x 5 minutos em tampão acetato, estando os mesmos adequados para a reação de marcação sendo o peróxido de hidrogênio a 0,003%, o responsável pelo fornecimento da peroxidase nesta reação, como cromógeno foi utilizada a DAB na concentração de 0,02% e níquel sulfato amônio (NAS) a 2,5%.

Uma vez ocorrida a reação, os cortes foram lavados novamente em 3 x 5 minutos em tampão acetato, 3 x 5 minutos em KPBS. A seguir os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e permaneceram em estufa à 37 °C por aproximadamente 18 h. A seguir, as lâminas foram desidratadas em série crescente de álcoois e deslipidificadas em xilol, para que finalmente pudessem ser cobertas com meio de montagem permanente, o DPX e lamínulas de vidro.

4.4.1.3. Controle negativo da reação de imuno-histoquímica para UCN 3

Para que seja alcançado o controle das reações imuno-histoquímicas, é imprescindível que, além do uso das técnicas de titulação e adsorção anteriormente mencionadas, seja realizada a técnica de controle negativo. Este método se caracteriza pela ausência do anticorpo primário quando se realiza reação de imunoperoxidase indireta, procedendo a colocação dos demais reagentes da reação imuno-histoquímica. Para o presente estudo não foi adicionado aos cortes do sistema nervoso central de *Cebus apella*, no nível do PaMD, o anticorpo primário policlonal anti-UCN 3 na concentração de 1:7000, utilizado nas reações imuno-histoquímicas. Temos como base a região do PaMD devido a localização dos neurônios UCN 3-ir, da mesma forma que cortes nesse mesmo nível foram utilizados para as técnicas de titulação e adsorção.

Para isso, cortes do PaMD “*free-floating*” selecionados foram lavados 3 x 5 min. em solução tampão de fosfato potássio (KPBS 0,02M, pH 7,4); incubação em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de Albumina Bovina (BSA) e heparina, por 48 h a 4 °C sob constante agitação. Após esse período, os cortes foram lavados em solução de KPBS 3 x 5 minutos e incubados em anticorpo secundário biotilado (anti-rabbit) na concentração de 1:200 em solução de KPBS por 1 h, a seguir lavados em KPBS 3 x 5 minutos e incubados por 1 h em solução do complexo Avidina-Biotina, ambas na concentração de 1:100 em solução de KPBS. Após esses procedimentos, os cortes foram lavados em KPBS 3 x 5 minutos, e tampão acetado pH 6,5 0,2M 3 x 10 minutos, estando os mesmos adequados para a reação de marcação sendo o peróxido de hidrogênio na concentração final de 0,003% o responsável pela catalização da reação, a DAB na concentração final de 0,02% como cromógeno e o NAS na concentração final de 2,5% como intensificador da imunomarcação, sendo que após esta reação, ocorre a deposição de um produto insolúvel visível à microscopia de luz.

Uma vez ocorrida a reação, os cortes foram lavados novamente em 3 x 5 minutos em tampão acetato, seguida da lavagem em KPBS 3 x 5 minutos, a seguir foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e permaneceram em estufa à 37 °C por aproximadamente 18 h, para posteriormente serem desidratados, deslipidificados e cobertos com meio permanente de montagem DPX e lamínulas de vidro.

4.4.1.4 Controle gênico da Urocortina 3 através do uso de camundongos knockouts

Para a complementação da especificidade do anticorpo anti-UCN 3 utilizado no presente estudo, foram realizadas reações imuno-histoquímicas em cortes do sistema nervoso central de camundongos "knockouts" para UCN 3 (ko/UCN 3), bem como em camundongos "wild type" para UCN 3 (wt/UCN 3), gentilmente cedidos pelo Dr. Wylie Vale, The Salk Institute for Biological Studies”, La Jolla, Califórnia – EUA. Esses animais apresentam a ausência do gene responsável pela produção da proteína Urocortina 3.

Para isso, uma série de cortes foi utilizada para o método ABC de imunoperoxidase, tanto para os cortes de camundongo ko/UCN 3 quanto para camundongos wt/UCN 3, como segue: os cortes “*free-floating*” selecionados foram lavados 3 x 5 minutos em solução tampão de fosfato potássio (KPBS 0,02M, pH 7,4); incubação em solução de anticorpo primário policlonal anti-UCN 3 na concentração de 1:3000 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de BSA e heparina, por 48 h a 4 °C sob constante agitação. Após esse período, os cortes foram lavados em solução de KPBS 3 x 5 minutos e incubados em anticorpo secundário biotilado (anti-rabbit) na concentração de 1:200 em solução de KPBS por 1 h, a seguir lavados em KPBS 3 x 5 minutos e incubados por 1 h em solução do complexo Avidina-Biotina, ambas na concentração de 1:100 em solução de KPBS. Após esses procedimentos, os cortes foram lavados em KPBS 3 x 5 minutos, e em tampão acetado pH 6,5 0,2M 3 x 10 minutos, estando os mesmos adequados para a reação de marcação sendo o peróxido de hidrogênio na concentração final de 0,003% o responsável pela catalização da reação, a DAB na concentração final de 0,02% como cromógeno e o NAS na concentração final de 2,5% como intensificador da imunomarcação, sendo que após esta reação, ocorre a deposição de um produto insolúvel visível à microscopia de luz.

Uma vez ocorrida a reação, os cortes foram lavados novamente em 3 x 5 minutos em tampão acetato, seguida da lavagem em KPBS 3 x 5 minutos, a seguir foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e permaneceram em estufa à 37 °C por aproximadamente 18 h, para posteriormente serem desidratados, deslipidificados e cobertos com meio permanente de montagem DPX e lamínulas de vidro.

4.4.1.5 Imuno-histoquímica com o método de imunoperoxidase indireta

Este método foi utilizado para se obter a padronização da inervação normal e localização dos grupos de neurônios e campos terminais imunorreativos à UCN 3 (UCN-3ir). Para isso, uma série de cortes foi utilizada para o método ABC de imunoperoxidase, como segue: os cortes “*free-floating*” selecionados foram lavados 3 x 5 minutos em solução tampão de fostato potássio (KPBS 0,02M, pH 7,4); incubação em solução de anticorpo primário policlonal anti-UCN 3 (especificidade e características já descritas anteriormente), na concentração de 1:7000 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de Albumina Bovina (BSA) e heparina, por 48 h a 4 °C sob constante agitação. Após esse período, os cortes foram lavados em solução de KPBS 3 x 5 minutos e incubados em anticorpo secundário biotinilado (anti-rabbit) na concentração de 1:200 em solução de KPBS por 1 h, a seguir lavados em KPBS 3 x 5 minutos e incubados por 1 h em solução do complexo Avidina-Biotina, ambas na concentração de 1:100 em solução de KPBS. Após esses procedimentos, os cortes foram lavados em KPBS 3 x 5 minutos, e tampão acetado pH 6,5 0,2M 3 x 10 minutos, estando os mesmos adequados para a reação de marcação sendo o peróxido de hidrogênio na concentração final de 0,003% o responsável pela catalização da reação, a DAB na concentração final de 0,02% como cromógeno e o NAS na concentração final de 2,5% como intensificador da imunomarcação, sendo que após esta reação, ocorre a deposição de um produto insolúvel visível à microscopia de luz.

Uma vez ocorrida a reação, os cortes foram lavados novamente em 3 x 5 minutos em tampão acetato, seguida da lavagem em KPBS 3 x 5 minutos, a seguir foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e permaneceram em estufa à 37 °C por aproximadamente 18 h, para posteriormente serem submetidos ao método de osmicação.

4.4.1.6 Imuno-histoquímica com o método de dupla-imunofluorescência

O método de dupla imuno-fluorescência foi utilizado no presente estudo para se verificar a presença ou ausência de colocalização entre as células imunorreativas à UCN 3 e/ou ao CRF, devido ao fato de serem peptídeos pertencentes a mesma família, apresentarem semelhança estrutural e, pela presença de células UCN 3-ir e de células CRF -ir localizadas na mesma região hipotalâmica (PaV) de interesse.

Para a co-localização UCN3 e/ou CRF, secções de 40µm do nível do PaV foram utilizados para o método de dupla imunofluorescência para UCN 3 e CRF, como segue: os cortes “free-floating” selecionados foram lavados 3 x 10 minutos em solução tampão de fostato potássio (KPBS 0,02M, pH 7,4); incubação em solução de anticorpo primário policlonal anti-UCN 3 na concentração de 1:2000 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de Albumina Bovina (BSA) e heparina, por 48 h a 4 °C sob constante agitação. Após esse período, os cortes foram lavados em solução de KPBS 2 x 10 minutos e incubados em anticorpo secundário biotilado (anti-rabbit) na concentração de 1:200 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de Albumina Bovina (BSA) e heparina por 1 h, a seguir lavados em KPBS 2 x 10 minutos e incubados por 2 h em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) e streptavidina conjugada a CY3 na concentração de 1:200. Após esses procedimentos, os cortes foram lavados em KPBS 2 x 10 minutos estando os mesmos adequados para a segunda reação de imunofluorescência para CRF. Assim, os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-CRF na concentração de 1:3000 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de Albumina Bovina (BSA) e heparina por 48 h a 4 °C sob constante agitação. Em seguida, os cortes foram lavados em KPBS 2 x 10 minutos e incubados por 1 h em anticorpo secundário biotilado (anti-rabbit) conjugado a CY2 na concentração de 1:200 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% Albumina Bovina (BSA) e heparina. A seguir os cortes foram lavados em KPBS 2 x 10 minutos e montados em lamínas gelatinizadas, utilizando o tampão glicerol como meio de montagem e lamínulas de vidro para cobertura das mesmas. A seguir, as lâminas foram analisadas em microscopia confocal.

4.4.1.7 Imuno-histoquímica com o método de dupla-marcação

O método de dupla imunoperoxidase/imunofluorescência foi utilizado no presente estudo para se verificar a presença ou ausência de colocalização entre as células imunorreativas à UCN 3 e/ou a insulina nas células β do pâncreas de *Cebus apella*, uma vez que é reportado na literatura a existência dessa colocalização em pâncreas de roedores, correlacionando a possível funcionalidade do controle da homeostase energética pela UCN 3 estimular a secreção de insulina.

Para a colocação UCN3 e/ou insulina, uma amostra de pâncreas fresco de *Cebus apella* foi cuidadosamente congelada em nitrogênio líquido, para posteriormente ser congelada e emblocado em tissue-tek® para que fossem realizados cortes em criostato, na espessura de 20µm para serem utilizados para o método de dupla imunoperoxidase/imunofluorescência para UCN 3 e insulina, como segue: os cortes montados em lâminas foram lavados 3 x 10 minutos em solução tampão de fosfato potássio (KPBS 0,02M, pH 7,4); inibição da peroxidase endógena por 5 minutos, em solução de tampão KPBS (0,02M, pH 7,4) acrescida de 3% de peróxido de hidrogênio a 30%; lavagens em tampão KPBS (0,02M, pH 7,4) até sumirem as bolhas decorrentes da inibição da peroxidase endógena; incubação em solução de anticorpo primário policlonal anti-UCN 3 na concentração de 1:700 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 1% de Albumina Bovina (BSA) e heparina, por 48h a 4°C sob constante agitação. Após esse período, os cortes foram lavados em solução de KPBS 3 x 5 minutos e incubados em anticorpo secundário biotinilado (anti-rabbit) na concentração de 1:200 em solução de KPBS por 1 h, a seguir lavados em KPBS 3 x 5 minutos e incubados por 1 h em solução do complexo Avidina-Biotina, ambas na concentração de 1:100 em solução de KPBS. Após esses procedimentos, os cortes foram lavados em KPBS 3 x 5 minutos e prontos para a reação de marcação sendo o peróxido de hidrogênio na concentração final de 0,003% o responsável pela catalização da reação, a DAB na concentração final de 0,02% como cromógeno, sendo que após esta reação, ocorre a deposição de um produto insolúvel de cor marrom visível à microscopia de luz.

Após esses procedimentos, os cortes foram lavados em KPBS 2 x 10 minutos estando os mesmos adequados para a segunda reação de imunofluorescência para insulina. Assim, os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-insulina na concentração de 1:150 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100) acrescida de 3% de soro normal de burro por 48 h a 4 °C em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados em KPBS 2 x 10 minutos e incubados por 1 h em anticorpo secundário biotinilado (anti-rabbit) conjugado a CY2 na concentração de 1:200 em solução de “loaded” (KPBS 0,02M + 0,03% triton X-100). A seguir os cortes foram lavados em KPBS 2 x 10 minutos e montados em lâminas gelatinizadas, utilizando o tampão glicerol como meio de montagem e lamínulas de vidro para cobertura das mesmas. A seguir, as lâminas foram analisadas simultaneamente no mesmo microscópio (LEICA DMR, Alemanha) equipado em microscopia de luz para visualização das células UCN 3-ir

imunomarcadas pelo cromógeno DAB, e com epifluorescência para as células imunorreativas à insulina visualizadas com filtro de luz azul com comprimento de onda de excitação de 450-490 nm.

4.4.2 Métodos de Coloração

4.4.2.1 Intensificação pelo método de Osmicação

As lâminas com os cortes, após serem processadas pelo método de imuno-histoquímica, passaram pelo método de osmicação para realce da marcação e, conseqüentemente, melhor visualização de neurônios e axônios UCN 3-ir. Para isso, as lâminas com os cortes foram submetidas, inicialmente, à desidratação sob concentrações crescentes de alcoóis, para posteriormente serem deslipidificadas por imersão em xilol. Após isso, as lâminas foram reidratadas em concentrações decrescentes de alcoóis até água destilada, para assim serem imersas em ósmio à 4% diluído em água destilada (300µl/ 240ml) por 1 h; lavagem em água corrente por 15 minutos e banhos em água destilada; imersão em solução de TCH (0,12g/250ml) por 15 minutos, lavagem de 15 minutos em água corrente e banhos em água destilada; imersão em ósmio à 4% diluído em água destilada (300µl/ 240ml) por mais 1 h, com posterior lavagem de 15 minutos em água corrente. A seguir, as lâminas foram desidratadas em série crescente de álcoois e deslipidificadas em xilol, para que finalmente pudessem ser cobertas com meio de montagem permanente, o DPX e lamínulas de vidro. Estas lâminas foram analisadas em microscópio LEITZ equipado com campo claro e com campo escuro. Os campos de interesse com marcação de fibras e grupamentos celulares UCN-3ir foram fotografados em equipamento próprio acoplado ao microscópio.

4.4.2.2 Método de coloração de Nissl

A técnica de Nissl foi utilizada neste projeto como método histológico para estudo da citoarquitetura de grupamentos celulares e tratos. Este procedimento laboratorial foi necessário, durante nosso trabalho, em dois momentos: como método de coloração para posterior comparação com as marcações obtidas com as técnicas de imuno-histoquímica, e como método de contra-coloração após a realização da técnica de hibridização *in situ*. Desta forma, uma série de cortes histológicos de cada animal (n=3) foi lavada 2 x 10 minutos em solução tampão KPBS,

foram montados em lâminas gelatinizadas, sendo as mesmas mantidas em estufa à 37 °C por 12 h, para posteriormente serem submetidas à coloração de Nissl.

Portanto, seguindo o protocolo para o método de Nissl, o material preparado anteriormente foi desidratado em banhos de concentrações crescentes de álcool etílico (Synth) (concentrações: 50% por 3 minutos; 70% por 3 min; 95% 2x por 3 minutos; 100% 3x por 3 minutos), terminando em dois banhos de xilol (5 minutos no primeiro e 5 minutos no segundo). A seguir, foram reidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (3 minutos em cada; 100% 3x; 95% 2x; 70%; 50%). Posteriormente à reidratação, as lâminas foram colocadas por 60 segundos em uma solução de tionina à 0,25% (Sigma, St. Louis, EUA) diluída em 3,6% de hidróxido de sódio 1N e 20% de ácido acético 1M (Synth). Os cortes foram rapidamente lavados para a retirada do excesso de tionina por meio de um banho em água destilada para então serem novamente desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (concentrações: 50% por 3 minutos; 70% por 3 minutos; 95% 2x por 3 minutos; 100% 3x por 3 minutos). Por fim, se realizaram banhos de xilol, após os quais se procedeu à montagem das lâminas com lamínulas usando meio de montagem permanente DPX.

4.4.2.3 Método de coloração de Hematoxilina e Eosina

Os cortes de pâncreas, na espessura de 20µm, obtidos pela microtomia em criostato, foram corados em Hematoxilina e Eosina com o intuito de analisar a histologia do pâncreas, verificar a integridade do tecido, bem como servir de base como referência citoarquitetônica. Após a microtomia os cortes de pâncreas sofreram lavagem em água destilada, para então serem lavados (2 x 5 minutos) em álcool absoluto (100%), (2 x 5 minutos) em álcool 95%, e (1 x 5 minutos) em álcool 85% e 70%, respectivamente.

Posteriormente as lâminas foram lavadas por volta de 3 minutos em água corrente para retirada do excesso de álcool, sendo em seguida mergulhadas em hematoxilina de Harris (~2 minutos), retirando o excesso com água corrente (~5 minutos) e mergulhadas em eosina de Putt por 1 minuto retirando-se novamente o excesso com água corrente (~2 minutos). Seguiu-se a desidratação dos cortes, passando as lâminas (2 x 2 minutos) em álcool 95%, (2 x 2 minutos) em álcool absoluto (100%), (1 x 2 minutos) em álcool/xilol 50%, (1 x 2 minutos) em xilol I, II e III. Posteriormente, para a finalização da coloração de hematoxilina e eosina, as lâminas foram cobertas com meio de montagem DPX e lamínulas de vidro.

4.4.3 Hibridização *in situ* (HIS)

A técnica de hibridização *in situ* é um método muito específico e sensível para a detecção de sequências de DNA e RNA nos mais variados espécimes biológicos. É conceitualmente similar à interação antígeno-anticorpo das reações imuno-histoquímicas; no entanto, para a HIS considera-se o pareamento de bases de dupla-fita que compõem o DNA, tornando-se uma ferramenta em neurobiologia para a caracterização de grupamentos neuronais distintos (Bittencourt e Elias, 2007). Neste método, que teve como objetivo verificar a localização dos neurônios que expressam o RNAm da UCN 3, foram utilizados animais (n=3) perfundidos da mesma forma que no método da imuno-histoquímica supracitado. Assim, foram tomados os mesmos cuidados para que não houvesse a contaminação por RNases, ou seja, manipulação cuidadosa dos cortes com luvas, cortes estes que também foram obtidos em micrótomo de congelação. Além disso, as soluções que entraram em contato com os cortes foram autoclavadas e preparadas com água destilada, deionizada e com dietilpirocarbonato (DEPC), para evitar a ação das RNases. O protocolo seguido para este método foi a utilização de sonda anti-senso de RNAc marcada com ³⁵S, sendo que as técnicas para síntese de sondas, hibridização e localização autorradiográfica do sinal de RNAm foram adaptadas à partir de Simmons et al. (1989).

Vale ser ressaltado que os plasmídeos carreando seqüências da UCN 3 do macaco-prego foram subclonados e seqüenciados pelo Prof. Dr. Cláudio A. Casatti no laboratório do Dr. David A. Lovejoy (Department of Cell and System Biology, University of Toronto, Toronto, Ontário, Canada), cujas referidas etapas de extração de DNA, subclonagem e análise da sequência da UCN 3 seguem abaixo:

4.4.3.1 Extração de DNA

Para a subclonagem da Urocortina 3 foi utilizado o DNA porque não existem íntrons interrompendo o éxon que transcreve o pré=pro-hormônio da UCN 3. Os procedimentos de extração de DNA seguiram o protocolo modificado de Blin e Stafford (1976). Para isso, um grama do fígado do *Cebus apella*, congelado em nitrogênio líquido foi homogeneizado manualmente. O tecido dissolvido e homogeneizado foi incubado com meio de extração (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,1 M EDTA, 0,5% sodium dodecyl sulfate, SDS, e 20 µg/ml DNase-livre de RNase) a 37 °C durante uma hora em um incubador horizontal. Em prosseguimento, a amostra

foi incubada a 50 °C durante 150 minutos com Proeinase K (100 µg/ml) para lise celular. A fração não digerida foi removida por centrifugação e 1 ml do sobrenadante foi transferido para um novo tubo (2ml), adicionando um mesmo volume de fenol-Tris-HCl, pH 8.0. A amostra foi misturada por inverter os tubos várias vezes e a solução foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos. A fração diluída no fenol foi descartada e a fração aquosa foi transferida para um novo tubo (2ml) para repetição dos procedimentos de extração por fenol. Para remoção dos resíduos e fenol, a fração aquosa foi misturada com um mesmo volume de álcool isoamil/clorofórmio, sendo que, em seguida, o clorofórmio foi descartado e a extração foi repetida mais uma vez. Após a última extração, 2,5 volumes de etanol a 100% a 4 °C e 0,1 volume de acetato de sódio a 3M, foram adicionados a fração aquosa para precipitação do DNA. O DNA precipitado foi submetido a centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos e lavado duas vezes com 1 ml de etanol a 70%, e rapidamente secado para permitir a evaporação do etanol. O pelet foi finalmente dissolvido em 250 µl de água estéril (DNase e RNase livre). A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria usando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

4.4.3.2 Subclonagem

Para a amplificação gênica foi empregado o método do "nested e semi-nested" PCR que consiste na amplificação inicial de um longo segmento do DNA. Esse DNA amplificado é usado para uma nova reação de PCR empregando primers que amplificam segmentos menores. Desse modo, foi utilizado inicialmente os primers hUCNIIIF1 (Forward outer) e hUCNIIIR1 (Reverse outer), seguido do uso das seguintes associações de primers na segunda reação de PCR, hUCNIIIF1 e hUCNIIIR2 (Reverse inner); hUCNIIIF2 (Forward inner) e hUCNIIIR1; hUCNIIIF2 e hUCNIIIR2.

Os seguintes primers foram desenhados e usados:

hUCNIIIF2F1 (forward outer)	hUCNIIIR2R1 (reverse outer)
atgctgatgccgtccacttc	tcctccaatttgcgcatc
comprimento: 21 bp	comprimento: 21 bp
temperatura de melting: 70°C	temperatura de melting: 64°C
%gc: 57 %	%gc: 50%
Estrutura secundária: nenhuma	Estrutura secundária: nenhuma
Dímeros de primers: nenhum	Dímeros de primers: nenhum

hUCNIIIe2F2 (Forward inner)	hUCNIIIe2R2 (Reverse inner)
cgcaccaagttcaccctgtccctcga	cctgctgagcaagaggagcttcac
comprimento: 26 bp	comprimento: 26 bp
temperatura de melting: 79°C	temperatura de melting: 73°C
%gc: 61 %	%gc: 60 %
Estrutura secundária: nenhum	Estrutura secundária: fraca
Dímeros de primers: sim	Dímeros de primers: nenhum

Para essas reações de PCR foram empregadas as seguintes soluções em tubos para PCR com 50 µl de capacidade na primeira reação de PCR: a) 29 µl de água estéril (RNase e DNA free); b) 5 µl do tampão para PCR com (NH₄)₂ SO₄ - MgCl₂ (Fermentas); c) 1mM de MgCl₂ (Fermentas); d) 2 µl de 10 mM de cada dNTPs (400 µM na solução final, R0192, Fermentas); e) 2 µl de cada primer (0,2 µM na solução final); f) 120 ng de DNA; g) 4 µl de taq DNA polimerase (1U/µl, EP0404, LC recombinat, Fermentas).

Para a segunda reação de PCR, 3 µl do DNA amplificado na primeira reação foi empregado para a segunda reação, empregando as mesmas soluções citadas e os primers específicos.

Os DNAs amplificados da segunda reação foram purificados do gel de agarose empregando o kit (Purelink Quick Gel Extraction Kit, K2100-12, Invitrogen). Esses DNAs purificados foram ligados em plasmídeos pCR2.1 (K4550-40, cloning kit, Invitrogen) e transfectados quimicamente em bactérias *E.coli*. Os clones foram selecionados pelo sistema blue/white screening. As bactérias selecionadas foram submetidas a extração dos plasmídeos. Esses foram submetidos a enzima de restrição EcoR1 para confirmar a presença correta do inserto. Em seguida, os plasmídeos foram enviados para sequenciamento comercial (AGCT Company, Toronto, On, Canada) do inserto.

4.4.3.3 Análise da sequência da UCN 3 de *Cebus apella*

A sequência de nucleotídeos do exon 2 da UCN 3 de *Cebus apella* apresentou 483 nucleotídeos que traduziam um pré-pro-hormônio de 161 aminoácidos. A sequência de aminoácidos do pré-pro-UCN 3 de *Cebus apella* demonstrou uma elevada homologia com humanos (88%), enquanto, comparando com ratos a homologia foi menor (65%). Foram

observadas 21 substituições de aminoácidos entre as sequências do *Cebus* e humano e 61 substituições de aminoácidos entre *Cebus* e ratos. Assim como em humano, a sequência da UCN 3 do *Cebus* mostra uma deleção de três aminoácidos nas posições 78-80, não observada em ratos. As substituições observadas entre *Cebus* e humanos parecem não ter consequências funcionais. É interessante salientar, que a maior porcentagem de substituições ocorreram na sequência que corresponde ao peptídeo críptico. Enquanto, na sequência do peptídeo maduro ocorreram apenas duas substituições de aminoácidos entre *Cebus* e humanos, portanto, apresentando uma homologia de 95% na sequência bioativa da molécula. As sequências preservadas do peptídeo maduro entre várias espécies mostraram que a UCN 3 apresentou poucas modificações durante a evolução (C.A.Casatti).

4.4.3.4 Técnica de Hibridização *in situ*

De forma resumida, a técnica de *HIS* se divide em: pré-tratamento do tecido, linearização do plasmídeo e isolamento do *template*, transcrição *in vitro* com o preparo da sonda, hibridização, pós-hibridização e detecção do sinal de hibridização, como se segue:

Pré-tratamento (desproteínização e neutralização): previamente à hibridização, deve-se realizar o preparo do material. Assim, os cortes foram selecionados e montados em lâminas estéreis com aderência eletrostática Superfrost plus (Fisher Scientific) e pré-tratados. O pré-tratamento possibilita uma melhor penetração da sonda no tecido pois as proteínas que se encontrarem associadas ao DNA ou RNA são eliminadas, usando-se para esse fim tratamentos enzimáticos proteolíticos e ataques ácidos com enzimas proteolíticas de baixa especificidade, como a proteinase K. O pré-tratamento consistiu nas seguintes etapas: 1) fixação em 4% de formaldeído em 0,1M PBS por 5 minutos; 2) desproteínização com proteinase K (10mg/mL) em solução contendo tampão 0,05M EDTA e 0,1M Tris em pH 8 por 30 minutos a 37 °C); 3) acetilação com solução de TEA-HCL contendo 0,25% de anidrido acético por 10 minutos; 4) desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100% 1 minuto cada); 5) deslipidificação em xilol (15minutos) e rápida reidratação em álcool etílico 100% e 95% (1 minuto cada). As lâminas secaram em temperatura ambiente e foram acondicionadas em caixa com dessecantes em freezer a -20 °C até a realização da hibridização dos tecidos.

Linearização do plasmídeo e isolamento do *template*: a técnica de hibridização *in situ* com ^{35}S é utilizada para a localização e a quantificação de RNA mensageiros de interesse. As sondas utilizadas nesse método foram preparadas a partir de plasmídeos contendo a sequência do DNA complementar (DNAC) da UCN 3. Esses plasmídeos (DNA circular bacteriano) resistentes ao antibiótico ampicilina, carreando as sequências de UCN 3 (amostra 3A), foram colocados em meio de cultura adequado com a utilização do antibiótico ampicilina para o crescimento apenas dos plasmídeos que apresentavam a sequência da UCN 3 e que fossem resistentes a esse antibiótico, com a finalidade de aumentar a quantidade de DNA para a produção da sonda (multiplicação dos plasmídeos). Após isso, procedeu-se ao isolamento do plasmídeo utilizando *kits* comerciais que consistem em colunas de resina e variadas concentrações de tampão, que permitiram a purificação da amostra com a obtenção do *pellet*. Assim, ao *pellet* foi adicionado solução tampão Tris-EDTA para que fosse realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose (figura 1) para verificar-se a integridade dos plasmídeos circular e linearizado. Uma vez verificada a integridade, procedeu-se à transcrição *in vitro* da sonda, uma vez que houve a linearização dos plasmídeos por meio da utilização de uma enzima de restrição com o intuito de se obter o DNAC da UCN 3 necessário para a produção da sonda.

Transcrição *in vitro* e preparo da sonda: nesta etapa, as sondas de RNAm se tornaram radioativas por incorporação de radioisótopo ^{35}S . Assim, a sonda anti-sense foi sintetizada a partir do cDNA do genoma total do macaco-prego (*Cebus apella*) contido no plasmídeo linearizado. Para isso realizou-se transcrição *in vitro*, utilizando ^{35}S -UTP e uma polimerase específica para o plasmídeo (SP6, Promega, Madison, EUA). As sondas foram purificadas em microcolunas de resina (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), após a digestão com RQ1 DNase (Promega). Vale ser ressaltado que para a produção da sonda sense da UCN 3 foi utilizada a enzima de transcrição T7 (T7, Promega, Madison, EUA).

Figura 1 - Gel de eletroforese realizado com o DNAc linearizado e não linearizado da UCN 3 de *Cebus apella*

A) Ladder de 1kb (Invitrogen) utilizado como controle das bandas evidenciando a quantidade dos pares de base (pb). B) imagem da banda do DNA circular (DNAc) UCN 3, na qual podemos visualizar que a banda se enquadra na faixa de 5090 a 4072 (4223pb), diferentemente do que ocorre para o DNA linearizado (C) que se apresenta com bandas divididas, indicando a linearização do DNA circular. A comprovação da linearização permitiu a produção da sonda de RNAc da Urocortina 3. Abreviaturas: DNA, ácido desoxirribonucleico, DNAc, DNA circular, pb, pares de base, UCN 3, urocortina 3. FONTE: Batagello, 2011.

Hibridização: nesta etapa há a adição da sonda a um tampão de hibridização que será aplicado às lâminas com o tecido pré-tratado. Assim, as sondas foram diluídas em solução de hibridização (10^6 com/mL), que consistiu de 50% formamida (Fischer Scientific, Pittsburgh, EUA), 0,01% de SDS, 0,01% de Na Thio, 0,2% de 5M ditiotretitol (DTT), 10 mM Tris-HCl (Gibco-BRL, Rockville, EUA), 0,01% DNA de espermato de salmão, 0,01% RNAt de levedura, 0,05% RNA total de levedura (Sigma), 10 mM DTT, 10% sulfato de dextran, 0,3M cloreto de

sódio (NaCl), 1 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, pH 8,0) e 1 x solução de Denhardt (Sigma, St. Louis, EUA). Após isso, cada lâmina com o tecido pré-tratado recebeu 200µL de solução de hibridização contendo a sonda de RNAc para UCN 3 marcada com ^{35}S -UTP e uma lamínula flexível para sua cobertura, onde permaneceu incubada à 56 °C por aproximadamente 16 h, sendo que no dia seguinte iniciou-se a pós-hibridização.

Pós-hibridização: nesta etapa as lamínulas foram removidas por meio de banho em tampão 2 x SSC, quando, então, a série foi incubada em solução com 0,002% de RNase A (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemanha) em 0,5M NaCl mM Tris-HCl e 1mM EDTA (pH 8), durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas passaram por banhos de estringência crescente com SSC, tampão esse de pH fisiológico (2x SSC à 50°C por 1 h, 0,2 x SSC à 55 °C por 1 h e 0,2 x SSC à 60 °C por 1 h, sempre com adição de 0,02% de 5M DTT para a estabilização do ^{35}S). Finalmente, o tecido foi desidratado em álcool etílico à 70% + 0,02 x SSC + 0,02% de 5M DTT durante o período de 10 minutos. As lâminas secaram ao ar livre em temperatura ambiente, prosseguindo-se então à detecção do sinal de hibridização.

Deteção do sinal de hibridização: para isso, as lâminas foram expostas a um filme autorradiográfico (BMR-2, Kodak, Rochester, EUA) em cassetes apropriados, isolados do contato com luz ambiente, por aproximadamente 36 h. Após esses procedimentos, os filmes foram revelados através do uso de solução de revelação e, posteriormente, de solução de fixação. Após a análise do filme autorradiográfico e detectado o sinal de hibridização, as lâminas foram mergulhadas em emulsão autorradiográfica líquida (NTB2, Kodak). Para isso, as lâminas foram deixadas secar por 3 horas à 37 °C e armazenadas à 4 °C em caixas protegidas da luz e com dessecadores durante cerca de 30 dias, dependendo esta permanência na emulsão da qualidade do sinal obtida no filme autorradiográfico. Decorridos os tempos necessários, as lâminas foram reveladas com revelador D-19 (Kodak), os cortes contra-corados através do método de Nissl com tionina a 0,25%, desidratados em série crescente de álcoois, deslipidificados em xilol e as lâminas cobertas com meio permanente DPX e lamínulas de vidro.

Figura 2 - Mapa da sonda de RNAc da UCN 3 de primata não-humano (*Cebus apella*)

Cebus apella UROCORTINA III (F2-R1) - amostra 3A

VECTOR: pCR2.1

Tamanho: 323 bp

Posição sense

NORMAL (LEITURA SENSE) – USAR T7 PARA PRODUIR SENSE SONDA

Enzimas de restrição: SpeI, BamHI, SacI, KpnI, HindIII PARA LINEARIZAÇÃO

Para transcrição: utilizar T7

										<i>lacZα</i> ATG												<i>Hind</i> III					<i>Kpn</i> I			<i>Sac</i> I	<i>Bam</i> HI			<i>Spe</i> I
M13 Reverse Primer										CAG	GAA	ACA	GCT	ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	GTA	CCG	AGC	TCG	GAT	CCA	CTA						
										GTC	CTT	TGT	CGA	TAC	TGG	TAC	TAA	TGC	GGT	TCG	AAC	CAT	GGC	ICG	AGC	CTA	GGT	GAT						

										<i>Bst</i> XI	<i>Eco</i> RI											
										↓	↓											
GTA	ACG	GCC	GCC	AGT	GTG	CTG	GAA	TTC	GCC	CTT												
CAT	TGC	CGG	CGG	TCA	CAC	GAC	CTT	AAG	CGG	GA												

CCTGCTGAGCAAGAGGAGCTTCCACCATCTGCCAGCCAAGACACCTCTTCAGGAGTGGAGGAGGAGGGCAAAGGGAAAAGGACT
 TTCCTCTCTCCGGGGCCAGGGGCGGAGCTGGGGGCACCCGGTACAAATACGTGTCCAGGCACAGCCTAGGGGAAAGGCACACC
 AGGACACAGCCAAGAGTCCCGAGCGCACCAAGTTACCCCTGTCCCTCGACGTCCCCACCAACATCATGAACCACCTCTTCAGCATCG
 CCAAGGCCAAGAACCTGCGTGCCAGGCCGCTGCCAAGCCACCTG**ATGGCGCAAATTGGGAGGA**

																				<i>Eco</i> RI														
																				↓														
																				AG	GGC	GAA	TTC	TGC										
																				TTC	CCG	CTT	AAG	ACG										

										<i>Eco</i> RV			<i>Bst</i> XI			<i>Not</i> I			<i>Xho</i> I			<i>Nsi</i> I	<i>Xba</i> I			<i>Apa</i> I		
AGA	TAT	CCA	TCA	CAC	TGG	CGG	CCG	CTC	GAG	CAT	GCA	TCT	AGA	GGG	CCC	AAT	TCG	CCC	TAT									
TCT	ATA	GGT	AGT	GTG	ACU	GCC	GGC	GAG	CTC	GTA	CGT	AGA	TCT	CCC	GGG	TTA	AGC	GGG	ATA									

										T7 Promoter										M13 Forward (-20) Primer									
AGT	GAG	TCG	TAT	TAC	AAT	TCA	CTG	GCC	GTC	GTT	TTA	CAA	CGT	CGT	GAC	TGG	GAA	AAC											
TCA	CTC	AGC	ATA	ATG	TTA	AGT	GAC	CGG	CAG	CAA	AAT	GTT	GCA	GCA	CTG	ACC	CIT	TTG

Mapa da sonda de *Cebus apella*, no qual podemos visualizar o desenho do plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] de 3.9kb que carrega o inserto de 323 pares de base para a confecção da sonda de RNAc da UCN 3. Os primers estão indicados pelas cores verde e amarelo, no sentido sense. Para a produção da anti-sense foi utilizada a enzima de transcrição T7. FONTE: Batagello, 2011.

Figura 3 - Análise de identidade da UCN 3 de *Cebus apella* com as sequências de rato e humano, após o uso do software BLAST

F1

```
atg ctg atg ccg gtc cac ttc ctg ctg gtc ctg ctg ctg ctc ctg 45
M L M P V H F L L V L L L L L 15
ggg ggc ccc agg aca ggc ctc ccc cac aag ttc tac aag gcc aag 90
G G P R T G L P H K F Y K A K 30
ccc aac ttc agc tgc ctc aac acc gcc ctg tct gag acc gag aag 135
P N F S C L N T A L S E T E K 45
```

F2

```
agc cag ggg cag gac gca tcc ctg ctg agc aaa agg agc ttc cat 180
S Q G Q D A S L L S K R S F H 60
cat ctg ccc agc caa gac acc tct tca gga gtg gag gag gag ggc 225
H L P S Q D T S S G V E E E G 75
aaa ggg aaa agg act ttc ctc ctc tcc ggg gcc agg ggc gga gct 270
K G K R T F L L S G A R G G A 90
ggg ggc acc cgg tac aaa tac gtg tcc cag gca cag ccc agg gga 315
G G T R Y K Y V S Q A Q P R G 105
```

R2

```
aag gca cac cag gac aca gcc aag agt ccc cag cgc acc aag ttc 360
K A H Q D T A K S P Q R T K F 120
acc ctg tcc ctc gac gtc ccc acc aac atc atg aac cac ctc ttc 405
T L S L D V P T N I M N H L F 135
(continua)
```

(continuação)

```

agc atc gcc Aag gcc aag aac ctg cgt gcc cag gcc gct gcc aac 450
S   I   A   K   A   K   N   L   R   A   Q   A   A   A   N   150
                                     R1
gcc cac ctg atg gcg caa att ggg agg aag aag 483
A   H   L   M   A   Q   I   G   R   K   K   161

```

	1	10	20	30	40	50
Rato	MLMPTYFLLLLLLLLLGGPRTSLSHKFYNAGPVFSCNLTALSEVKNKLED					
<i>C. apella</i>	<u>MLMPVHFLLVLLLLLLGGPRTGLPHKFYKAKPNFSCNLTALSETEKSQGD</u>					
Humano	MLMPVHFLLLLLLLLLLGGPRTGLPHKFYKAKPIFSCNLTALSEAEKGQWED					
	51	60	70	80	90	100
Rato	VPVLSKKNFGYLPQTQDPSGEEDEQKHIKNKRTFSDAVGGNGGRSIRYRY					
<i>C. apella</i>	ASLLSKRSFHHLPSQDTSSGVEEEGKG...KRTFLLSGARGGAGGTRYKY					
Humano	ASLLSKRSFHYLRSRDASSGEEEEGKE...KKTFPISGARGGARGTRYRY					

	101	110	120
Rato	QSQAQPKGKLYPDKVKNDRG		
<i>C. apella</i>	VSQAQPRGKAHQDTAKSPQR		
Humano	VSQAQPRGKPRQDTAKSPHR		

(continua)

(continuação)

Peptídeo maduro

	1	10	20	30	40
Danio	SQVTLSLDVPTNIMNILEFNIKAKNLRKADDDNARLLAQI				
Fugu	SRLTLSLDVPTNIMNVLFDAKAKNLRKAAENARLLAHI				
Xenopus	TKFTLSLDVPTNLMNILEFDIAKAKNIRAKAAANAQLMAQI				
Galinha	TKVTLSLDVPTNIMNILEFNIKAKNLRKAAANAQLMAQI				
Rato	TKFTLSLDVPTNIMNILEFNIDKAKNLRKAAANAQLMAQI				
<i>C. apella</i>	TKFTLSLDVPTNIMNHLEFSIAKAKNLRQAANAHLMAQI				
Humano	TKFTLSLDVPTNIMNLEFNIKAKNLRQAANAHLMAQI				
Camundongo	TKFTLSLDVPTNIMNILEFNIDKAKNLRKAAANAQLMAQI				
Cachorro	TKFTLSLDVPTNIMNILEFNIKAKNLQAKAANAHLMAQI				
Rato	MLMPTYFLLL	LLLLLGGPRT	SLSHKFYNAG	PVFSClNTAL	40
<i>C. apella</i>	MLMPVHFLLV	LLLLLGGPRT	GLPHKFYKAK	PNFSClNTAL	
Humano	MLMPVHFLLL	LLLLLGGPRT	GLPHKFYKAK	PIFSClNTAL	
Rato	SEVKKNKLED	VPVLSKKNFG	YLPTQDPSGE	EEDEQKHlKN	80
<i>C. apella</i>	SETEKSQGQD	ASLLSKRSFH	HLPSQDTSSG	VEEEGKG...	
Humano	SEAEKGQWED	ASLLSKRSFH	YLRSDASSG	EEEEGKE...	

(conclusão)

Rato	KRTFSDAVGG NGGRSIRYRY QSQAQPKGKL YPDVKVNDRG 120
C. apella	KRTFLLSGAR GGAGGTRYKY VSQAQPRGKA HQDTAKSPQR
Humano	KKTFPISGAR GGARGTRYRY VSQAQPRGKP RQDTAKSPHR

Rato	TKFTLSLDVP TNIMNILEFNI DKAKNLRAKA AANAQLMAQI 160
C. apella	TKFTLSLDVP TNIMNHLEFSI AKAKNLRAQA AANAHLMAQI
Humano	TKFTLSLDVP TNIMNLEFNI AKAKNLRAQA AANAHLMAQI

Rato	GKKK	164
C. apella	GRKK	
Humano	GRKK	

Cebus apella x humano = 88% homologia

Cebus apella x rato = 65% homologia

Cebus apella x humano = 21 substituições de aminoácidos

Cebus apella x rato = 61 substituições de aminoácidos

Podemos verificar pelas caixas em cinza claro os nucleotídeos que se conservam nas diferentes sequências da Urocortina 3 nas espécies; nas caixas brancas podemos visualizar os nucleotídeos substituídos. Notar a conservação de 88% da sequência da UCN 3 quando comparamos entre as espécies de *Cebus apella* e humano, e 65% quando comparamos entre as espécies de *Cebus apella* e rato. FONTE: Batagello, 2011.

Figura 4 - Estrutura do prepro-hormônio UCN 3 de *Cebus apella***A. Estrutura do prepro-UCN 3 de macaco-prego**

atg	ctg	atg	ccg	gtc	cac	ttc	ctg	ctg	gtc	ctg	ctg	ctg	ctc	ctg	45
M	L	M	P	V	H	F	L	L	V	L	L	L	L	L	15
ggg	ggc	ccc	agg	aca	ggc	ctc	ccc	cac	aag	ttc	tac	aag	gcc	aag	90
G	G	P	R	T	G	L	P	H	K	F	Y	K	A	K	30
ccc	aac	ttc	agc	tgc	ctc	aac	acc	gcc	ctg	tct	gag	acc	gag	aag	135
P	N	F	S	C	L	N	T	A	L	S	E	T	E	K	45
agc	cag	ggg	cag	gac	gca	tcc	ctg	ctg	agc	aaa	agg	agc	ttc	cat	180
S	Q	G	Q	D	A	S	L	L	S	K	R	S	F	H	60
cat	ctg	ccc	agc	caa	gac	acc	tct	tca	gga	gtg	gag	gag	gag	ggc	225
H	L	P	S	Q	D	T	S	S	G	V	E	E	E	G	75
aaa	ggg	aaa	agg	act	ttc	ctc	ctc	tcc	ggg	gcc	agg	ggc	gga	gct	270
K	G	K	R	T	F	L	L	S	G	A	R	G	G	A	90
ggg	ggc	acc	cgg	tac	aaa	tac	gtg	tcc	cag	gca	cag	ccc	agg	gga	315
G	G	T	R	Y	K	Y	V	S	Q	A	Q	P	R	G	105
aag	gca	cac	cag	gac	aca	gcc	aag	agt	ccc	cag	cgc	acc	aag	ttc	360
K	A	H	Q	D	T	A	K	S	P	Q	R	T	K	F	120
acc	ctg	tcc	ctc	gac	gtc	ccc	acc	aac	atc	atg	aac	cac	ctc	ttc	405
T	L	S	L	D	V	P	T	N	I	M	N	H	L	F	135
agc	atc	gcc	Aag	gcc	aag	aac	ctg	cgt	gcc	cag	gcc	gct	gcc	aac	450
S	I	A	K	A	K	N	L	R	A	Q	A	A	A	N	150
gcc	cac	ctg	atg	gcg	caa	att	ggg	agg	aag	aag					483
A	H	L	M	A	Q	I	G	R	K	K					161

B. Peptídeo críptico e sinal

	1	10	20	30	40	50
	fi	fi	fi	fi	fi	fi
Rato	MLMPTY	FLLLLLLLLLGGPRT	SLSHKFYNAGPV	FSC	LNTAL	SEVKKNKLED
Cebus	MLMPVHFLLV	LLLLLLGGPRT	TGLPHKFKYKAKPN	FSC	LNTAL	SETEKSQGGQD
Humanos	MLMPVHFLL	LLLLLLLLGGPRT	TGLPHKFKYKAKPI	FSC	LNTAL	SEAEKGQWED

	51	60	70	80	90	100
	fi	fi	fi	fi	fi	fi
Rato	VPVLSKKNF	GYLPTQDPSG	EEDEQKH	IKNKRTFSD	AVGGNGGR	SIRYRY
Cebus	ASLLSKRSF	HHLPSQDTSS	GVEEEGKG...	KRTFLLSG	ARGGAGG	TRYKY
Humanos	ASLLSKRSF	HYLRSRDASS	GEEEEEGKE...	KKTFPI	SGARGG	ARGTRYRY

	101	110	120
	fi	fi	fi
Rato	QSQAQPK	GKLYPDKV	KNDRG
Cebus	VSQAQPRG	KAHQDTAK	SPQR
Humanos	VSQAQPRG	KPRQDTAK	SPHR

C. Peptídeo UCN 3

	1	10	20	30	40
	fi	fi	fi	fi	fi
Danio	SQV	TLSLDVPTN	IMN	ILFNIAKAKN	LRAKADDNARLLAQI
Fugu	SRL	TLSLDVPTN	IMNV	LFDVAKAKN	LRAKAAENARLLAHI
Xenopus	TKFT	TLSLDVPTN	LMN	ILFDIAKAKN	IRAKAAANAQLMAQI
galinha	TKV	TLSLDVPTN	IMN	ILFNIAKAKN	LRAKAAANAQLMAQI
Rato	TKFT	TLSLDVPTN	IMN	ILFNIDKAKN	LRAKAAANAQLMAQI
Cebus	TKFT	TLSLDVPTN	IMN	HLFSIAKAKN	LRAQAAANAHLMAQI
Humanos	TKFT	TLSLDVPTN	IMN	LLFNIAKAKN	LRAQAAANAHLMAQI
camundongos	TKFT	TLSLDVPTN	IMN	ILFNIDKAKN	LRAKAAANAQLMAQI
Cão	TKFT	TLSLDVPTN	IMN	ILFNIAKAKN	LQAKAAANAHLMAQI

A: sequências dos nucleotídeos subclonadas do exon 2 do gene da Urocortina 3 de *Cebus apella*. B: Sequências dos aminoácidos do gene da UCN 3 de *Cebus apella* e seu alinhamento com as sequências de ratos e humanos. Os aminoácidos marcados representam resíduos diferentes de uma espécie em relação as outras duas. C: Sequência dos aminoácidos do peptídeo maduro da Urocortina 3 de *Cebus apella* e seu alinhamento com as sequências de outras espécies. Os aminoácidos marcados representam resíduos que são conservados em outras espécies. Obs: Danio, *Danio rerio*, zebrafish; Fugu, *Tetraodon nigroviridis*, pufferfish; Xenopus, *Xenophus laevis e tropicalis*. FONTE: Batagello, 2012.

4.4.4 Forma de análise

Os dados obtidos através do método de imuno-histoquímica, ou seja, a localização de corpos celulares UCN 3-ir, foram analisados por microscópio óptico Leica DMR (Leica, Wetzlar, Alemanha) com campo claro e, os sítios marcados foram assinalados em esquemas obtidos através dos atlas utilizados, “A stereotaxic Atlas of the brain of the Cebus monkey” (Manocha, 1968) e o “The Rhesus Monkey Brain – In stereotaxic coordinates” (Paxinos, 2009). Quanto às fibras UCN 3-ir, elas foram mapeadas também em microscópio Leica equipado com campo escuro e assinaladas em cópias das folhas dos atlas correspondentes às regiões onde foram encontradas. A quantidade de células e fibras UCN 3-ir foi avaliada de forma semiquantitativa entre as regiões positivamente marcadas, de acordo com escala de graduação do padrão de imunomarcção previamente definida. Após a realização do mapeamento, foi confeccionada uma tabela para melhor visualização das regiões de interesse imunomarcadas e, que também apresenta corpos neuronais que expressam o RNAm da Urocortina 3.

As imagens foram adquiridas em câmera digital acoplada ao microscópio Leica, da marca Nikon – *digital sight* DS-Ri1 (Nikon Corporation, Japão), utilizando-se o software de captura de imagens NIS – Elements BR 3.0 (Nikon Corporation, Japão). Para a análise da dupla imuno-histoquímica UCN 3/insulina, as lâminas foram analisadas em microscópio Leica equipado com epifluorescência Leica EL6000 (Leica, Wetzlar, Alemanha). A análise da dupla imunofluorescência UCN 3/CRF foi realizada utilizando-se o microscópio confocal ZEISS modelo LSM 510 (ZEISS, Carl Zeiss Microscopy, Germany), no Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

Imagem da fotomontagem digital das fibras do núcleo paraventricular do hipotálamo ao núcleo supra-óptico foi adquirida em microscópio Nikon ECLIPSE 80i ligado a computador Dell equipado com software Stereo Investigator 9.03 - Módulo "Virtual Slice" (MBF Bioscience).

Como referência citoarquitetônica foi realizada a técnica de coloração e contra-coloração de Nissl e, comparação com os locais onde foram obtidas marcações para UCN 3, tanto as imunorreativas quanto as de hibridização *in situ*, para posterior denominação correta da região de interesse. Foi utilizado o programa Adobe Photoshop CS, versão 8.0.1 de 2003, apenas para ajustes de brilho e contraste das imagens capturadas.

5 RESULTADOS

5.1. Técnica de imuno-histoquímica

5.1.1 *Titulação do anticorpo anti-UCN 3*

A técnica de titulação foi realizada utilizando seis concentrações diferentes do anticorpo anti-UCN 3, em cortes do PaV, de acordo com curva padrão de titulação: 1:1000, 1:3000, 1:7000, 1:10000, 1:20000 e 1:30000. Como pode ser visualizado nas imagens a seguir, a concentração ideal do anticorpo anti-UCN 3 foi a de 1:7000, pois apresentou corpos celulares bem definidos, com grânulos citoplasmáticos, bem como a presença de fibras e varicosidades UCN 3-ir, o que não ocorreu nas demais concentrações utilizadas na técnica de titulação.

A seguir é apresentada imagem com fotomicrografias dos cortes de PaV, nos quais foram utilizadas as seis diferentes concentrações do anticorpo anti-UCN 3.

Figura 5. Fotomicrografias representativas, em campo claro, da titulação do anticorpo anti-UCN 3 em cortes do nível do PaV de *Cebus apella* nas diferentes concentrações, pelo método da imunoperoxidase indireta.

(A) Imagem em 10x da titulação na concentração de 1:1000.(B) Imagem em 10x da titulação na concentração de 1:3000. (C) Imagem em 10x da titulação na concentração de 1:7000. (D) Imagem em 10x da titulação na concentração de 1:10000.(E) Imagem em 10x da titulação na concentração de 1:20000. (F) Imagem em 10x da titulação na concentração de 1:30000. Notar que na concentração de 1:7000 as células e fibras UCN 3-ir na região do PaMD se apresentaram com padrão de imunomarcção ideal para a técnica utilizada. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; JPLH, parte justaparaventricular do hipotálamo lateral; PaMD, núcleo paraventricular do hipotálamo, parte magnocelular dorsal. Escala de barras: 100 μm. FONTE: Batagello, 2011.

5.1.2 Técnica de adsorção

Por meio da técnica de adsorção, realizada com os três peptídeos pertencentes à família de peptídeos do CRF (UCN 3, UCN 1 e CRF), foi possível se verificar e comprovar a especificidade do anticorpo anti-UCN 3 utilizado em nosso trabalho, devido a ausência de imunomarcação quando da utilização do peptídeo UCN 3, nas cinco diferentes concentrações (1mg/ml;0,5mg/ml;0,1mg/ml;0,05mg/ml;0,01mg/ml). Quando observamos os cortes nos quais foi realizado controle para a técnica de adsorção utilizando apenas o anticorpo anti-UCN 3, visualizamos a presença de células e fibras UCN 3-ir, confirmando a especificidade do anticorpo anti-UCN 3. Após a realização da adsorção para os peptídeos UCN 1 e CRF, observamos a presença células e fibras UCN 3-ir, tanto nos cortes adsorvidos separadamente com cada peptídeo, nas cinco diferentes cocncentrações, como nas reações-controle nas quais apenas utilizou-se o anticorpo anti-UCN 3.

A seguir é apresentada tabela com o resumo dos dados obtidos para a técnica de adsorção e, são apresentadas imagens de fotomicrografias da adsorção realizada para os 3 peptídeos da família do CRF com a utilização do anticorpo anti-UCN 3 e dos referidos peptídeos de interesse: UCN 3, UCN 1 e CRF.

Tabela 3. Características de competição da UCN 3 no sistema nervoso central de primata não-humano (*Cebus apella*) após realização da técnica de adsorção seguida de imunoperoxidase indireta para UCN 3 na concentração de 1:7000 em cortes do nível do paraventricular do hipotálamo (PaV).

Peptídeo (concentração em mg/ml)	Imunomarcação	
	PaV (células UCN 3 -ir)	VMHdm (fibras UCN 3-ir)
UCN 3		
Controle	+	++++
1mg/ml	-	-
0,5mg/ml	-	-
0,1mg/ml	-	-
0,05mg/ml	-	-
0,01mg/ml	-	-
UCN 1		
Controle	+	+++
1mg/ml	+	+++
0,5mg/ml	+	+++
0,1mg/ml	+	+++
0,05mg/ml	+	+++
0,01mg/ml	+	+++
CRF		
Controle	+	+++
1mg/ml	+	+++
0,5mg/ml	+	+++
0,1mg/l	+	+++
0,05mg/ml	+	+++
0,01mg/ml	+	+++

Intensidade de imunomarcação foi graduada usando uma escala de quatro pontos (++++), com (++++) indicando marcação cuja intensidade foi indistinguível da obtida usando o controle com anticorpo (não pré-adsorção), e o (-) indica completa ausência de marcação específica. Notar a especificidade do anticorpo primário anti-UCN 3 quando da utilização do peptídeo UCN 3, com ausência de imunomarcação para corpos celulares e fibras.

Figura 6. Fotomicrografias representativas, em campo claro, do teste de adsorção para UCN 3 em cortes do PaV de *Cebus apella*, utilizando o peptídeo UCN 3 nas diferentes concentrações (A-E) demonstradas em menor aumento e, (A'-E') em maior aumento.

Notar que em todas as concentrações do peptídeo UCN 3 utilizadas houve ausência de imunomarcagem denotando especificidade de ligação do anticorpo anti-UCN 3 ao peptídeo UCN 3. Nas imagens do controle da reação (F e F') podemos visualizar a presença de imunorreatividade da UCN 3, sendo que célula UCN 3-ir é indicada pela seta preta. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo, PaMD, parte magnocelular dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo, PaV, núcleo paraventricular do hipotálamo. Escala de barras: 50µm (A-F), 20µm (A'-F'). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 7. Fotomicrografias representativas, em campo claro, do teste de adsorção para UCN 3 em cortes do PaV de *Cebus apella*, utilizando o peptídeo UCN 1 nas diferentes concentrações (A-E) demonstradas em menor aumento e, (A'-E') em maior aumento.

Notar que em todas as concentrações utilizadas do peptídeo UCN 1, houve a presença de corpos celulares UCN 3-ir demonstrando que o anticorpo é específico ao peptídeo UCN 3 e não ao peptídeo UCN 1 utilizado nesta adsorção. Nas imagens referentes ao controle da reação (F e F') podemos visualizar a presença de células UCN 3-ir. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo, PaMD, parte magnocelular dorsal do PaV, PaV, núcleo paraventricular do hipotálamo. Escala de barras: 50µm (A-F), 20µm (A'-F'). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 8. Fotomicrografias representativas, em campo claro, do teste de adsorção para UCN 3 em cortes do PaV de *Cebus apella*, utilizando o peptídeo CRF nas diferentes concentrações (A-E) demonstradas em menor aumento e, (A'-E') em maior aumento.

Notar que em todas as concentrações utilizadas do peptídeo CRF, houve a presença de corpos celulares UCN 3-ir demonstrando que o anticorpo é específico ao peptídeo UCN 3 e não ao peptídeo CRF utilizado nesta adsorção. Nas imagens referentes ao controle da reação (F e F') podemos visualizar a presença de células UCN 3-ir. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo, PaMD, parte magnocelular dorsal do PaV, PaV, núcleo paraventricular do hipotálamo. Escala de barras: 50µm (A-F), 20µm (A'-F'). FONTE: Batagello, 2011.

5.1.3 Controle gênico

O controle gênico foi realizado em animais que apresentam a ausência do gene responsável pela produção da Urocortina 3, portanto, com a reação de imunoperoxidase indireta para UCN 3 em camundongos "knockouts" ko/UCN 3 e camundongos "wild type" (wt/UCN 3), foi possível comprovar a especificidade do anticorpo utilizado, uma vez que nos camundongos ko/UCN 3 houve ausência de imunomarcção para corpos celulares e fibras UCN 3-ir nos locais de comprovada imunorreatividade para UCN 3. Nos animais wt/UCN 3 foi possível a observação de células e fibras UCN 3 imunorreativas, sendo que esses animais são utilizados como controle da reação.

A seguir são apresentadas imagens de fotomicrografias das regiões dos núcleos septal lateral e paraventricular do hipotálamo após a realização do controle gênico para UCN 3 nos camundongos "knockouts" e "wild type" para UCN 3. Essas duas regiões foram escolhidas por apresentarem classicamente células e fibras UCN 3-ir.

Figura 9. Fotomicrografias representativas, em campo claro, de cortes do SNC de camundongo selvagem wild-type UCN 3 (wt/UCN 3) e camundongo knockout para UCN 3 (ko/UCN 3) após realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3, na concentração de 1:3000.

(A) Fotomicrografia em menor aumento do nível do LSi de wt/UCN 3, na qual podemos notar a presença de imunomarcção pela presença de fibras UCN 3-ir. (A') Maior aumento de (A) na qual podemos visualizar fibras imunorreativas a UCN 3, indicadas pelas setas pretas. (B) Fotomicrografia em menor aumento do nível do LSi de ko/UCN 3, na qual podemos visualizar a ausência de imunomarcção. (B') Maior aumento de (B) na qual podemos visualizar a ausência de imunomarcção vista em (B). (C) Fotomicrografia em menor aumento do nível do PaMD de wt/UCN 3, na qual podemos visualizar a presença de corpos celulares imunorreativos a UCN 3. (C') Maior aumento de (C) na qual podemos visualizar as células UCN 3-ir indicadas pelas setas pretas. (D) Fotomicrografias em menor aumento do nível do PaMD de ko/UCN 3, na qual podemos visualizar a ausência de células UCN 3-ir. (D') Maior aumento de (D) na qual podemos visualizar a ausência de corpos celulares UCN 3-ir. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo, f, fórnice, JPLH, núcleo justaparaventricular lateral, ko/UCN 3, camundongo knockout para UCN 3, LSi, parte intermédia do núcleo septal lateral, PaMD, parte magnocelular dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo, wt/UCN 3, camundongo selvagem para UCN3. Escala de barras: 100µm (A,B), 50µm (C,D), 20µm (A',B',C',D'). FONTE: Batagello, 2011.

5.1.4 Escala de graduação para imunomarcação da UCN 3

A partir da visualização do padrão de imunomarcação das fibras imunorreativas à UCN 3, após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3, foi determinada e produzida uma escala de graduação que segue abaixo. Esta escala se baseia no padrão da análise semiquantitativa da imunomarcação das fibras imunorreativas à urocortina 3.

É importante notar a presença das diferentes intensidades de imunomarcação: ausente (-), pouco (+/++), moderada (+++) e intensa (++++), que se caracterizam pela presença de fibras UCN 3-ir em maior ou menor quantidade e qualidade de imunomarcação.

Figura 10 - Escala de graduação para o padrão da análise semi-qualitativa das fibras UCN 3 imunorreativas

(A) pouca (+/++) intensidade de fibras e campos terminais imunorreativos a UCN 3. (B) moderada (+++) intensidade de fibras e campos terminais. (C) intensa (++++). imunomarcção em fibras e campos terminais. FONTE: Batagello, 2011.

5.1.5 Distribuição dos corpos celulares UCN 3-ir

Através do método de imuno-histoquímica foi possível a visualização de células imunorreativas à UCN 3 (UCN 3-ir) restritas a poucas regiões do sistema nervoso central de primata não-humano (*Cebus apella*), principalmente hipotalâmicas e amigdalóides. No hipotálamo, os neurônios imunorreativos à UCN 3 estão localizados, principalmente, em toda a extensão da parte justaparaventricular do hipotálamo lateral (JPLH), assim denominado em primatas, sendo que o mesmo recebe a denominação de área perifornical rostral (PFA) em roedores. Este núcleo se localiza mais rostralmente no prosencéfalo, sendo que a imunomarcção mais intensa está situada quando o JPLH encontra-se medial ao fórnice (f), ventro-lateral à parte magnocelular dorsal do PaV (PaMD) e parte parvocelular dorsal do PaV (PAPD), dorso-lateral a parte parvocelular ventral do PaV (PaPV), (Figura 15). Foram encontrados corpos neuronais no núcleo periventricular do hipotálamo (Pe), em toda extensão, margeando o terceiro ventrículo (3V). Poucas células UCN3-ir foram localizadas no núcleo supra-óptico (SO), quando este se localiza dorsal ao trato óptico (opt), dorso-lateral à decussação supra-óptica (sox), ventral à área hipotalâmica lateral (LH) e lateral à área hipotalâmica anterior (AA), (Figura 17). Não foram encontradas células UCN 3-ir na área pré-óptica, bem como no núcleo pré-óptico mediano.

Em áreas extra-hipotalâmicas, células UCN 3-ir foram encontradas predominantemente em áreas amigdalóides, mais especificamente no núcleo medial da amígdala (Me), quando este se localiza lateral ao trato óptico (opt), dorsal à área hipotalâmica anterior (AA), dorso-medial à parte medial do núcleo central da amígdala (CeM), bem como ventral a parte magnocelular do núcleo amigdalóide basomedial (BMMC) e à parte parvocelular da área amígdalo-hipocampal (AHiPC), (Figura 16). Poucas células UCN 3-ir foram visualizadas na transição amígdalo-hipocampal (AHiPC) e núcleo cortical da amígdala (CoA). Não foram encontradas células UCN 3-ir em regiões de mesencéfalo, tronco encefálico e medula espinal.

5.1.6 Distribuição de fibras UCN 3-ir

Para a distribuição de fibras UCN 3-ir também foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, sendo possível a observação de fibras e campos terminais localizadas predominantemente em regiões hipotalâmicas e límbicas.

Os locais que apresentaram fibras mais densamente imunorreativas à UCN 3 estão localizados em região dos núcleos septais, como as partes intermédia (LSi), e ventral (LSv), do núcleo septal lateral. A imunomarcação no LSi foi a mais intensa, sendo esta marcação prevalente na parte do LSi situada dorso-lateral ao SFi e MS, ventro-medial ao LSD e SHi e lateral ao LV (Figura 19). No hipotálamo, o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), a parte dorsomedial deste núcleo (VMHDM) foi a que exibiu uma intensa imunomarcação de fibras e varicosidades UCN 3-ir, ao contrário do que ocorre com a parte ventrolateral (VMHVL), que não recebeu inervação similar (Figura 18). A imunomarcação mais intensa para UCN 3 encontra-se quando o VMHDM está situado dorso-medial ao VMHVL, ventro-medial à parte mais caudal do fórnice, ao nível do núcleo tuberal lateral do hipotálamo (LTu).

Observamos intensidade de moderada a intensa de fibras na parte justaparaventricular do hipotálamo lateral (JPLH), similar a PFA de ratos, associadas essas fibras à presença de neurônios UCN 3-ir (Figura 12). Foi observada considerável quantidade de fibras e varicosidades UCN 3-ir nas seguintes divisões do núcleo paraventricular do hipotálamo (PaV): divisão magnocelular dorsal (PaMD), parvocelular dorsal (PaPD) e parvocelular ventral (PaPV).

Fibras UCN 3-ir e varicosidades foram encontradas na região pré-óptica do hipotálamo, especificamente nos núcleos: pré-óptico ântero-medial (AMPO), área pré-óptica medial (MPA) e núcleo pré-óptico lateral (LPO), (Figura 14). No AMPO, fibras UCN 3-ir estão principalmente localizadas quando este núcleo está situado ventro-medial à MPA, medial ao LPO e lateral ao 3V (Figura 14-E). A MPA apresenta-se mais ricamente inervada por fibras UCN 3-ir quando se situa mais dorso-lateral ao 3V, dorsal ao AMPO e medial ao LPO (Figura 14-D). No LPO, há a presença de fibras quando se situa mais lateral a MPA e dorso-lateral ao AMPO e ao 3V, (figura 14-F).

Fibras UCN 3-ir foram observadas na eminência mediana (ME), de intensidade moderada, como também no núcleo arqueado (Arc), fibras estas que se dirigiam para a eminência mediana, sendo este padrão mais evidente em níveis mais rostrais.

Em áreas extra-hipotalâmicas foi encontrada de pouca a moderada intensidade de fibras UCN 3-ir no núcleo medial da amígdala (Me), quando este se localiza lateral ao trato óptico (opt), dorsal à área hipotalâmica anterior (AA), dorso-medial à parte medial do núcleo central da amígdala (CeM), bem como ventral a parte magnocelular do núcleo amigdalóide basomedial (BMMC) e à parte parvocelular da área amígdalo-hipocampal (AHiPC), (Figura 16). Intensidade moderada de fibras UCN 3-ir foi encontrada na parte ântero-medial do núcleo intersticial da estria terminal (STMA). Poucas fibras e varicosidades foram observadas na habênula medial (MHb), tanto em níveis mais rostrais quanto caudais.

No mesencéfalo foram encontradas poucas fibras na parte lateral da PAG (LPAG) e parte ventrolateral da PAG (VLPAG). No tronco encefálico foram encontradas poucas fibras e campos terminais no núcleo do trato solitário (NTS) e no núcleo do trato espinal do trigêmeo, parte caudal (Sp5C). Foram também encontrados campos terminais no núcleo motor dorsal do vago, parte centointermediária (CeI). Não foram encontradas fibras UCN 3-ir na medula espinal.

5.1.7 Colocalização de células UCN 3 e/ou CRF imunorreativas no PaV

Por meio da técnica de dupla imunofluorescência realizada em cortes do nível do núcleo paraventricular do hipotálamo (PaV), foi possível localizar células que são imunorreativas somente ao CRF na parte magnocelular dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo (PaMD) (Figura 10-A), as que apresentam apenas imunorreatividade à UCN 3 (Figura 11-B), e as células que são duplamente marcadas, ou seja, que apresentaram colocalização para CRF/UCN 3 (Figura 11-C e D).

Segue abaixo fotomicrografias em microscopia confocal da reação de dupla imunofluorescência para UCN 3/CRF.

Figura 11. Fotomicrografias em microscopia confocal de cortes do PaV de *Cebus apella* após a realização da técnica de dupla imunofluorescência para CRF- Cy2/UCN 3-Cy3.

(A) Fotomicrografia demonstrando células CRF-ir na parte magnocelular dorsal do núcleo pa-raventricular do hipotálamo (PaMD) indicadas pelas setas brancas, bem como a presença de células UCN 3/ CRF-ir, indicadas pelas cabeças de seta brancas. (B) Fotomicrografia evidenciando células UCN 3-ir no PaMD, que podem ser visualizadas pelas setas pretas. (C) Fotomicrografia da sobreposição das imagens de (A) e (B), MERGE, demonstrando a colocalização entre células CRF/ UCN 3 no referido núcleo, visualizadas pelas cabeças de seta brancas. (D) Menor aumento de (C), da região do PaMD, na qual são evidenciadas, com cabeças de seta brancas as células duplamente imunomarcadas para CRF/UCN 3. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; JPHL, núcleo justaparaventricular lateral; PaMD, parte magnocelular dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo; PaV, núcleo paraventricular do hipotálamo. Escala de barras: 20x (A -C) e 24x(D). FONTE: Batagello, 2011.

5.1.8 Técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE) em pâncreas de Cebus apella

Por meio do método de coloração de hematoxilina e eosina, realizada em cortes de pâncreas de *Cebus apella* é possível verificar o aspecto histológico das ilhotas de langerhans em macaco-prego (Figura 12). Essa técnica foi importante para constatar a preservação histológico do tecido para que pudessem ser realizadas as técnicas de imuno-histoquímicas abaixo.

Segue abaixo fotomicrografias em microscopia de luz após realização da técnica de coloração HE.

Figura 12 - Fotomicrografia em campo claro de pâncreas de *Cebus apella* após a realização do método de coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Podemos visualizar uma imagem de corte histológico do pâncreas de *Cebus apella* após técnica de coloração de HE, no qual está sendo evidenciada no centro uma ilhota pancreática. Escala de barras: 20µm. FONTE: Batagello, 2011.

5.1.9 Colocalização de células β imunorreativas a UCN 3 e/ou insulina no pâncreas

Por meio da técnica de dupla imunofluorescência/imunoperoxidase, na qual utilizamos a técnica de imunoperoxidase com o cromógeno DAB para a localização das células β que são imunorreativas somente à urocortina 3, sendo realizada posteriormente a técnica de imunofluorescência com uso de anticorpo secundário conjugado a Cy2 para a detecção das células β que são imunorreativas somente à insulina. Após o merge das imagens, é possível verificar que existe a colocalização de UCN 3/insulina em poucas células β localizadas nas ilhotas pancreáticas (Figura 13).

Segue abaixo fotomicrografias em microscopia confocal da reação de dupla imunoperoxidase/imunofluorescência para UCN 3-DAB/insulina-Cy2.

Figura 13. Colocalização nas células β de urocortina 3 e insulina no pâncreas de *Cebus apella* através da técnica de dupla-imunomarcacão

Coluna da esquerda (A,B,C): Fotomicrografias em microscopia de luz de cortes de pâncreas de *Cebus apella* após realização de técnica de imunoperoxidase indireta através do uso do anticorpo anti-UCN 3 na concentração de 1:700. Podemos visualizar ilhotas de Langerhans evidenciando células imunorreativas à UCN 3, em aumento de 40x; Coluna do meio (A', B', C'): Fotomicrografias em microscopia de epifluorescência de pâncreas de *Cebus apella* (mesmos cortes de A,B,C) após técnica de imunofluorescência com a utilização de anticorpo anti-insulina na concentração de 1:150. Nota-se o padrão de imunomarcacão para insulina nas células β em aumento de 40x; Coluna da direita (A'', B'', C''): Merge das imagens de imunoperoxidase (A, B, C) com as de imunofluorescência (A', B', C'). É possível visualizar a presença de colocalização nas células β de UCN 3 e insulina após a realização da técnica de dupla imuno-histoquímica. Células duplamente imunomarcadas são indicadas pelas setas pretas. Abreviaturas: UCN 3, urocortina 3. Escala de barras: 10 μ m. FONTE: Batagello, 2011.

Figura 14. Fotomicrografias em campo claro da região pré-óptica do hipotálamo de *Cebus apella* após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3

(A) Esquema representativo de figura do atlas de referência da região pré-óptica do hipotálamo, com ênfase aos núcleos MPA, AMPO e LPO. (B) Fotomicrografia de corte da região correspondente a (A) após técnica de Nissl, com a delimitação dos núcleos citados. (C) Imagem em menor aumento após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3, na concentração de 1:7000 na qual podemos visualizar a presença de fibras UCN 3-ir. (D) Maior aumento de (C), na região da MPA na qual podemos visualizar fibras e varicosidades UCN 3-ir, indicadas pelas setas pretas. (E) Maior aumento de (C), na região do AMPO na qual podemos verificar a presença de fibras e varicosidades UCN 3-ir, indicadas pelas setas pretas. (F) maior aumento de (C), na região do LPO na qual podemos visualizar a presença de fibras e varicosidades UCN 3-ir, indicadas pelas setas pretas. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo, AMPO, núcleo pré-óptico antero-medial, MPA, área pré-óptica medial, LPO, núcleo pré-óptico lateral, Sch, núcleo supraquiasmático. Escala de barras: 200 μm, (B), 50 μm (C), 10 μm (D-F). FONTE: Batagello, 2011.

5.1.8 Técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE) em pâncreas de Cebus apella

Por meio do método de coloração de hematoxilina e eosina, realizada em cortes de pâncreas de *Cebus apella* é possível verificar o aspecto histológico das ilhotas de langerhans em macaco-prego (Figura 12). Essa técnica foi importante para constataremos a preservação histológico do tecido para que pudessem ser realizadas as técnicas de imuno-histoquímicas abaixo.

Segue abaixo fotomicrografias em microscopia de luz após realização da técnica de coloração HE.

Figura 12 - Fotomicrografia em campo claro de pâncreas de *Cebus apella* após a realização do método de coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Podemos visualizar uma imagem de corte histológico do pâncreas de *Cebus apella* após técnica de coloração de HE, no qual está sendo evidenciada no centro uma ilhota pancreática. Escala de barras: 20µm. FONTE: Batagello, 2011.

5.1.9 Colocalização de células β imunorreativas a UCN 3 e/ou insulina no pâncreas

Por meio da técnica de dupla imunofluorescência/imunoperoxidase, na qual utilizamos a técnica de imunoperoxidase com o cromógeno DAB para a localização das células β que são imunorreativas somente à urocortina 3, sendo realizada posteriormente a técnica de imunofluorescência com uso de anticorpo secundário conjugado a Cy2 para a detecção das células β que são imunorreativas somente à insulina. Após o merge das imagens, é possível verificar que existe a colocalização de UCN 3/insulina em poucas células β localizadas nas ilhotas pancreáticas (Figura 13).

Segue abaixo fotomicrografias em microscopia confocal da reação de dupla imunoperoxidase/imunofluorescência para UCN 3-DAB/insulina-Cy2.

Figura 13. Colocalização nas células β de urocortina 3 e insulina no pâncreas de *Cebus apella* através da técnica de dupla-imunomarcação

Coluna da esquerda (A,B,C): Fotomicrografias em microscopia de luz de cortes de pâncreas de *Cebus apella* após realização de técnica de imunoperoxidase indireta através do uso do anticorpo anti-UCN 3 na concentração de 1:700. Podemos visualizar ilhotas de Langerhans evidenciando células imunorreativas à UCN 3, em aumento de 40x; Coluna do meio (A', B', C'): Fotomicrografias em microscopia de epifluorescência de pâncreas de *Cebus apella* (mesmos cortes de A,B,C) após técnica de imunofluorescência com a utilização de anticorpo anti-insulina na concentração de 1:150. Nota-se o padrão de imunomarcação para insulina nas células β em aumento de 40x; Coluna da direita (A'', B'', C''): Merge das imagens de imunoperoxidase (A, B, C) com as de imunofluorescência (A', B', C'). É possível visualizar a presença de colocalização nas células β de UCN 3 e insulina após a realização da técnica de dupla imuno-histoquímica. Células duplamente imunomarcadas são indicadas pelas setas pretas. Abreviaturas: UCN 3, urocortina 3. Escala de barras: 10 μ m. FONTE: Batagello, 2011.

Figura 14. Fotomicrografias em campo claro da região pré-óptica do hipotálamo de *Cebus apella* após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3

(A) Esquema representativo de figura do atlas de referência da região pré-óptica do hipotálamo, com ênfase aos núcleos MPA, AMPO e LPO. (B) Fotomicrografia de corte da região correspondente a (A) após técnica de Nissl, com a delimitação dos núcleos citados. (C) Imagem em menor aumento após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3, na concentração de 1:7000 na qual podemos visualizar a presença de fibras UCN 3-ir. (D) Maior aumento de (C), na região da MPA na qual podemos visualizar fibras e varicosidades UCN 3-ir, indicadas pelas setas pretas. (E) Maior aumento de (C), na região do AMPO na qual podemos verificar a presença de fibras e varicosidades UCN 3-ir, indicadas pelas setas pretas. (F) maior aumento de (C), na região do LPO na qual podemos visualizar a presença de fibras e varicosidades UCN 3-ir, indicadas pelas setas pretas. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo, AMPO, núcleo pré-óptico antero-medial, MPA, área pré-óptica medial, LPO, núcleo pré-óptico lateral, Sch, núcleo supraquiasmático. Escala de barras: 200 µm, (B), 50 µm (C), 10 µm (D-F). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 15. Fotomicrografias em campo claro, de regiões hipotalâmicas de *Cebus apella* após reação de imunoperoxidase indireta para UCN 3.

Notar a presença de células e fibras imunorreativas à UCN 3, localizadas no núcleo paraventricular do hipotálamo (PaV). (A) Esquema representativo, extraído e adaptado do atlas de Paxinos et al. (2009), da região do PaV. (B) Corte representativo após coloração de Nissl da região do PaV com o núcleo PaMD e JPLH em evidência, tendo como estrutura de referência o fórnice (f), lateralmente. (C) Fotomicrografia em menor aumento da região do PaMD e JPLH, demonstrando a disposição dos núcleos em corte cuja reação de imunoperoxidase para UCN 3 foi realizada, na concentração de 1:7000. (D) Maior aumento de (C), 20x, evidenciando o aspecto das células e fibras UCN3-ir. (E) Aumento de 40x de (B) sendo que é possível visualizar neurônios UCN 3-ir no PaMD. (F) Aumento de 40x de (B), sendo possível identificar células e fibras UCN 3-ir no JPLH. Abrevia-turas: 3V, terceiro ventrículo; f, fórnice; JPLH, núcleo justaparaventricular; PaMD, parte magnocelular celular dorsal do PaV; PaV, núcleo paraventricular do hipotálamo. Escala de barras: 100µm (B-D), 20µm (E-F). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 16. Fotomicrografias, em campo claro, de corte da região do núcleo medial da amígdala (Me) de *Cebus apella* após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3 na concentração de 1:7000.

(A) Esquema extraído e adaptado do atlas de referência, Paxinos *et al.*, 2009, da região do Me. (B) Fotomicrografia em menor aumento da região do Me de *Cebus apella* na após realização da técnica de coloração de Nissl. (C) Imagem em aumento de 10x da região do Me, tendo como estrutura de referência dorso-lateralmente, o trato óptico. (D) Maior aumento de (C) na qual é possível verificar células UCN 3-ir e varicosidades, estas indicadas pelas setas pretas. Abreviaturas: AA, núcleo amigdalóide anterior, BMMC, parte magnocelular do núcleo amigdalóide basomedial, cp, pedúnculo cerebral, CeM, divisão medial do núcleo amigdalóide central, Me, núcleo amigdalóide medial, opt, trato óptico, sox, decussação supra-óptica. Escala de barras: 200 μm (B), 50 μm (C) e 20 μm (D). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 17. Fotomicrografias representativas, em campo claro, de cortes da região do núcleo supra-óptico (SO) de *Cebus apella* após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3 na concentração de 1:7000.

(A) Esquema representativo do atlas de referência Paxinos et al., 2009 da região do SO. (B) Fotomicrografia em campo claro da região do SO de *Cebus apella* após a realização da técnica de coloração de Nissl. (C) Fotomicrografia em campo claro após a técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3, na concentração de 1:7000. Notar a presença de corpos neuronais e fibras UCN 3-ir. (D) Fotomicrografia em maior aumento(40x) de (C), na qual podemos visualizar o aspecto dos neurônios e fibras UCN 3-ir, bem como a presença de varicosidades. Abreviaturas: AH, área hipotalâmica anterior, LH, área hipotalâmica lateral, opt, trato óptico, v, veia, sox, decussação supra-óptica, SO, núcleo supra-óptico. Escala de barras: 100μm(B-C) e 10μm(D). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 18. Fotomicrografias demonstrando fibras UCN 3-ir no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) de *Cebus apella* após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3.

(A) Representação esquemática de figura do atlas de referência da região do VMH, com as divisões dorsomedial VMHDM e ventro-lateral VMHVL.(B) Corte representativo do nível do VMH após a realização da técnica de coloração Nissl, com as delimitações das partes dorsomedial do VMH (VMHDM) e ventrolateral do VMH (VMHVL).(C) Corte representativo do VMHDM no qual é possível visualizar o padrão de imunomarcagem de fibras e varicosidades UCN 3-ir da parte VMHDM em campo escuro. Notas poucas fibras UCN 3-ir no VMHVL.(D) Maior aumento de (C), em microscopia de campo claro pela técnica de imersão, na qual é possível verificar a presença de significativas fibras e varicosidades UCN 3-ir no VMHDM, identificadas pelas setas pretas. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; opt, trato óptico; VMH, núcleo ventromedial do hipotálamo, VMHDM, parte dorsomedial do VMH, VMHVL, parte ventrolateral do VMH, SO, núcleo supra-óptico. Barras de escala: 200µm (B-C), 20µm (D). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 19. Fotomicrografias demonstrando fibras UCN 3-ir na parte intermédia do núcleo septal lateral (LSi) de *Cebus apella* após a realização da técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3.

(A) Corte representativo após realização da técnica de coloração de Nissl, evidenciando a disposição dos diferentes núcleos septais, com ênfase ao LSi. (B) Esquema representativo do atlas de referência, Paxinos et al. (2009) da região dos núcleos septais. (C) Fotomicrografia em campo escuro, após ser realizada técnica de imunoperoxidase indireta para UCN 3, na concentração de 1:7000, na qual podemos visualizar o padrão de imunomarcagem do LSi. (D) Fotomicrografia em campo claro, em maior aumento de (C) na qual é possível verificar a presença de varicosidades e fibras UCN 3-ir no LSi. Notar a presença de considerável intensidade de imunomarcagem das fibras UCN 3-ir no referido núcleo. Abreviaturas: Cd, núcleo caudado; ic, cápsula interna; LV, ventrículo lateral; LSD, parte dorsal do núcleo septal lateral, LSi, núcleo septal lateral, parte intermédia; MS, núcleo septal medial; SFi, núcleo do septo fimbrial, STLD, parte dorsal da divisão lateral do núcleo intersticial da estria terminal. Escala de barras: 100µm. FONTE: Batagello, 2011.

Figura 20 - Fotomontagem digital das fibras bilaterais do trato hipotálamo-hipofisário de *Cebus apella* após a realização da técnica de imuno-histoquímica para UCN 3.

É possível verificar a presença bilateral das fibras do trato hipotálamo-hipofisário, no nível do núcleo paraventricular do hipotálamo de *Cebus apella*, indicadas pelas setas pretas. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; ic, cápsula interna; f, fórnice; PaV, núcleo paraventricular do hipotálamo; opt, trato óptico; SO, núcleo supra-óptico. Escala de barra: 1000µm. FONTE: Batagello, 2011.

5.2 Técnica de hibridização *in situ*

5.2.1 Localização dos corpos neuronais que expressam o RNAm da UCN 3

Após a realização da técnica de hibridização *in situ*, com posterior constatação de sinal de hibridização no filme autorradiográfico e tempo adequado em emulsão radiográfica, foi possível a visualização de sinal de RNAm da UCN 3 em regiões restritas do sistema nervoso central do *Cebus apella*, localizadas predominantemente no hipotálamo e na amígdala. Através de microscopia de luz foi possível localizar neurônios que apresentam grânulos de prata no citoplasma, que são o indicativo da expressão do RNAm da UCN 3 nessas células nos seguintes núcleos hipotalâmicos: núcleo pré-óptico mediano (MnPO) (Figura 22-A), parte magnocelular dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo (PaV) (Figura 22-B) e núcleo supra-óptico (Figura 22- C).

Em áreas extra-hipotalâmicas, corpos celulares com RNAm da UCN 3, indicados pela presença de grânulos de prata no citoplasma, se localizam nos seguintes núcleos amigdalóides: núcleo centro-medial da amígdala (CeM) (Figura 23-A), núcleo basomedial da amígdala (BM), núcleo medial da amígdala (Me) (Figura 25-A) e núcleo amigdalóide anterior (AA) (Figura 25-B).

Foi encontrado sinal de hibridização para UCN 3 em outras regiões do SNC de *Cebus apella*, como no giro denteado da formação hipocampal (GrDG) (Figura 23-B) e no núcleo intersticial da estria terminal, parte anterior (Figura 24-A) e na parte ventral (Figura 24 - B).

Figura 21 - Imagens do filme autorradiográfico para sonda de RNAc da UCN 3 em *Cebus apella*

Figura 22 - Fotomicrografias em microscopia de luz contra-coradas com o método de Nissl, evidenciando sinal de hibridização para UCN 3 após a realização da técnica de hibridização in situ em cortes do hipotálamo de *Cebus apella*.

(A) Fotomicrografia em campo escuro do MnPO, em menor aumento, após ser realizada técnica de hibridização in situ para UCN 3. A caixa preta em (A) evidencia maior aumento visualizado em (A'). (A') Fotomicrografia em campo claro, em maior aumento de 100x (A), na qual se observam vários grânulos de prata sobre corpos neuronais que expressam o RNAm da UCN 3 na região do MnPO. (B) Fotomicrografia em campo escuro do PaMD, em menor aumento.. A caixa preta em (B) evidencia aumento de 100x visualizado em (B'). (B') Fotomicrografia em campo claro, em maior aumento de (B), na qual se observam grânulos de prata sobre corpos neuronais que expressam o RNAm da UCN 3 na região do PaMD, indicados pela seta preta. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; ca, comissura anterior; JPHL, parte lateral do hipotálamo lateral, MnPO, núcleo pré-óptico mediano; PaMD, parte magnocelular dorsal do PaV; PaV, núcleo paraventricular do hipotálamo. Escala de barras: 1000µm(A-B) e 50µm(A'-B'). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 23 -Fotomicrografias em microscopia de luz de região amigdalóide e formação hipocampal de *Cebus apella* após técnica de hibridização *in situ* e contra coradas com o método de Nissl, evidenciando sinal de hibridização *in situ* para UCN 3.

(A) Fotomicrografia em campo escuro do CeM, em menor aumento, após ser realizada técnica de hibridização *in situ* para UCN 3. A caixa preta em (A) evidencia maior aumento visualizado em (A'). (A') Fotomicrografia em campo claro, em maior aumento de 100x (A), na qual se observam vários grânulos de prata sobre corpos neuronais que expressam o RNAm da UCN3 na região do CeM indicados pelas setas. (B) Fotomicrografia em campo escuro do GrDG, em menor aumento, após ser realizada técnica de hibridização *in situ* para UCN 3. A caixa preta em (B) evidencia aumento de 100x visualizado em (B'). (B') Fotomicrografia em campo claro, em maior aumento de (B), na qual se observam grânulos de prata sobre corpos neuronais que expressam o RNAm da UCN 3 na região do GrDG, indicadas pelas cabeças de seta. Abreviaturas: CA4, camada CA4 do hipocampo; Cd, núcleo caudado; CeM, parte medial do núcleo amigdalóide central; GrDG, giro denteado da formação hipocampal. Escala de barras: 2000µm (A e B) e 50µm (A' e B'). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 24 - Fotomicrografias em microscopia de luz de núcleos intersticiais da estria terminal de *Cebus apella* após técnica de hibridização in situ e contra coradas com o método de Nissl, evidenciando sinal de hibridização in situ para UCN 3.

(A) Fotomicrografia em campo escuro do STMA, em menor aumento, após ser realizada técnica de hibridização in situ para UCN 3. (A') Fotomicrografia em campo claro, em maior aumento de 100x (A), na qual se observam vários grânulos de prata sobre corpos neuronais que expressam o RNAm da UCN 3 na região do STMA (B). (B') Fotomicrografia em campo claro, em maior aumento de (B), na qual se observam grânulos de prata sobre corpos neuronais que expressam o RNAm da UCN 3 na região do STMV, indicados pela seta preta. As caixas brancas evidenciam a área aproximada da visualização do maior aumento de (A' e B'). Abreviaturas: ca, comissura anterior; LS, núcleo septal lateral; STMA, parte ântero-medial do núcleo intersticial da estria terminal; STMV, parte ventral do núcleo intersticial da estria terminal, UCN 3, urocortina 3. Escala de barras: 50µm(A-B) e 5µm(A'-B'). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 25 - Fotomicrografias em microscopia de luz de núcleos amigdalóides de *Cebus apella* após a técnica de hibridização *in situ* para a localização de corpos celulares que expressam o RNAm da Urocortina 3.

(A) Fotomicrografia em campo escuro do núcleo medial da amígdala (Me) após a realização da técnica de hibridização *in situ*. (A') Fotomicrografia em campo claro em maior aumento (100x) com imersão, na qual podem ser identificados grânulos de prata sob as células que apresentam o RNAm da Urocortina 3, indicadas pelas setas pretas. (B) Fotomicrografia em campo escuro do núcleo amigdalóide anterior (AA) após a realização da técnica de hibridização *in situ*. (B') Fotomicrografia em campo claro em maior aumento (100x) com imersão, na qual podem ser identificados grânulos de prata sob as células que apresentam o RNAm da Urocortina 3, indicadas pelas setas pretas. As caixas brancas evidenciam a aproximação da área visualizada em maior aumento em (A'e B'). Abreviaturas: opt, trato óptico; AA, núcleo amigdalóide anterior; Me, núcleo medial da amígdala. Escala de barras: (A e B) 50 μ m, (A'e B') 10 μ m. FONTE: Batagello, 2011.

Figura 26 - Fotomicrografias em microscopia de luz dos núcleos intersticiais da estria terminal e do giro denteado da formação hipocampal de *Cebus apella* após a realização da técnica de hibridização *in situ* com o uso de sonda sense da urocortina 3 marcada com S^{35} e contra-coradas pelo método de Nissl.

(A) Fotomicrografia em campo escuro do STMA, em menor aumento. (A') Fotomicrografia em campo claro, aumento de 100x de (A), na qual se observam poucos ou ausentes grânulos de prata sobre corpos neuronais. (B) Fotomicrografia em campo escuro do STMV, em menor aumento. (B') Aumento de 100x de (B) no qual se observam poucos ou ausentes grânulos de prata sobre corpos neuronais. (C) Fotomicrografia em campo escuro do GrDG. (C') Aumento de 100x de (C) evidenciando poucos neurônios que apresentam grânulos de prata. As caixas brancas evidenciam uma aproximação da área visualizada em maior aumento em (A', B', C'). As setas pretas indicam as células que apresentaram poucos grânulos de prata. Notar a presença de marcação de fundo muito maior do que a marcação sobre as células, o que comprova a especificidade das sondas sense e anti-sense. Abreviaturas: ac, comissura anterior; CA4, camada CA4 do hipocampo; GrDG, giro denteado da formação hipocampal; LS, núcleo septal lateral; STMA, parte ântero-medial do núcleo intersticial da estria terminal; STMV, parte ventral do núcleo intersticial da estria terminal; UCN 3, urocortina 3. Escala de barras: 50 μm (A, B e C) e 10 μm (A', B' e C). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 27 - Fotomicrografias em microscopia de luz de núcleos hipotalâmicos de *Cebus apella* após a realização da técnica de hibridização *in situ* com o uso de sonda sense da urocortina 3 marcada com S^{35} e contra coradas pelo método de Nissl.

(A) Fotomicrografia em campo escuro do MnPO, em menor aumento. (A') Fotomicrografia em campo claro, aumento de 100x de (A), na qual se observam poucos ou ausentes grânulos de prata sobre corpos neuronais. (B) Fotomicrografia em campo escuro do PaMD, em menor aumento. (B') Aumento de 100x de (B) no qual se observam poucos ou ausentes grânulos de prata sobre corpos neuronais. (C) Fotomicrografia em campo escuro do SO. (C') Aumento de 100x de (C) evidenciando poucos neurônios que apresentam grânulos de prata. As caixas brancas evidenciam uma aproximação da área visualizada em maior aumento em (A', B', C'). As setas pretas indicam as células que apresentaram poucos grânulos de prata. Notar a presença de marcação de fundo muito maior do que a marcação sobre as células, o que comprova a especificidade das sondas sense e anti-sense. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; ac, comissura anterior; opt, trato óptico; JPLH, núcleo juxtaparaventricular lateral; MnPO, núcleo pré-óptico mediano; PaMD, parte magnocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo; SO, núcleo supra-óptico. Escala de barras: 50 µm (A, B e C) e 10 µm (A', B' e C). FONTE: Batagello, 2011.

Figura 28 - Fotomicrografias em microscopia de luz de núcleos amigdalóides de *Cebus apella* após a realização da técnica de hibridização *in situ* com o uso de sonda sense da urocortina 3 marcada com S^{35} e contra-coradas pelo método de Nissl.

(A) Fotomicrografia em campo escuro do AA, em menor aumento. (A') Fotomicrografia em campo claro, aumento de 100x de (A), na qual se observam poucos ou ausentes grânulos de prata sobre corpos neuronais. (B) Fotomicrografia em campo escuro do Me, em menor aumento. (B') Aumento de 100x de (B) no qual se observam poucos ou ausentes grânulos de prata sobre corpos neuronais. (C) Fotomicrografia em campo escuro do CeM. (C') Aumento de 100x de (C) evidenciando poucos neurônios que apresentam grânulos de prata. As caixas brancas evidenciam uma aproximação da área visualizada em maior aumento em (A', B', C'). As setas pretas indicam as células que apresentaram poucos grânulos de prata. Notar a presença de marcação de fundo muito maior do que a marcação sobre as células, o que comprova a especificidade das sondas sense e anti-sense. Abreviaturas: opt, trato óptico; AA, núcleo amigdalóide anterior; Cd, núcleo caudado; CeM, núcleo centro-medial da amígdala; Me, núcleo medial da amígdala. Escala de barras: 50 μm (A, B e C) e 10 μm (A', B' e C). FONTE: Batagello, 2011.

Tabela 4. Resumo da distribuição dos neurônios e fibras UCN 3-ir, e os neurônios que expressam o RNAm da UCN 3 no sistema nervoso central de *Cebus apella* após ser realizada técnica de imunoperoxidase indireta.

Área	células UCN 3-ir	fibras UCN 3-ir	RNAm UCN 3
Telencéfalo			
núcleo medial da amígdala	+	+	+
núcleo centro-medial da amígdala	-	++	+
núcleo cortical da amígdala	+	++	-
transição amígdalo-hipocampal	+	+	-
Formação hipocampal			
giro denteado da formação hipocampal	-	-	+
Região septal			
núcleo septal medial	-	+	-
núcleo septal lateral, parte intermédia	-	+++	-
núcleo intersticial da estria terminal, parte anterior	-	+	+
núcleo intersticial da estria terminal, parte ventral	-	+	+
Diencefalo			
Epitálamo			
núcleo habenular medial	-	+	-
Hipotálamo			
núcleo paraventricular do tálamo	-	+	-
habenula medial	-	++	-

Tabela 4. Resumo da distribuição dos neurônios e fibras UCN 3-ir, e os neurônios que expressam o RNAm da UCN 3 no sistema nervoso central de *Cebus apella* após ser realizada técnica de imunoperoxidase indireta.

(continua)

Hipotálamo (região pré-óptica)

núcleo pré-óptico mediano	-	-	+
área pré-óptica medial	-	++	-
área pré-óptica ântero-medial	-	++	-
área pré-óptica lateral	-	++	-

Hipotálamo (região tuberal)

núcleo periventricular do hipotálamo	+	++	-
núcleo arqueado	+	+	-
eminência mediana, lâmina externa	-	++	-
núcleo paraventricular do hipotálamo, parte parvocelular dorsal	+	+	-
núcleo paraventricular do hipotálamo, parte parvocelular ventral	+	+	-
núcleo paraventricular do hipotálamo, parte magnocelular dorsal	+++	+++	+
parte justaparaventricular do hipotálamo lateral	+++	+++	-
núcleo supra-óptico	+	+	+
núcleo ventromedial do hipotálamo, parte dorsomedial	-	+++	-
núcleo ventromedial do hipotálamo, parte ventrolateral	-	+	-

Hipotálamo (região lateral)

área hipotalâmica lateral	-	+	-
---------------------------	---	---	---

Tronco encefálico

(continua)

Tabela 4. Resumo da distribuição dos neurônios e fibras UCN 3-ir, e os neurônios que expressam o RNAm da UCN 3 no sistema nervoso central de *Cebus apella* após ser realizada técnica de imunoperoxidase indireta.

Mesencéfalo

PAG, parte lateral	-	+	-
--------------------	---	---	---

PAG, parte ventrolateral	-	+	-
--------------------------	---	---	---

substância negra	-	-	-
------------------	---	---	---

Ponte e bulbo

núcleo do trato solitário	-	+	-
---------------------------	---	---	---

núcleo trato espinal do trigêmeo, parte caudal	-	+	-
---	---	---	---

núcleo motor dorsal do nervo vago	-	+	-
-----------------------------------	---	---	---

A intensidade de imunomarcção foi determinada através de uma escala de graduação, tendo como (-) ausência de imunomarcção, (+)/(++) pouca, (+++) moderada e (+++++) intensa.

(conclusão)

6. DISCUSSÃO

6.1. Considerações metodológicas

Vale ser ressaltado que nosso estudo é o primeiro a realizar o mapeamento da distribuição de células e fibras imunorreativas à Urocortina 3 no sistema nervoso central em modelo experimental de primata não-humano, na espécie *Cebus apella*. Haja vista a utilização de primata não-humano, bem como os trabalhos de referência serem realizados em outras espécies, os protocolos dos métodos aplicados nesse estudo devem ser adequados, especialmente nas reações controle para as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, referente ao uso de soluções, anticorpos e sondas de hibridização.

6.1.1 Anticorpo e controles para técnica de imuno-histoquímica

Previamente a discussão dos dados obtidos se torna imprescindível serem feitas considerações metodológicas a cerca do uso do anticorpo primário policlonal anti-UCN 3 utilizado neste estudo. Devido ao fato do anticorpo utilizado não ser espécie-específico, é de suma importância serem realizados os testes de titulação e de adsorção. Primeiramente foi realizado o teste de titulação para se determinar a concentração ideal do anticorpo primário policlonal anti-UCN 3, gentilmente cedido pelo Dr. Wylie W. Vale e Dra. Joan Vaughan do “Salk Institute for Biological Studies”, La Jolla, Califórnia – EUA, para uso nas reações imuno-histoquímicas. De acordo com o protocolo citado anteriormente, através desse teste foi possível determinar a concentração ideal do anticorpo anti-UCN 3 de 1:7000. Após ter sido determinada a concentração ideal, submetemos os cortes ao teste de adsorção, cujo intuito é o de se comprovar a especificidade do anticorpo anti-UCN 3 utilizado nas reações imuno-histoquímicas.

O teste de adsorção, através da competição entre peptídeo e anticorpo, é capaz de demonstrar que um anticorpo apresenta especificidade de ligação ao seu referido peptídeo. Em nosso trabalho foram testados 3 peptídeos pertencentes à família de peptídeos do CRF, que apresentam estrutura e função semelhantes à UCN 3, e que por isso poderiam apresentar reação cruzada: CRF, Urocortina 1 (UCN 1) e Urocortina 3 (UCN 3), sendo que o protocolo da técnica está bem discriminado anteriormente.

Assim, como foi apresentado em resultados, houve a determinação da concentração ideal do anticorpo e a comprovação de especificidade de ligação entre o peptídeo UCN 3 e o anticorpo anti-UCN 3, demonstrada pela ausência de corpos neuronais e fibras imunorreativas à UCN 3

quando da utilização do referido peptídeo. No entanto, quando foram utilizados os peptídeos UCN 1 e CRF, houve a presença de corpos e fibras UCN 3-ir, uma vez que o anticorpo anti-UCN 3 não foi capaz de reconhecer os peptídeos UCN 1 e CRF, o que possibilitou a presença.

Com a reação de imunoperoxidase indireta para UCN 3, em camundongos ko/UCN 3 e em camundongos "wild type" UCN 3 (wt/UCN 3), foi possível também comprovar a especificidade do anticorpo utilizado, uma vez que nos camundongos ko/UCN 3 houve ausência de imunomarcção para corpos celulares e fibras UCN 3-ir nos locais de comprovada imunorreatividade para UCN 3. Nos animais "wild type" foi possível a observação de células e fibras UCN 3 imunorreativas, sendo que esses animais foram utilizados como controle da reação (Figura 8). Portanto, através dos controles das reações imuno-histoquímicas foi possível determinar o padrão de imunomarcção da UCN 3 em *Cebus apella*, o que tornou viável a utilização do referido anticorpo no presente estudo.

6.1.2 Especificidade da sonda de cRNA e controle sense para a técnica de hibridização *in situ*

Em relação a técnica de hibridização *in situ*, deve ser salientado que, após ser realizada a análise de identidade entre a sequência exônica da UCN 3 do *Cebus apella* com as sequências da UCN 3 de humano e rato, através do uso do software BLAST, foi possível verificar que a sonda anti-sense de UCN 3 de *Cebus apella* (323pb) obtida pelo uso da enzima de transcrição SP6 produzida apresentou 88% de sequências homólogas à sequência de humano e, 65% de homologia à sequência de rato. Devido a essa significativa conservação das sequências, esses dados reforçam o conceito de que essas sequências homólogas estão conservadas entre essas espécies, dado este que sugere a possível preservação do sistema neuropeptidérgico da UCN 3 ao longo da evolução das espécies, tornando viável a utilização dessa sonda no presente estudo.

Em relação ao controle sense da UCN 3 para a técnica de hibridização *in situ*, esta foi realizada quando da utilização de sonda sense obtida pelo uso da enzima de transcrição T7, ao contrário da enzima SP6 que foi utilizada para a obtenção da sonda anti-sense da UCN 3. Assim, analisando os resultados obtidos, pudemos confirmar os locais com sinal de hibridização encontrados quando da utilização da sonda anti-sense, uma vez que esses locais não estão presentes quando utilizamos a sonda sense, validando nossos resultados.

6.2 Considerações neuroanatômicas

Por se tratar de um mapeamento neuroanatômico, foi necessária a utilização dos atlas de referência (Manocha, 1968; Paxinos, 2009). Haja vista a escassez de atualização bibliográfica quanto ao atlas específico da espécie *Cebus apella*, utilizamos como referência adicional o atlas da espécie Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*). Apesar da espécie *Cebus apella* pertencer aos Macacos do Novo Mundo, e o Rhesus aos Macacos do Velho Mundo, as diferenças entre ambos é pouco significativa, tendo em vista a conservação de estruturas neuroanatômicas semelhantes entre as espécies, o que tornou possível a utilização do atlas de Paxinos como referência neuroanatômica mais atual. Foi também utilizada a coloração e contra-coloração de Nissl como referência citoarquitetônica.

Previamente ao mapeamento neuroanatômico, se torna imprescindível a adoção de uma nomenclatura anatômica a cerca das regiões do sistema nervoso central de primata não-humano, principalmente do hipotálamo, devido a maior presença de células e fibras imunorreativas, bem como de neurônios que expressam o RNAm da Urocortina 3 encontrados em nosso estudo. A nomenclatura anatômica do hipotálamo está de acordo com o capítulo do livro de Saper, 2009 sendo que este autor, por sua vez, leva em consideração a terminologia de Nauta e Haymaker (1969), por se tratar de um sistema de nomenclatura derivado grandemente de Gagel (1927), Grüntal (1993), LeGros Clark (1936, 1938) e Rioch *et al.* (1939). Referências neuroanatômicas foram também utilizadas a partir de dados obtidos do livro de Afifi e Bergman, 2008.

Foi também previamente determinada a nomenclatura utilizada para a denominação dos peptídeos e receptores da família do fator liberador de corticotrofina (CRF), uma vez que a Urocortina 3 é um membro dessa família, e apresenta seletividade de ligação ao receptor CRF₂. Portanto, adotamos a nomenclatura de Hauger *et al.* (2003).

6.3 Distribuição dos corpos neuronais e fibras UCN 3-ir e, dos neurônios que expressam o RNAm da UCN 3.

É importante ser ressaltado a não observação de corpos celulares UCN 3-ir no núcleo pré-óptico mediano (MnPO) no nosso modelo experimental, diferentemente do que ocorreu para a técnica de hibridização *in situ*, e em trabalhos com roedores, nos quais o referido núcleo é o que

apresenta a maior quantidade de corpos celulares UCN 3-ir e expressão de RNAm para UCN 3 (Lewis et al., 2001). Entretanto, Li et al. (2002) relatam a presença de um pequeno grupo de células UCN 3-ir no MePO de roedores. Apesar da não observação de células UCN 3-ir especificamente no MnPO em nosso modelo experimental, o hipotálamo continua sendo o principal local que apresenta células UCN 3-ir, assim como ocorre em outros modelos experimentais que realizaram estudo sobre a UCN 3 (Lewis et al., 2001; Li et al., 2002). Assim, no hipotálamo da espécie *Cebus apella* é possível identificar duas regiões hipotalâmicas que concentram grupamentos de neurônios que apresentam imunorreatividade à UCN 3, assim como ocorre com roedores (Lewis et al., 2001; Li et al., 2002). O primeiro grupamento é a região da parte justaparaventricular do hipotálamo lateral, localizada medial ao fórnice (f), ventro-lateral a parte magnocelular dorsal do PaV (PaMD) e a parte parvocelular dorsal do PaV (PAPD), dorso-lateral a parte parvocelular ventral do PaV (PaPV). Essa região recebe a denominação de área perifornical rostral (PFA) em roedores, e de acordo com trabalhos de Kuperman et al. (2010) demonstram o envolvimento dos neurônios da PFA de ratos, que expressam UCN 3, na regulação de comportamentos relacionados à ansiedade, ao gasto energético e ao metabolismo da glicose, sugerindo o posicionamento das vias centrais da UCN 3 e CRF₂ como principal componente de resposta encefálica às mudanças fisiológicas e psicológicas. Portanto, essa via também pode estar preservada em primata não-humano, corroborando para o possível papel da UCN 3 nas respostas comportamentais ao estresse (Kuperman et al., 2010).

O segundo grupamento se localiza na parte magnocelular dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo (PaMD), no qual ainda se pode identificar poucas células na parte parvocelular dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo (PaPD). Até meados de 2010 não era estabelecida a origem da inervação da UCN 3 no VMH de ratos, porém, Chen et al. (2011) relatam a participação da parte parvocelular anterior do PVH de ratos como local de projeção para o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH). Uma vez que a injeção de UCN 3 no PVH de ratos suprime a ingestão alimentar, foi de grande interesse a descoberta dessas aferências. Através do uso de traçadores neuronais, Chen et al. (2011) estabeleceu que a maioria das aferências da UCN 3 encontra-se na parte parvocelular anterior do PVH e parte posterior do BST (pBNST), e também no núcleo medial da amígdala (MeA). Esses dados sugerem a integração do PVH com VMH e MeA na possível modulação da atividade da UCN 3 em comportamentos motivados, como a ingestão alimentar e desencadeando o processo anorexigênico (Chen et al., 2011).

Ainda correlacionando os dados estruturais com os funcionais da literatura, temos que Li et al. (2010) relatam o possível envolvimento da UCN 3 na atividade do sistema cardiovascular de ratos. Através de injeção intracerebroventricular (icv) de UCN 3 no PVH, eles demonstraram que houve aumento significativo na pressão sistólica sanguínea, frequência cardíaca e atividade simpática renal, relacionando a UCN 3 no controle nervoso central da função cardiovascular por aumentar o fluxo simpático através da ativação de CRF₂ no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH). Comparando esse dado funcional da literatura com os nossos dados estruturais, é possível sugerir a ocorrência de células UCN 3-ir no PaV de primata (*Cebus apella*) com o papel funcional atribuído a esse neuropeptídeo em estudos realizados com roedores (Li et al., 2010).

Em relação à associação entre a ativação de CRF₂ e papel funcional do neuropeptídeo UCN 3, os núcleos VMH, LS e Me recebem muitas aferências corticais e subcorticais, e são regiões que, classicamente, expressam os mais altos níveis de RNAm para CRF₂ no sistema nervoso central de roedores (Van Pett et al., 2000). Em estudos realizados por Chen et al. (2009), através de injeção bilateral de UCN 3 no VMH de rato, foi sugerido que o CRF₂ no referido núcleo modula, ou seja, eleva os níveis de glicose sanguínea, suprime a ingestão alimentar e aumenta a expressão do RNAm de POMC no Arc devido à estimulação do VMH, mas não ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, quando comparados com ratos do grupo controle. Interessante notar que a maioria dos neurônios que expressam CRF₂ no VMH são glutamatérgicos excitatórios, e um subgrupo desses neurônios CRF₂ projeta-se para o ARH. Esses neurônios POMC do ARH são classicamente reconhecidos como um sistema anorexígeno chave no sistema nervoso central, como também tem papel importante na regulação dos níveis de glicose sanguínea. Assim, uma vez que a ativação dos neurônios CRF₂ no VMH leva à estimulação dos neurônios POMC no ARH, a regulação da homeostase alimentar e da glicose sanguínea pode ser realizada (Chen et al., 2009).

Venihaki et al. (2004) relatam a participação da UCN 3 na modulação do estresse por atenuar alguns comportamentos relacionados à ansiedade, apesar da UCN 3 não afetar a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, sendo este último dado também de acordo com dados de Chen et al., 2009. Os efeitos ansiolíticos de UCN 3 podem servir a dois propósitos. Primeiramente, a UCN 3 pode limitar a extensão do comportamento de resposta ao estresse, e dessa maneira pode ser benéfica ao prevenir ansiedade excessiva, que por sua vez pode ser uma resposta adequada a uma situação de estresse. Segundo, essa limitação da resposta ao estresse pode prevenir o

surgimento de respostas patológicas ao estresse, que em humanos são a maior causa de doenças psiquiátricas, como as desordens de ansiedade crônicas e depressão (Venihaki et al., 2009).

Chen et al. (2009) ainda relacionam a co-localização de células que expressam o RNAm do receptor CRF₂ e a isoforma 2 do transportador vesicular de glutamato (VGLUT2) que é um marcador de neurônios glutamatérgicos excitatórios. Como foi comentado acima, a maioria dos neurônios CRF₂ no VMH são glutamatérgicos, se co-localizam com VGLUT2, e devido a UCN 3 se ligar seletivamente a CRF₂, pode haver uma íntima associação entre os efeitos de UCN 3 no VMH à atuação do CRF₂ e VGLUT2 no referido núcleo (Chen et al., 2009).

Venihaki et al. (2004) relatam ainda um padrão distinto das células que expressam o RNAm do CRF e UCN 3 em modelo experimental de camundongo. A localização da expressão do RNAm da UCN 3 no sistema nervoso central de camundongo é distinta da expressão do RNAm de CRF, assim como ocorre para ratos (Lewis et al., 2001; Li et al., 2002). Enquanto que o RNAm de CRF é distribuído por toda extensão do PVN, o RNAm da UCN 3 é expresso somente nas partes dorsal e lateral do PVN. Portanto, esses dados não indicam precisamente a colocalização entre células CRF e UCN 3, de acordo com trabalhos prévios realizados (Lewis et al., 2001; Li et al., 2002).

Diferentemente do que é reportado na literatura, a realização da técnica de dupla imunofluorescência em nosso estudo foi importante para verificarmos que o PaV é um dos locais onde se encontra a maioria das células UCN 3-ir em nosso modelo. Dados da literatura relatam a presença de células UCN 3-ir em padrão distinto das células CRF-ir, não indicando claramente a co-localização entre ambas (Lewis et al., 2001; Li et al., 2002). Nosso estudo permitiu a identificação da co-localização entre células CRF e UCN 3 no PaV, especificamente na parte magnocelular dorsal do PaV. Houve também a presença de células somente imunorreativas à UCN 3, bem como somente ao CRF, indicando que diferentes membros da mesma família de peptídeos do CRF se preservaram durante a evolução, corroborando que estes sistemas neuropeptidérgicos estão conservados filogeneticamente, anatomicamente e funcionalmente.

Apesar do conhecimento a cerca do hormônio liberador de tirotropina (TRH), o qual regula a liberação do hormônio estimulador da tireóide (TSH), diminuir durante a ingestão alimentar quando administrado intracerebroventricularmente ou no VMH de ratos, não era conhecida a população de neurônios TRH que exercia essa função anorexigênica (Wittman et al., 2009). UCN 3 exerce similar função ao TRH quando injetado no VMH, aumentando rapidamente os níveis de

glicose sanguínea e diminuindo a ingestão alimentar (Fekete et al., 2007; Li et al., 2007). Wittman et al. (2009) relatam a existência de um padrão semelhante de distribuição entre TRH e UCN 3, haja vista a presença de neurônios TRH num grupo perifornicial (Lechan e Jackson, 1982; Segerson et al., 1987), bem como a presença de células UCN 3 na área perifornica rostral (Lewis et al., 2001; Li et al., 2002). Wittman et al. (2009) concluem que UCN 3 e TRH são co-expressos em uma restrita população de neurônios da área perifornica rostral e núcleo intersticial da estria terminal (BNST). A maioria (95,5%) dos neurônios UCN 3-ir na área perifornica expressam o RNAm do pro-TRH, enquanto 50,2% dos neurônios UCN 3 são duplamente marcados no BNST (Wittman et al., 2009).

Assim como o VMH, o LSi foi um dos locais que apresentou considerável quantidade de fibras e varicosidades UCN 3-ir em nosso modelo. Em ratos, há a hipótese de que o LS exerça um papel modulatório nas respostas comportamental e neuroendócrina ao estresse (Singelwald *et al.*, 2011). Os autores relatam que o LSi de ratos tem um importante papel em promover um mecanismo de inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), de modo independente do mecanismo de feedback negativo dos glicocorticóides, bem como ativar estratégias para reagir ao estresse durante a exposição ao estresse. Assim, os mesmos suportam a hipótese, na qual a atividade dos neurônios do LS é necessária para respostas de enfrentamento do estresse, que o LS fornece proteção contra os efeitos deletérios da exposição exagerada ao estresse psicológico (Singelwald et al., 2011).

Por esses locais também estarem ricamente inervados por fibras UCN 3 no nosso modelo em primata, principalmente no VMH, esses dados suportam a hipótese de que a UCN 3 seja um ligante endógeno para esse tipo de receptor, assim como é bem reportado na literatura para outras espécies (Li et al., 2002), como também participe na mediação de efeitos fisiológicos nas respostas comportamentais e endócrinas relacionadas ao estresse em primata, assim como foi descrita primeiramente em roedores (Chen et al., 2009; Jamieson et al., 2006; Venihaki et al., 2004).

Como foi evidenciado anteriormente, em estudos realizados por Li et al. (2003), com cultura de células, camundongos e ratos, a cerca da expressão de UCN 3 em órgãos periféricos, verificaram a presença de UCN 3 em tecido pancreático, mais especificamente em células β . Esses autores foram os primeiros a relatar a presença e a colocalização de UCN 3 e insulina em células β do pâncreas, mas não em células α , bem como sugerir a participação da UCN 3 no

controle da estimulação local da secreção de insulina e glucagon no pâncreas via receptor CRF₂ (Li et al., 2003). Em estudos posteriores, os mesmos autores, utilizando dois modelos de camundongos diabéticos, um *ob/ob* camundongos obesos e camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD), verificaram que houve aumento significativo da expressão de UCN 3 no pâncreas desses animais, sugerindo que há um aumento da expressão de UCN 3 no pâncreas nesses modelos animais. A UCN 3 endógena secretada nessas condições por sua vez, estimula localmente a secreção de insulina, o que sugere que a UCN 3 endógena possa estar envolvida na secreção de insulina em condições de excesso de nutrientes. A longo prazo esses efeitos podem contribuir para a redução da sensibilidade da insulina e de consequências metabólicas nocivas (Li et al., 2006).

Nosso trabalho é o primeiro a descrever a presença de UCN 3 em células β do pâncreas de primata não-humano, bem como a presença de colocalização entre UCN 3 e insulina em células β do pâncreas da espécie *Cebus apella*. A imunorreatividade da UCN 3 no pâncreas de primata não-humano é similar a de roedores, com a presença de grânulos citoplasmáticos bem como a colocalização entre UCN 3 e insulina em células β , de acordo com a descrição para roedores em trabalhos de Li et al. (2003). Esses dados sugerem que a UCN 3 em primata esteja conservada filogeneticamente, com possível preservação da função de manter os níveis de glicose sanguínea dentro de padrões aceitáveis para a manutenção do indivíduo e/ou da espécie, uma vez que em roedores a UCN 3 age localmente, nas células β do pâncreas, no controle da estimulação local da secreção de insulina e glucagon no pâncreas via receptor CRF₂ (Li et al., 2006). Futuros estudos funcionais poderão tornar mais clara a função da UCN 3 e insulina em primatas.

Os dados referentes a hibridização *in situ* estão de acordo com trabalhos previamente publicados, no que diz respeito a prevalência de neurônios que expressam o RNAm da urocortina 3 em regiões hipotalâmicas e amigdalóides, diferentemente do que ocorre para os outros membros da família de peptídeos do CRF, principalmente o próprio CRF (Lewis et al., 2001; Li et al., 2002, Venihaki et al., 2004). Os núcleos que apresentaram quantidade mais significativa de neurônios que expressam RNAm da UCN 3 no hipotálamo, núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e núcleo paraventricular do hipotálamo (PaV), assim como a presença de RNAm em núcleos amigdalóides como núcleo amigdalóide basomedial (BM), parte medial do núcleo amigdalóide central (CeM), núcleo medial da amígdala (Me), núcleo amigdalóide anterior (AA), todas de

acordo com trabalhos prévios, corroborando para a comprovação da conservação desse sistema neuropeptidérgico em diferentes espécies estudadas (Lewis et al., 2001; Li et al., 2002).

A expressão do RNAm da Urocortina 3 também foi encontrada na parte anterior do núcleo intersticial da estria terminal (STMa) e parte ventral do núcleo intersticial da estria terminal (STMv). Lewis et al.(2001) relataram a presença do RNAm da UCN 3 na parte posterior do núcleo intersticial da estria terminal (BSTp); Li et al.(2002) descrevem uma distribuição mais ampla da expressão do RNAm da UCN 3 em núcleos intersticiais.

Nossos resultados corroboram dados da literatura, sendo que os locais que não coincidem com a distribuição de outros animais podem indicar uma possível particularidade da expressão do RNAm da UCN 3 em nosso modelo experimental.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir que:

- a) As células UCN 3 estão presentes no núcleo pré-óptico mediano (MnPO), parte magnocelular dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo (PaMD), parte justaparaventricular do hipotálamo lateral (JPLH), parte medial do núcleo amigdalóide central (CeM), núcleo supra-óptico (SO), núcleo amigdalóide basomedial (BM), giro dentado da formação hipocampal (GrDG) e núcleos paracentral do tálamo (PC), centro-medial do tálamo (CM) e centro-lateral do tálamo (CL);
- b) As fibras UCN 3-ir se localizam na parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHDM), parte intermédia do núcleo septal lateral (LSi), área pré-óptica medial (MPA), núcleo pré-óptico ântero-medial (AMPO), núcleo pré-óptico lateral (LPO) e núcleo arqueado (Arc);
- c) Há colocalização de UCN 3 e CRF em algumas das células na parte magnocelular dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo (PaMD).
- d) Há colocalização de UCN 3 e insulina em algumas das células β do pâncreas.

REFERÊNCIAS

- Afifi AD, Bergman RA. Neuroanatomia funcional: texto e atlas 2 ed.. Local:Roca; 2008.526 p.
- Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in the stress responsivity and other behaviors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:525-57.
- Barsyte D, Tipping DR, Smart D, Conlon JM, Baker BI, Lovejoy DA. Rainbown trout (*Oncorhynchus mykiss*) urotensin-I: structural differences between urotensin-I and urocortins. *Gen Comp Endocrinol.* 2009;115(2):169-77.
- Behan DP, De Souza EB, Lowry PJ, Potter E, Sawchenko P, Vale WW. Corticotrophin releasing factor (CRF) binding protein: a novel regulator of CRF and related peptides. *Front Neuroendocrinol.* 1995; 16(4):362-82.
- Bern HA, Pearson D, Larson BA, Nishioka RS. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent Progr Hormon Res.* 1985; 41:533-52.
- Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *Comp Neurol.* 1999; 415(3):285-312.
- Brown R. A Introduction to Neuroendocrinology. Cambridge: Cambridge University Press; 1994. p. 293-94.
- Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotrophin-releasing receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci.* 1995; 15(10):6340-50.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Ann Rev Physiol.* 2005;67:259-84.
- Chand D, Lovejoy DA. Stress and reproduction: controversies and challenges. *Gen Comp Endocrinol.* 2011; 171(3):253-7.
- Chang CP, Pearse RV, O'Connell S, Rosenfeld MG. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotrophin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron.* 1993;11(6):1187-95.
- Chen P, Vaughan J, Donaldson C, Vale WW, Li C. Injection of urocortin 3 into the ventromedial hypothalamus modulates feeding, blood glucose levels and hypothalamic POMC gene expression but not the HPA axis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1999;298(2):E337-45.

- Chen P, Lin D, Giesler J, Li C. Identification of urocortin 3 afferent projection to the ventromedial nucleus of hypothalamus in rat brain. *Comp Neurol*. 2011; 519(10):2023-42.
- Davidson SM, Rybka AE, Townsend PA. The powerful cardioprotective effects of urocortin and corticotrophin releasing hormone (CRH) family. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(2):141-50.
- De Pedro N, Gancedo B, Alonso-Gomez AL, Delgado MJ, Alonso-Bedate M. CRF effect on thyroid function is not mediated by feeding behavior in goldfish. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;51(4):885-90.
- Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vaughan JM, Vale WW. Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology*. 1996;137(9):3896.
- Eidelberg E, Saldias CA. A Stereotaxic Atlas for Cebus Monkeys. *J Comp Neurol*. 1960;115:103-23.
- Esch F, Ling N, Bohlen P, Baird A, Benoit R, Guillemin R. Isolation and characterization of the bovine hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;122(3):899-905.
- Fragaszy DM, Visalbergui E, Fedigan LM. The complete capuchin: the biology of the genus Cebus. Massachusetts: Cambridge University Press; 2004. 345p.
- Fryer J, Lederis K, Rivier J. Urotensin I, a CRF-like neuropeptide, stimulates acth release from the teleost pituitary. *Endocrinology*. 1983;113(6):2308-10.
- Furutani Y, Morimoto Y, Shibahara S, Noda M, Takahashi H, Hirose T, Asai M, Inayama S, Hayashida H, Miyata T, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for ovine corticotrophin-releasing factor precursor. *Nature*. 1983;301(5900):537-40.
- Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P. Synaptic physiology of central CRH system. *Eur J Pharmacol*. 2008;583:215-25.
- Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current Status of the Nomenclature for Receptors for Corticotrophin-Releasing Factor and their ligands. *Pharmacol Rev*. 2003;55(1):21-6.
- Hauger RL, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg FM. Corticotrophin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007;5(4):453-79.
- Hsu SY, Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nature Med*. 2001;7(5):605-11.

Jamieson PM, Li C, Kukura C, Vaughan J, Vale WW. Urocortin 3 modulates the neuroendocrine stress response and is regulated in rat amygdala and hypothalamus by stress and glucocorticoids. *Endocrinology*. 2006;147(10):4578-88.

Kang HJ, Adams DH, Simen A, Simen BB, Rajkowska G, Stockmeier CA, Overholser JC, Meltzer HY, Jurjus GJ, Konick LC, Newton SS, Duman RS. Gene expression profiling in postmortem prefrontal cortex of major depressive disorder. *J Neurosci*. 2007;27(48):13329-340.

Kelsall CJ, Balment RJ. Native urotensins influence cortisol secretion and plasma cortisol concentration in the euryhaline flounder, *platichthys flesus*. *Gen Comp Endocrinol*. 1998;112(2):210-19.

Koob GF, Heinrichs SC, Pich EM, Menzaghi F, Baldwin H, Miczek K, Britton KT. The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. *Ciba Found Symp*. 1993;172:277-289;discussion 290-75.

Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2 gamma receptor. *Mol Endocrinol*. 1998;12(8):1077-85.

Kozicz T, Yanaihara H, Arimura A. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. 1998;391(1):1-10.

Kuperman Y, Issler O, regev L, Musseri I, Navon I, Neufeld-Cohen A, Gil S, Chen A. Perifornical Urocortin-3 mediates the link between stress-induced anxiety and energy homeostasis. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2009;107(18):8393-98.

Larsen DA, Swanson P, Dickey JT, Rivier J, Dickhoff WW. In vitro thyrotropin-releasing activity of corticotropin-releasing hormone-family peptides in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol*. 1998;109(2):276-85.

Lederis K, Fryer J, Rivier J, MacCannell KL, Kobayashi Y, Woo N, Wong KL. Neurohormones from fish tails. II: Actions of urotensin I in mammals and fishes. *Recent Prog Horm Res*. 1985a;41:553-76.

Lederis K, Fryer JN, Yulis CR. The fish neuropeptide urotensin I: its physiology and pharmacology. *Peptides*. 1985b;6(3):353-61.

Lederis K, Letter A, McMaster D, Moore G, Schlesinger D. Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus*. *Science*. 1982;218(4568):162-65.

Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Nat Acad Sci.USA*. 2001;98(13):7570-75.

- Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW. Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotropin-releasing factor receptor expression. *J neurosci*. 2002;22(3):991-1001.
- Li C, Chen P, Vaughan J, Blount A, Chen A, Jamieson PM, Rivier J, Smith MS, Vale WW. Urocortin III is expressed in pancreatic β -Cells and stimulates insulin and glucagon secretion. *Endocrinology*. 2003;144(7):3216-24.
- Li C, Chen P, Vaughan J, Lee KF, Vale WW. Urocortin 3 regulates glucose-stimulates insulin secretion and energy homeostasis. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2007;104(10):4206-11.
- Li X, Fan M, Shen L, Cao Y, Zhu D, Hong Z. Excitatory responses of cardiovascular activities to urocortin 3 administration into the PVN of the rat. *Auton Neurosci*. 2010;154(1-2):108-11.
- Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis DE, de Souza EB. Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*. 1996;137(1):72-77.
- Lightman SL. Corticotropin-releasing factor. From stress to cognition. *Nature*. 1995;378(6554):233-34.
- Ling N, Esch F, Bohlen P, Baird A, Guillemin R. Isolation and characterization of caprine corticotropin releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;122(3):1218-24.
- Linton EA, Wolfe CD, Behan DP, Lowry PJ. A specific carrier substance for human corticotropin releasing factor in late gestational maternal plasma which could mask the ACTH-releasing activity. *Clin Endocrinol*. 1988;28(3):315-24.
- Lovejoy DA, Balment RJ. Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*. 1999;115(1):1-22.
- Lovejoy DA, Rotzinger S, Lovejoy DB. Evolution of complementary peptide systems. *Trends in Comparative Endocrinol Neurobiol*. 2009;1163:215-20.
- Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology*. 1995a;136(9):4139-42.
- Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proce Acade Sci USA*. 1995b;92(3):836-40.
- Manocha SL, Bourne GH. A stereotaxic atlas of the brain of the Cebus Monkey (*Cebus apella*). London: Oxford University Press; 1968. 97p.

Minniti F, Donato A, D'Este L, Renda T. Sauvagine/urotensin I-like immunoreactivity in the caudal neurosecretory system of a seawater fish *Diplodus sargus* L. in normal and hyposmotic milieu. *Peptides*. 1989;10(2):383-89.

Montecucchi PC, Anastasi A, de Castiglione R, Erspamer V. Isolation and amino acid composition of sauvagine. An active polypeptide from methanol extracts of the skin of the South American frog *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res*. 1980;16(3):191-99.

Montecucchi PC, Henschen A. Amino acid composition and sequence analysis of sauvagine, a new active peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res*. 1981;18(2):113-20.

Morley SD, Schonrock C, Richter D, Okawara Y, Lederis K. Corticotropin-releasing factor (CRF) gene family in the brain of the teleost fish *Catostomus commersoni* (white sucker):molecular analysis predicts distinct precursors for two CRFs and one urotensin I peptide. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1991;1(1):48-57.

Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, Majzoub JA. Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature*. 1995;373(6513):427-32.

Nakamura T, Sapru HN. Cardiovascular responses to microinjections of urocortins into the NTS: role of inotropic glutamate receptors. *Am J Physiol*. 2009; 296(6):H2022-29.

Oki Y, Sasano H. Localization and physiological roles of urocortins. *Peptides*. 2004;25:1745-49.

Pathy M, Schlesinger DH, Horvath J, Mason-Garcia M, Szoke B, Schally AV. Purification and characterization of peptides with corticotropin-releasing factor activity from porcine hypothalamic. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1986;83(9): 2969-73.

Paxinos P, Petrides M, Toga AW. The Rhesus Monkey Brain - In stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press;2009.409p.

Paxinos G, Mai JK. The Human Nervous System - Hypothalamus. San Diego: Academic Press. Sec ed., 2004. p.513-42.

Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology*. 1993; 133(6):3058-61.

Platzack B, Schaffert C, Hazon N, Conlon JM. Cardiovascular actions of dogfish urotensin I in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Gen Comp Endocrinol*. 1998;109(2):269-75.

Potter E, Behan DP, Linton EA, Lowry PJ, Sawchenko PE, Vale WW. The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1992; 89(9):4192-96.

Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R, Perrin M, Lewis K, Sawchenko PE, Vale WW. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1994;91(19):8777-81.

Reul JM, Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol*. 2002;2(1):23-33.

Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2001; 98(5): 2843-48.

Rivier J, Spiess J, Vale WW. Characterization of rat hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1983; 80(15): 4851-55.

Shibahara S, Morimoto Y, Furutani Y, Notake M, Takahashi H, Shimizu S, Horikawa S, Numa S. Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *The EMBO Journal*. 1983; 5(2): 775-79.

Singewald GM, Rjabokon A, Singewald N, Ebner K. The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuropsychopharmacology*. 2011; 36:793-804.

Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, Basso AM, Rivier J, Vale WW, Koob GF. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science*. 1996; 273(5281): 1561-64.

Stenzel-Poore MP, Heldwein KA, Stenzel P, Lee S, Vale WW. Characterization of the genomic corticotropin-releasing factor (CRF) gene from *Xenopus laevis*: two members of the CRF family exist in amphibians. *Mol Endocrinol*. 1992; 6(10):1716-24.

Suda T, Kageyama K, Sakihara S, Nigawara T. Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors. *Peptides*. 2004; 25(10):1689-1701. Review.

Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. 1983; 36(3): 165-86.

Swinny JD, Kalicharan D, Gramsbergen A, van der Want JJ. The localization of urocortin in the adult rat cerebellum: a light and electron microscopic study. *Neuroscience*. 2002; 114(4): 891-903.

Tanaka M, Telegdy G. Involvement of adrenergic and serotonergic receptors in antidepressant-like effect of Urocortin 3 in a modified forced swimming test in mice. *Brain Res Bull*. 2008; 29(11):1937-42.

Telegdy G, Adamik A. Involvement of CRH receptors in urocortin-induced hyperthermia. *Peptides*. 2008; 29(11):1937-42.

Turnbull AV, Rivier C. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc Soc Exp Biol and Med Soc Exp Biol Med.* 1997; 215(1): 1-10.

Turnbull AV, Vale WW, Rivier C. Urocortin, a corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, inhibits edema due to thermal injury in rats. *Eur J Pharmacol.* 1996; 303(3): 213-16.

Vale WW, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science.* 1981; 213(4514): 1394-97.

Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin MH, Vale WW, Sawchenko PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol.* 2000; 428(2): 191-212.

Venihaki M, Sakihara S, Subramanian S, Dickkes P, Weninger SC, Liapakis G, Graf T, Majzoub A. Urocortin III, a brain neuropeptide of corticotropin-releasing hormone family: modulation by stress and attenuation of some anxiety-like behaviors. *J Neuroendocrinol.* 2004; 16: 411-22.

Vasconcelos LA, Donaldson C, Sita LV, Casatti CA, Lotfi CF, Wang L, Cadinouche MZ, Frigo L, Elias CF, Lovejoy DA, Bittencourt JC. Urocortin in central nervous system of a primate (*Cebus apella*): sequencing, immunohistochemical, and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol.* 2003; 463(2): 157-75.

Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt JC, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy DA, Rivier C. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature.* 1995; 378(6554): 287-92.

Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Lelias JM, Kaghad M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *Fed Eur Bioch Socie Letter.* 1993; 335(1): 1-5.

Wittman G, Furesi T, Liposits Z, Lechan R, Fekete C. Distribution and axonal projections of neurons coexpressing thyrotropin-releasing hormone and urocortin 3 in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2009; 517(6): 825-40.

Woo NY, Hontela A, Fryer JN, Kobayashi Y, Lederis K. Activation of hypothalamus-hypophyseal-interrenal system by urophysectomy in goldfish. *Am J Physiol.* 1985; 248(2): 197-201.

Yamada C, Yamada S, Ichikawa T, Kobayashi H. Immunohistochemical localization of urotensin I and other neuropeptides in the caudal neurosecretory system of three species of teleosts and two species of elasmobranchs. *Cell Tis Res.* 1986; 244(3): 687-90.

ANEXO A: Cópia da ata de defesa da dissertação de mestrado

Janus

Universidade de São Paulo

RELATÓRIO DE DEFESA

Aluno: 42131 - 6985935 - 1 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Daniella Sabino Batagello no Programa: Ciências Morfofuncionais, do(a) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos 06 dias do mês de fevereiro de 2012, no(a) Edifício Biomédicas III realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Daniella Sabino Batagello, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Distribuição dos neurônios e campos terminais que expressam a urocortina 3 no sistema nervoso central de primata não-humano (*Cebus apella*)"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Jackson Cioni Bittencourt	Presidente	ICB - USP	<u>APROVADO</u>
Maria Julia Marques	Titular	UNICAMP - Externo	<u>Aprovada</u>
Maria Ines Nogueira	Titular	ICB - USP	<u>Aprovada</u>

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Lucianna Vicente da Silva _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 06 dias do mês de fevereiro de 2012.

Maria Julia Marques

Maria Ines Nogueira

Jackson Cioni Bittencourt
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 15/02/12 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Ciências obtido no Programa Ciências Morfofuncionais.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Prof.ª. Dra. MARILCE FAGUNDES DOS SANTOS
Presidente da CPG/ICB

ANEXO B: Cópia do resumo de submissão de um artigo científico

11/25/11

#1966 Review

User Home

[home](#) [about](#) [search](#) [current](#) [archives](#) [announcements](#) [submission](#)

Home > User > Author > Submissions > #1966 > Review

#1966 Review

[summary](#) [review](#) [editing](#)

Submission

Authors	João Paulo Damico, Edison Ervolino, Kelly Regina Torres, Daniella Sabino Batagello, Roelf Justino Cruz-Rizzolo, Claudio Aparecido Casatti, Jarbas Arruda Bauer
Title	Phenotypic alterations of neuropeptide Y- and calcitonin gene-related peptide-containing neurons innervating the rat temporomandibular joint during carrageenan-induced arthritis
Section	Articles
Editor	Nadia Moscato Carlo Pellicciari

Peer Review

Round 1

Review Version	1966-10394-1-RV.DOC 2011-11-24
Initiated	—
Last modified	—
Uploaded file	None

Editor Decision

Decision	—
Notify Editor	Editor/Author Email Record No Comments
Editor Version	None
Author Version	None
Upload Author Version	<input type="button" value="Choose File"/> No file chosen <input type="button" value="Upload"/>

the **European Journal of Histochemistry** (eISSN 2038-8306) is an Open Access, peer-reviewed journal published by PAGEPress, Pavia, Italy. All credits and honors to [PKP](#) for their OJS.

Editor-in-Chief:
Carlo Pellicciari, Italy

[Pay Now](#)

[Editorial Board](#)
[SCImago](#)
[Web statistics](#)
[Thanks to our Reviewers](#)
[Impact Factor 2010: 1.809](#)
[Index Copernicus 2010:
16.04](#)
[Notifications](#)
[View \(3 new\)](#)
[Manage](#)
[Current Issue](#)

ATOM	1.0
RSS	2.0
RSS	1.0

[Author](#)
[Submissions](#)
[Active \(1\)](#)
[Archive \(0\)](#)
[New Submission](#)
[User](#)

You are logged in as...

ccasatti

[My Profile](#)
[Log Out](#)
[Keywords](#)

AMP deaminase Fat
transplantation, liposuction,
adipose stem cells, adipocyte
Histidine-rich glycoprotein Reduced
folate carrier Skeletal muscle

ANEXO C: Cópia de um artigo científico submetido

**PHENOTYPIC ALTERATIONS OF NEUROPEPTIDE Y- AND
CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE-CONTAINING NEURONS INNERVATING
THE RAT TEMPOROMANDIBULAR JOINT DURING CARRAGEENAN-INDUCED
ARTHRITIS**

**João Paulo Damico^a, Edilson Ervolino^b, Kelly Regina Torres^c, Daniella Sabino
Batagello^c, Roelf Justino Cruz-Rizzolo^b, Cláudio Aparecido Casatti^{b,c*}, Jarbas
Arruda Bauer^a**

^aDepartment of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences,
University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil.

^bDepartment of Basic Sciences, School of Dentistry of Araçatuba, Univ Estadual
Paulista (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brazil.

^cDepartment of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo
(USP), São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:**

Dr. Cláudio Aparecido Casatti

Department of Basic Sciences, Araçatuba School of Dentistry, Univ Estadual Paulista –
UNESP, Rua José Bonifácio, 1193, Vila Mendonça, 16015-050, Araçatuba, São Paulo,
Brazil. Phone: +55 (18) 36362781, FAX: +55 (18) 36363332, e-mail:
ccasatti@foa.unesp.br

Key words: trigeminal ganglion, otic ganglion, superior cervical ganglion, arthritis.

Author's contributions: Jarbas Arruda Bauer, Cláudio Aparecido Casatti and João Paulo Damico designed the study. João Paulo Damico, Edilson Ervolino, Kelly Regina Torres, Daniella Sabino Batagello and Roelf Justino Cruz-Rizzolo carried out the experimental procedures, immunohistochemical processing, microscopic analysis, data collection and/or preparation of figures. Jarbas Arruda Bauer and Cláudio Aparecido Casatti contributed specifically to microscopic analysis procedures. All authors contributed to the project with continuous updates on the research topic, influencing thereby the progress of the project. All authors have reviewed and contributed to the different draft versions of the manuscript. All have read and approved the final manuscript.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interests.

Abstract

The aim of this study was to identify immunoreactive neuropeptide Y (NPY) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) neurons in the autonomic and sensory ganglia, specifically neurons that innervate the rat temporomandibular joint (TMJ). A possible variation between the percentage of these neurons in acute and chronic phases of carrageenan-induced arthritis was examined. Retrograde neuronal tracing was combined with indirect immunofluorescence to identify NPY-immunoreactive (NPY-IR) and CGRP-immunoreactive (CGRP-IR) neurons that send nerve fibers to the normal and arthritic temporomandibular joint. In normal joints, NPY-IR neurons constitute $78 \pm 3\%$, $77 \pm 6\%$ and $10 \pm 4\%$ of double-labeled nucleated neuronal profile originated from the superior cervical, stellate and otic ganglia, respectively. These percentages in the autonomic ganglia were significantly decreased in acute ($58 \pm 2\%$ to superior cervical ganglion and $58 \pm 8\%$ to stellate ganglion) and chronic ($60 \pm 2\%$ to superior cervical ganglion and $59 \pm 15\%$ to stellate ganglion) phases of arthritis, while in the otic ganglion these percentages were significantly increased to $19 \pm 5\%$ and $13 \pm 3\%$, respectively. In the trigeminal ganglion, CGRP-IR neurons innervating the joint significantly increased from $31 \pm 3\%$ in normal animals to $54 \pm 2\%$ and $49 \pm 3\%$ in the acute and chronic phases of arthritis, respectively. It can be concluded that NPY neurons that send nerve fibers to the rat temporomandibular joint are located mainly in superior cervical, stellate and otic ganglia. Acute and chronic phases of carrageenan-induced arthritis lead to a variation in the percentage of NPY autonomic and CGRP sensory neurons related to TMJ innervation.

Introduction

The rat temporomandibular joint (TMJ) is a richly innervated orofacial territory, supplied with sensory nerve endings originating mainly from the trigeminal ganglion and autonomic nerves originating from the superior cervical, stellate and otic ganglia^{1,2,3,4,5}. Axons innervating the TMJ contain several neuropeptides, among them are the neuropeptide Y (NPY) and the calcitonin gene related peptide (CGRP)^{6,7,8,9,10}. NPY is a 36 amino acid sequence related to the pancreatic polypeptide family. It is synthesized in the rat peripheral nervous system, mainly by autonomic sympathetic¹¹ and parasympathetic neurons¹². CGRP is a 37 amino acid peptide generated by the alternative splicing of calcitonin gene transcripts¹³; in the peripheral nervous system it is found in the perikarya of sensory ganglia¹⁴.

It has been verified that there is an increase in the concentrations of NPY and CGRP in the synovial fluid from patients with arthritic knee and temporomandibular joints^{15,16,17,18,19} as well as from rats with experimentally induced TMJ arthritis²⁰. Several studies have focused on CGRP immunohistochemical expression in sensory neurons that send axons to the knee and lumbar facet joints during arthritis^{21,22,23,24,25}. On the other hand, NPY expression in autonomic neurons has not been analyzed during arthritis. It is not clear, however, whether the neuropeptide increase in the TMJ synovial fluid is due to an increased release from a limited number of axons or whether, as part of the inflammatory response, more neurons are recruited for the production of neuropeptides.

In the present study, the percentage and morphometric characteristics of CGRP immunoreactive sensory neurons and NPY immunoreactive autonomic neurons that innervate normal or arthritic rat TMJ were investigated. For this purpose retrograde

neuronal tracing and immunohistochemistry methods were combined to evaluate NPY- or CGRP-IR autonomic neurons innervating the normal or arthritic rat TMJ.

Materials and Methods

Surgical Procedures

The experimental protocols were previously approved by the Institutional Committee for Research and Animal Care of the Biomedical Science Institute from University of São Paulo. All efforts were made to reduce the number of animals and to minimize suffering. Thirty male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 150 - 200 g were anesthetized by an intra-muscular injection of ketamine (80 mg/kg, Francotar® - Virbac, São Paulo, Brazil) and xylazine (10 mg/kg, Rompun® - Bayer, São Paulo, Brazil). The left supradiscal articular space of the TMJ was surgically exposed through a cavity made in the zygomatic process of the temporal bone, and one compact crystal cylinder of fluorescent retrograde neuronal tracer, fast blue [(trans-1-(5-amidino-2-benzofuranyl)-2-(6-amidino-2-indolyl)ethylene-2HCl], (EMS-Polyloy, GmbH, Gross-Ulmstadt, Germany) was deposited. This solid cylinder was prepared as described by Casatti *et al.* (1999)³. After deposition of the neuronal tracer, the cavity was sealed with gutta percha (Odhacan, Herpo dental Products Ltda, Rio de Janeiro, Brazil). The temporal muscle was repositioned and the skin sutured. The animals were subsequently divided into three groups: group 1 (n=15), control group, animals were submitted to intra-articular deposition of retrograde neuronal tracer alone 15 days prior to killing; group 2 (n=15), intra-articular deposition of retrograde neuronal tracer 15 days prior to killing, plus a 2 mg "pellet" of carrageenan (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 48 hours prior to killing, to induce an acute inflammatory response in the TMJ and; group 3 (n=15), intra-articular deposition of retrograde neuronal tracer and carrageenan 15 days prior to killing, to promote a chronic inflammatory response in the TMJ.

Tissue preparation

Fifteen days after deposition of the retrograde neuronal tracer, the animals were anesthetized with an intraperitoneal overdose of sodium pentobarbital and transcardiacally perfused through the aorta with 100 ml of 0.9% saline, followed by 700 ml of fixative solution of 4% formaldehyde (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in 0.1M phosphate buffered saline (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), pH 7.4 at 4°C. The trigeminal, superior cervical, stellate and otic ganglia were removed and post-fixed for 5 hours in the same fixative solution containing 20% (wt/v) sucrose at 4°C (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Frozen sections of 15 µm (superior cervical, stellate and otic ganglia) or 30 µm (trigeminal ganglion) were cut on a freezing microtome (Jung SM 2000R, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany), and submitted to the indirect immunofluorescence method.

Immunohistochemistry

Half of the animals from each group were used for NPY immunolabeling, and the other half was used for CGRP immunolabeling. The sections were rinsed twice in 0.1 M potassium phosphate-buffered saline pH 7.4, for 20 min. at room temperature. Sections were incubated in a solution of potassium phosphate-buffered saline containing primary polyclonal antibodies raised in rabbit to CGRP (1:2000, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) or NPY (1:2000, Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA), Triton X-100 (0.3%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and normal goat serum (dilution 1:200, Colorado Serum Company, Denver, CO, USA), for 24 h at 4°C. Sections

were rinsed twice in potassium phosphate-buffered saline, followed by incubation for 1 hour at room temperature with biotinylated secondary antibody raised in goat against rabbit IgG (1:250, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), rinsed again in potassium phosphate-buffered saline and then incubated for 1 hour at room temperature with Cy³ conjugated streptavidin (1:500, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). The sections were again rinsed twice in potassium phosphate-buffered saline, mounted on chrome-gelatin-coated slides, air-dried at room temperature and coverslipped with buffered glycerol solution.

Control Procedures

In order to observe whether leakage of the retrograde neuronal tracer to adjacent tissues had occurred, the TMJs were removed, postfixed overnight at 4°C in the same fixative solution (4% formaldehyde in 0.1M phosphate buffered saline, pH 7.4), and decalcified in a solution of 10% sodium citrate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and 25% formic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 2 weeks at 4°C. Following cryoprotection in 0.1M potassium phosphate-buffered saline containing 20% sucrose, frontal sections of 30 µm were cut on a freezing microtome, mounted on chrome-gelatin-coated slides, air-dried at room temperature and coverslipped with buffered glycerol solution.

To verify the histopathological conditions of the TMJs, additional decalcified TMJs from the three experimental groups were submitted to routine histological procedures (paraffin embedding) and 5 µm sections were stained with hematoxylin and eosin to be observed on the light microscope.

The contralateral superior cervical ganglion was collected to test for possible nonspecific labeling of autonomic perikarya caused by leakage of the retrograde neuronal tracer into the blood stream.

Control experiments were carried out by omission of the primary antibody and adsorption test to check the specificity of the immunostaining. There was no NPY- or CGRP-IR in the ganglia studied when both tests were applied.

Morphometric and Statistical Analysis

The counting method used was the central profiles count (Coggeshall & Lekan, 1996). The values were obtained by counting the number of fast blue labeled perikarya with visible nuclei in the sections, and by changing the filter to verify which fast blue labeled perikarya profiles were also immunoreactive to CGRP or NPY (double-labeled perikaryal profiles). Some of the ganglia were used to perform a serial reconstruction method to compare sequential sections in the series. This allowed labeled perikarya with visible nuclei to be identified from section to section. It was found that only 3% of the fast-blue neurons were counted twice, and it happened every time a perikaryon was sliced directly through the middle of the nucleus. As the mean diameter of the perikarya was 24 μm (and the nucleus diameter even smaller) most perikarya with visible nuclei were within the 15 μm or 30 μm sections. If a nucleus was sliced in its periphery, two adjacent sections would show perikaryal profiles with different nuclear volumes. In this case, the neuron would be counted only once, since the nucleated neuronal profile with the largest nuclear volume showed a visible nucleus, while in the nucleated neuronal profile with the smallest nuclear volume, the image of the nucleus was obscured by the intense

fluorescence present in the cytoplasm. This procedure revealed that the counting method was efficient, with only a 3% overestimation of the total population of labeled neurons. Since our counting method does not represent the absolute number of labeled perikarya, we have referred to labeled perikarya as labeled perikaryal profiles (Coggeshall et al., 1990; 1996). When the investigator was counting the cells, he did not know from which group the material belonged, and in some cases the material was counted by two individuals, giving highly reproducible results.

To calculate perikaryal diameter, the perikaryal profiles were observed by epifluorescence microscopy (magnification of 400x) and drawn using a camera lucida. To confirm the perikaryal outline, a concomitant analysis was made by phase contrast microscopy. The diameters were determined by computer-aided measurement (Sigmascan, Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA). Only perikaryal profiles with visible nucleolus, visible by simultaneous employment of the epifluorescence microscope and Nomarsky were selected for morphometric analyses.

The Kruskal–Wallis nonparametric ANOVA test and Dunn's multiple comparisons test were used, considering $P < 0.05$ as significant. The statistical analysis was applied to all available data.

Microscopic Observation

Fluorescent perikarya labeled with fast blue were observed on an epifluorescence photomicroscope (Optiphot 2, Nikon, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan) using a UV-2A filter (excitation wave length of 330-380 nm). Immunofluorescence was observed with a G-2A filter (510-560 nm) to reveal Cy³. The results were photographed with Ilford HP5 plus film (400 ASA).

Results

Control procedures

Histological analysis of the area of neuronal tracer deposition revealed that it was incorporated into the connective tissue throughout the supradiscal compartment, mainly in the synovial membrane, and did not leak into adjacent territories. The contralateral superior cervical ganglion did not reveal labeled nucleated neuronal profiles, indicating that systemic leakage was not a significant source of error.

Observation of hematoxylin and eosin stained TMJ sections showed, in group 1 (control group), a normal histological pattern with just a few macrophages in restricted areas of the subsynovial tissue (Fig. 1 A and B), however not characterizing an active inflammatory process. In group 2, there was an intense inflammatory infiltration composed of mononuclear cells and polymorphonuclear neutrophils located in the subsynovial tissue and mainly in the supradiscal articular space (Fig. 1 C and D). The TMJ was, therefore, in the acute phase of the inflammatory process. In group 3, there was a moderate inflammatory infiltration composed of mononuclear cells, distributed throughout all TMJ regions. The subsynovial connective tissue was infiltrated by lymphocytes, plasma cells and mainly macrophages, but the supradiscal articular space had few immune cells (Fig 1 E and F). The TMJ was, therefore, considered to be in the chronic phase of the inflammatory process. In both inflammatory groups (2 and 3), the presence of inflammatory cells was restricted to the TMJ compartment, and did not spread to surrounding periosteum, muscles or parotid gland.

NPY-IR in group 1(control group)

Fast blue-labeled nucleated neuronal profiles were observed in all ganglia studied, but only the autonomic ganglia (superior cervical, stellate and otic ganglia) showed NPY-IR in the cell bodies (Fig. 2 A and B).

In the superior cervical ganglion, a mean value of 138 ± 11 fast blue-labeled nucleated neuronal profiles per ganglion were observed, which were diffusely distributed throughout the ganglion. From these fast blue-labeled nucleated neuronal profiles, $78\% \pm 3\%$ also showed NPY-IR (Fig. 2 A and B; Fig. 3). The mean diameter was $24 \mu\text{m}$ (ranging from 17 to $35 \mu\text{m}$), with a unimodal distribution, obtained by measuring 176 double-labeled nucleated neuronal profiles randomly chosen from different superior cervical ganglia from control group animals. The stellate ganglion contained 11 ± 5 fast blue-labeled nucleated neuronal profiles per ganglion, of which $77\% \pm 6\%$ also showed NPY-IR (Fig. 3). The mean diameter of these double-labeled nucleated neuronal profiles was $28 \mu\text{m}$ (ranging from 20 to $39 \mu\text{m}$) and was obtained by measuring 40 double-labeled nucleated neuronal profiles randomly chosen from different stellate ganglia of the control group. The otic ganglion showed 37 ± 11 fast blue-labeled nucleated neuronal profiles per ganglion, of which $10\% \pm 4\%$ were NPY-IR (Fig. 3), with a mean diameter of $22 \mu\text{m}$ (ranging from 16 to $25 \mu\text{m}$) obtained by measuring 16 double-labeled nucleated neuronal profiles randomly chosen from different otic ganglia of the control group.

In the trigeminal ganglion, no double-labeled nucleated neuronal profiles were found.

NPY-IR in groups 2 and 3 (acute and chronic phases of inflammation)

In all the autonomic ganglia studied, there were no statistically significant changes in the number of fast blue-labeled nucleated neuronal profiles between the different groups.

In the superior cervical ganglion, the percentage of double-labeled nucleated neuronal profiles in group 2 ($58\% \pm 2\%$) was lower than in group 1 ($78\% \pm 3\%$) ($P < 0.01$) (Fig. 3). However, no significant difference was observed in the mean diameter of double-labeled nucleated neuronal profiles between groups 1 ($24 \mu\text{m}$, ranging from 17 to $35 \mu\text{m}$) and 2 ($24 \mu\text{m}$, ranging from 17 to $36 \mu\text{m}$), obtained by measuring 259 double-labeled nucleated neuronal profiles randomly chosen from different superior cervical ganglia of group 2.

In group 3, the percentage of double-labeled nucleated neuronal profiles ($60\% \pm 2\%$) was higher than in the group 2 ($58\% \pm 2\%$), but still lower than in the control group ($P < 0.01$) (Fig. 3). In group 3, no significant difference was observed in the mean diameter of double-labeled nucleated neuronal profiles (mean diameter of $24 \mu\text{m}$, ranging from 14 to $34 \mu\text{m}$), obtained by measuring 186 double-labeled nucleated neuronal profiles randomly chosen from different superior cervical ganglia of group 3.

In the stellate ganglion, the percentage of double-labeled nucleated neuronal profiles was significantly ($P < 0.05$) lower in groups 2 ($58 \pm 8\%$) and 3 ($59 \pm 15\%$) than in group 1 ($77 \pm 6\%$) (Fig. 3). No significant difference was observed in the mean diameter, obtained by measuring 15 and 13 double-labeled nucleated neuronal profiles randomly chosen from different stellate ganglia of groups 2 (mean diameter of $28 \mu\text{m}$, ranging from 21 to $41 \mu\text{m}$) and 3 (mean diameter of $27 \mu\text{m}$, ranging from 22 to $40 \mu\text{m}$), respectively.

In the otic ganglion, the percentage of double-labeled nucleated neuronal profiles was significantly ($P < 0.05$) higher in groups 2 ($19 \pm 5\%$) and 3 ($13 \pm 3\%$) than in group 1 ($10 \pm 4\%$) (Fig. 3). No significant difference was observed in the mean diameter, obtained by measuring 21 and 18 double-labeled nucleated neuronal profiles randomly chosen from different stellate ganglia of groups 2 (mean diameter of $21 \mu\text{m}$, ranging from 17 to $24 \mu\text{m}$) and 3 (mean diameter of $22 \mu\text{m}$, ranging from 17 to $26 \mu\text{m}$), respectively.

Finally, in the trigeminal ganglion, no double-labeled nucleated neuronal profiles were observed in groups 2 and 3.

CGRP-IR in groups 1, 2 and 3 (control, acute and chronic phases of inflammation, respectively)

In the trigeminal ganglion, a mean value of 206 ± 83 nucleated neuronal profiles per ganglion were labeled with fast blue, and most of these neurons were located in the dorsoposterolateral portion of the trigeminal ganglion and in the maxillo-mandibular intersection. There were no statistically significant changes in the number of fast blue-labeled nucleated neuronal profiles between different groups.

Out of the fast blue-labeled nucleated neuronal profiles, $32\% \pm 3\%$ were also immunoreactive to CGRP in group 1 (Fig. 2 C and D and Fig. 4). The percentage of double-labeled nucleated neuronal profiles was higher ($P < 0.001$) in groups 2 ($55\% \pm 2\%$) and 3 ($49\% \pm 3\%$) than in group 1 (Fig. 4). The mean diameter was $26 \mu\text{m}$ (ranging from 13 to $47 \mu\text{m}$) with a unimodal distribution, obtained by measuring 154 double-labeled nucleated neuronal profiles randomly chosen from different trigeminal ganglia of the control group. The mean diameter of double-labeled nucleated neuronal profiles in

groups 2 (mean diameter of 33 μm , ranging from 21 to 49 μm) and 3 (mean diameter of 33 μm , ranging from 20 to 51 μm) were higher than in group 1 ($P < 0.05$), and these values were obtained by measuring 86 and 106 double-labeled nucleated neuronal profiles randomly chosen from different trigeminal ganglia of groups 2 and 3, respectively.

Discussion

The modulatory role of neuropeptides in TMJ arthritis has been investigated over the past few years. The analysis of joint fluid has been used to correlate neuropeptide concentrations with clinical signs and symptoms of TMJ disease^{5,17,19,,26,27}. High levels of neuropeptides have been found in the synovial fluid from patients with temporomandibular joint (TMJ) inflammatory diseases^{5,16,19} and in experimentally-induced TMJ arthritis in rats²⁰. Among these neuropeptides are the calcitonin gene-related peptide (CGRP) and the neuropeptide Y (NPY), both having vasoregulatory functions and originating in sensory and autonomic ganglia, respectively. The autonomic ganglia that supply NPY fibers to the TMJ have been investigated^{2,28}; however, the morphometric characteristics of these perikarya have not been determined. It is not known whether, during TMJ inflammation, there is a modulation in the NPY or CGRP expression in neuronal profiles that send nerve fibers to the rat TMJ. Using a fluorescent retrograde neuronal tracing technique combined with immunofluorescence, the present study found that NPY immunoreactive fibers in the TMJ have sympathetic and parasympathetic origin. Also, there was a variation in the percentage of autonomic NPY and sensory CGRP neurons that send nerve fibers to the TMJ during the inflammatory process induced by carrageenan.

NPY immunoreactive neuronal profiles that send nerve fibers to the normal TMJ

In the present study, it was observed that most sympathetic neurons (78%) from the superior cervical ganglion that innervate the rat TMJ showed NPY-IR (Fig. 2 A and B; Fig. 3). Kido *et al.* (2001) had also observed a dense NPY innervation in the rat TMJ originating from superior cervical ganglion. Since a similar approach has not been made

in any other joint, comparisons were made with previous studies involving the innervation of other orofacial territories. There are available data showing the existence of different targets for NPY immunoreactive fibers of sympathetic and parasympathetic origin. Experiments using retrograde neuronal tracing technique combined with immunohistochemistry to identify NPY immunoreactive fibers in the rat submandibular and parotid glands^{29,30} and porcine parotid glands³¹ showed that the NPY sympathetic innervation is confined to the blood vessels of the glands, while periacinar NPY fibers have a parasympathetic origin. In the TMJ, it may also be possible that sympathetic NPY innervation is related to blood vessels while parasympathetic NPY nerve fibers innervate mainly the synovial membrane.

In the rabbit ear, NPY-IR neurons of small diameter from the superior cervical ganglion project primarily to arterial vessels³². It was found in the present work that in the superior cervical ganglion, neurons projecting to the TMJ and expressing NPY have, on average, small diameters (mean, $24 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Considering that the main targets of TMJ innervation are blood vessels (arterial and venous) and the synovial membrane, it is plausible that the major percentage ($78 \pm 3\%$) of superior cervical ganglion NPY perikarya projecting to the rat TMJ may be sending nerve fibers mainly to arterial blood vessels.

Regarding the parasympathetic innervation of the rat TMJ, it was shown for the first time that 10% of the retrogradely labeled neurons in the otic ganglion showed NPY-IR (Fig. 3). However, very little is known about the possible functions of parasympathetic innervation in the TMJ. In a previous study, it was observed that the removal of the rat superior cervical ganglion resulted in the complete absence of NPY fibers in the TMJ¹⁰.

These data are not in accordance with our findings considering that the otic ganglion is also a putative source of NPY innervation to the rat TMJ. Given that a small number of otic ganglion neurons (37 ± 11) project to the rat TMJ, and that from these neurons only 10% are NPY immunoreactive, one could expect a very low density of NPY immunoreactive parasympathetic fibers in the TMJ. In addition, there must be caution in assuming that a putative neurotransmitter molecule detected in cell bodies of a given population of neurons is necessarily transported to their terminals in concentrations detectable by immunohistochemical methods in epifluorescence or light microscopy. For instance, NPY had been detected by immunohistochemistry in the rat ciliary ganglion but was undetectable in nerve terminals of the iris and ciliary body of sympathectomized rats³⁰.

Regarding the trigeminal ganglion, our results are in agreement with previous studies showing no NPY immunoreactive perikarya in the normal rat^{33,34}.

NPY immunoreactive neuronal profiles that send nerve fibers to the arthritic TMJ

In the present work, a significant decrease in the percentage of double-labeled nucleated neuronal profiles in the superior cervical ganglion from animals with acute and chronic TMJ inflammation was found comparing with the control group (Fig. 3). A possible explanation for this result could be an increased transport of large dense core vesicles, reducing neuropeptides store in some perikarya to an undetectable level by immunohistochemistry. In line with this idea, there are studies showing a decreased density of NPY immunoreactive fibers in the human rheumatoid synovium³⁵, as well as an increase in the NPY concentration, during arthritis, in the synovial fluid of rat and human TMJ^{16,36}. In addition, some studies show that NPY is released under conditions

of elevated neuronal activity³⁷. Prolongated sympathetic stimulation over 1 hour decreases the content of NPY in sympathetic fibers innervating the spleen by 58%³⁸. Studies show that slow velocity of axonal transport of NPY results in a complete resupply of the nerve terminal with this neuropeptide around eleven days^{38,39}.

On the other hand, a diminished synthesis of NPY during arthritis may also be a putative explanation for the decreased number of double-labeled neuronal profiles found in this work. Inflammatory factors such as the leukemia inhibitory factor, generally produced during the onset of the inflammatory process, could be altering the NPY expression by the superior cervical ganglion neurons^{40,41}. Thus, if neuronal NPY synthesis is decreased during arthritis, the increased synovial fluid NPY encountered in the arthritic rat and human TMJ^{16,36} may have a non-neuronal origin, since immune cells are able to synthesize NPY and endothelium^{42,43,44}.

The stress hypothesis should not be neglected. Several studies showed that chronic or acute arthritis resulted in hypothalamus-pituitary-adrenal axis oscillations, identified by elevated circulating corticosterone levels^{45,46,47}. NPY plasma levels also rise in response to stress conditions and the release of the peptide proved to be mainly from noradrenergic nerve endings^{48,49}. However, this does not appear to be the case in the present study, since significant alterations in NPY concentration were found mainly in the synovial fluid and not in the plasma from rats submitted to carrageenan-induced arthritis²⁰.

Regarding the otic ganglion, we observed that there was a slight increase in the number of NPY double-labeled neuronal profiles during the acute and chronic inflammation (Fig. 3). The parasympathetic innervation of the TMJ is very poorly understood, and no data

is available regarding a modulatory role of this innervation during arthritis in any other joint, although its putative influence has already been suggested⁵⁰.

No double-labeled neuronal profiles were seen in the trigeminal ganglion from animals with acute and chronic TMJ inflammation, in the present study. Other experimental inflammatory procedures, such as a shallow cavity preparation in the rat molar tooth, equally failed to induce the appearance of NPY-IR in trigeminal ganglion cells⁵¹. It is interesting to note that carrageenan used as an inflammation-inducing model has been efficient in inducing acute and chronic inflammatory phases in the joint (Fig 1. C-D and E-F) as shown in other studies^{52,53}.

CGRP immunoreactive neuronal profiles that send nerve fibers to the normal and arthritic TMJ

This study showed that TMJ inflammation induced by carrageenan increases the percentage of CGRP-IR double-labeled neuronal profiles in the ipsilateral trigeminal ganglion, both in acute and chronic inflammation (Fig. 2 C and D; Fig. 4).

Our findings are in agreement with a study that employed the same double-labeling method, but in neurons from the dorsal root ganglia innervating the cat knee joint²¹. Thirty two hours after a unilateral joint inflammation caused by intra-articular injection of kaolin and carrageenan, the proportion of double-labeled neurons increased from 42% in the control animals to 52% in the experimental ones²¹.

Inflammation induced by complete Freund's adjuvant injection in the L5-L6 facet joint of the rat also caused a statistically significant increase in the percentage of CGRP neurons in the dorsal root ganglia L1 (17% to 50%) and L2 (24% to 39%) 7 days after inoculation²². In rats with complete Freund's adjuvant-induced arthritis, a significant

increase in the total number of CGRP immunoreactive neurons and in CGRP mRNA expression in neurons of dorsal root ganglia after adjuvant inoculation was observed^{24,54}. The CGRP concentration was also increased in the trigeminal ganglion 28 days after adjuvant deposition in the rat TMJ^{55,56}. Therefore, the literature shows that CGRP modulation during arthritis is evident in the onset of the inflammatory process and continues for a long period, in accordance with the present data.

The triggering mechanisms for the up-regulation of CGRP synthesis in the neuron are likely to involve the presence of nerve growth factor. It was observed that in carrageenan-induced arthritis, nerve growth factor concentration in the synovial membrane of the rat knee⁵⁷ and ankle⁵⁸ joints were significantly increased. In addition, injection of nerve growth factor into the skin of the rat ear induced an increase in the percentage of trigeminal ganglion neurons expressing CGRP⁵⁹. Besides the nerve growth factor, other proinflammatory substances such as the cytokine leukemia inhibitory factor and interleukin-1 could be up-regulating CGRP expression. The leukemia inhibitory factor is over expressed by synoviocytes of arthritic patients^{41,60}, and is retrogradely transported by the great majority of CGRP-LI sensory neurons from rat L4 and L5 dorsal root ganglia *in vivo*⁶¹. When Interleukin-1 was deposited in the rat TMJ, it resulted in an increased concentration of CGRP in the synovial fluid⁶². Thus, these data support the hypothesis that a reciprocal interaction between neural and immune systems occurs in the synovium, during joint inflammation.

In the morphometric analysis, the mean diameter of double-labeled neuronal profiles (fast blue and CGRP) in the trigeminal ganglion of animals from the inflamed groups was larger (33 μm) ($P < 0.05$) than that of the control group (26 μm). The analysis of these

data shows that out of the neuronal profiles innervating the TMJ with 35 to 45 μm , a very low percentage express CGRP in normal conditions. However, when the joint is inflamed, an increased percentage of these neuronal profiles (35 to 45 μm) begin to express CGRP, consequently increasing the mean diameter of double-labeled neuronal profiles. In a study performed in the cat knee joint, no statistically significant difference in the mean diameter of CGRP neurons innervating normal or inflamed joint was noted²¹. On the other hand, a statistically significant ($P < 0.01$) increase in the mean diameter of CGRP neurons in the dorsal root ganglia was observed after inflammation, induced by injection of complete Freund's adjuvant in the rat L5-L6 lumbar facet joint²².

In summary, the present study demonstrated that most NPY-IR neurons projecting to the normal rat TMJ are of sympathetic origin, with a minor contribution from neurons located in the parasympathetic otic ganglion. During the acute and chronic phase of unilateral carrageenan-induced TMJ inflammation, the percentage of NPY-IR neuronal profiles that send nerve fibers to the rat TMJ in the superior cervical ganglion decreased while in the otic ganglion it increased, when compared with the controls. In the trigeminal ganglion, out of the neuronal profiles that send nerve fibers to the rat TMJ, an increased number express CGRP in acute and chronic inflammation. In spite of both neuropeptides having vasoregulatory functions in the joints, NPY and CGRP have distinct origins and are differently expressed during arthritis in the rat TMJ, as detected by immunohistochemistry.

Acknowledgments

This study was supported by a research grant (# 98/16464-4) from FAPESP (The State of São Paulo Research Foundation, SP, Brasil) and fellowship grant from CAPES (the Federal Agency of Support and Evaluation of Postgraduate Education, Brasil). We thank Karina Vieira Casatti for reading the manuscript.

References

1. Widenfalk B, Wiberg M. Origin of sympathetic and sensory innervation of the temporomandibular joint. A retrograde axonal tracing study in the rat. *Neurosci Lett* 1990;109: 30-5.
2. Uddman R, Grunditz T, Kato J, Sundler F. Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. *Anat Embryol* 1998;197: 273-82.
3. Casatti CA, Frigo L, Bauer JA. Origin of sensory and autonomic innervation of the rat temporomandibular joint: a retrograde axonal tracing study with the fluorescent dye fast blue. *J Dent Res* 1999;78: 776-83.
4. Sessle BJ. Trigeminal central sensitization. *Rev Analgesia* 2005;8: 85-102.
5. Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol* 2011;97:179-206.
6. Ichikawa H, Wakisaka S, Matsuo S, Akai M. Peptidergic innervation of the temporomandibular disk in the rat. *Experientia* 1989;45: 303-4.
7. Shimizu S, Kido MA, Kiyoshima T, Tanaka T. Postnatal development of substance P-, calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactive nerve fibres in the synovial membrane of the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 1996;41: 749-59.
8. Haeuchi, Y, Matsumoto K, Ichikawa H, Maeda S. Immunohistochemical demonstration of neuropeptides in the articular disk of the human temporomandibular joint. *Cells Tissues Organs* 1999;164: 205-11.

9. Kido MA, Kiyoshima T, Kondo T, Ayasaka N, Moroi R, Terada Y, Tanaka T. Distribution of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat temporomandibular joint. *J Dent Res* 1993;72: 592-98.
10. Kido MA, Zhang JQ, Muroya H, Yamaza T, Terada Y, Tanaka T. Topography and distribution of sympathetic nerve fibers in the rat temporomandibular joint: immunocytochemistry and ultrastructure. *Anat Embryol* 2001;203: 357-66.
11. Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, Polak J, Bloom S, Goldstein M. Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand* 1982;116: 477-80.
12. Leblanc GG, Trimmer BA, Landis SC. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat cranial parasympathetic neurons: coexistence with vasoactive intestinal peptide and choline acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84: 3511-15.
13. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 1982;298: 240-44.
14. Ju G, Hökfelt T, Brodin E, Fahrenkrug J, Fischer JA, Frey P, Elde RP, Brown JC. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res* 1987;247: 417-31.
15. Larsson J, Ekblom A, Henriksson K, Lundeberg T, Theodorsson E. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and

- vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1991;20: 326-35.
16. Appelgren A, Appelgren B, Eriksson S, Kopp S, Lundeberg T, Nylander M, Theodorsson E. Neuropeptides in temporomandibular joints with rheumatoid arthritis: a clinical study. *Scand. J Dent Res* 1991;99: 519-21.
 17. Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundeberg T, Theodorsson E. Neuropeptides in the arthritic TMJ and symptoms and signs from the stomatognathic system with special consideration to rheumatoid arthritis. *J Orofac Pain* 1995;9: 215-25.
 18. Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundeberg T, Theodorsson E. Co-variation of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, substance P and neurokinin A in joint fluid from patients with temporomandibular joint arthritis. *Arch Oral Biol* 1995;40:127-35.
 19. Kopp S. Neuroendocrine, immune, and local responses related to temporomandibular disorders. *J Orofac Pain* 2001;15: 9-28.
 20. Lundeberg T, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Carleson J, Kopp S, Theodorsson E. A model for experimentally induced temporomandibular joint arthritis in rats: effects of carrageenan on neuropeptide-like immunoreactivity. *Neuropeptides* 1996;30: 37-41.
 21. Hanesch U, Heppelmann B, Schmidt RF. Quantification of cat's articular afferents containing calcitonin gene-related peptide or substance P innervating normal and acutely inflamed knee joints. *Neurosci Lett* 1997;223: 105-8.
 22. Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H. Phenotypic inflammation switch in rats shown by calcitonin gene-related peptide

- immunoreactive dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar facet joints. *Spine* 2001; 26:1009-13.
23. Ishikawa T, Miyagi M, Ohtori S, Aoki Y, Ozawa T, Doya H, Saito T, Moriya H, Takahashi K. Characteristics of sensory DRG neurons innervating the lumbar facet joints in rats. *Eur Spine J* 2005;14:559-64.
 24. Staton PC, Wilson AW, Bountra C, Chessell IP, Day NC. Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in a chronic inflammatory model of the rat knee joint: differential modulation by rofecoxib and paracetamol. *Eur J Pain* 2007;11:283-89.
 25. Ferreira-Gomes J, Adães S, Sarkander J, Castro-Lopes JM. Phenotypic alterations of neurons that innervate osteoarthritic joints in rats. *Arthritis Rheum* 2010;62:3677-85.
 26. Kaneyama K, Segami N, Sato J, Fujimura K, Nagao T, Yoshimura H. Prognostic factors in arthrocentesis of the temporomandibular joint: Comparison of bradykinin, leucotriene B₄, prostaglandin E₂, and substance P level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases. *J Oral Maxillofac* 2007;65: 242-47.
 27. Bouloux GF. Temporomandibular joint pain and synovial fluid analysis: a review of the literature. Review. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:2497-504.
 28. Tahmasebi-Sarvestani A, Tedman R, Goss AN. The influence of experimentally induced osteoarthrosis on articular nerve fibers of the sheep temporomandibular joint. *J Orofac Pain* 2001;15:206-17.

29. Luebke JI, Wright LL. Characterization of superior cervical ganglion neurons that project to the submandibular glands, the eyes, and the pineal gland in rats. *Brain Res* 1992;589: 1-14.
30. Leblanc GG, Landis SC. Target specificity of neuropeptide Y-immunoreactive cranial parasympathetic neurons. *J Neurosci* 1988;8: 146-55.
31. Wojtkiewicz J, Juranek JK, Kowalski I, Bladowski M, Całka J, Majewski M. Immunohistochemical characterization of superior cervical ganglion neurons supplying porcine parotid salivary gland. **Neurosci Lett** 2011;500:57-62.
32. Morris JL, Zhu BS, Gibbins IL, Blessing WW. Subpopulations of sympathetic neurons project to specific vascular targets in the pinna of the rabbit ear. *J Comp Neurol* 1999;412: 147-60.
33. Wakisaka S, Takikita S, Sasaki Y, Kato J, Tabata MJ, Kurisu K. Cell size-specific appearance of neuropeptide Y in the trigeminal ganglion following peripheral axotomy of different branches of the mandibular nerve of the rat. *Brain Res* 1993;620: 347-50.
34. Lazarov NE. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol* 2002;66:19-59.
35. Mapp PI, Kidd BL, Gibson SJ, Terry JM, Revell PA, Ibrahim NB, Blake DR, Polak JM. Substance P, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroscience* 1990;37:143-53.

36. Carleson J, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Srinivasan GR, Theodorsson E, Lundeberg T.. Effects of adjuvant on neuropeptide-like immunoreactivity in experimentally induced temporomandibular arthritis in rats. *Arch Oral Biol* 1996;4:705-12.
37. Hökfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. **Neuron** 1991;7:867-79.
38. Lundberg JM, Rudehill A, Sollevi A, Fried G, Wallin G. Co-release of neuropeptide Y and noradrenaline from pig spleen in vivo: importance of subcellular storage, nerve impulse frequency and pattern, feedback regulation and resupply by axonal transport. **Neuroscience** 1989;28:475-86.
39. D'Hooge R, De Deyn PP, Verzwijvelen A, De Block J, De Potter WP. Storage and fast transport of noradrenaline, dopamine beta-hydroxylase and neuropeptide Y in dog sciatic nerve axons. **Life Sci** 1990;47:1851-59.
40. Freidin M, Dougherty M, Kessler JA. Cell density regulates neuropeptide Y expression in cultured sympathetic neurons. *Brain Res* 1993;615:135-40.
41. Okamoto H, Yamamura M, Morita Y, Harada S, Makino H, Ota Z. The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1096-105.
42. Schwarz H, Villiger PM, von Kempis J, Lotz M. Neuropeptide Y is an inducible gene in the human immune system. *J Neuroimmunol* 1994;51:53-61.

43. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Stenfors C, Tirassa P, Theodorsson E, Lundberg T. Nerve growth factor stimulates production of neuropeptide Y in human lymphocytes. **Neuroreport** 1996;7:485-8.
44. Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, Yeh Y, Chen WT, Kleinman HK, Grouzmann E, Grant, D.S. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res* 1998;83:187-95.
45. Windle RJ, Wood SA, Kershaw YM, Lightman SL, Ingram CD, Harbuz MS. Increased corticosterone pulse frequency during adjuvant-induced arthritis and its relationship to alterations in stress responsiveness. *J Neuroendocrinol* 2001;13:905-11.
46. Lightman SL, Windle RJ, Ma XM, Harbuz MS, Shanks NM, Julian MD, Wood SA, Kershaw YM, Ingram CD. Hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Arch Physiol Biochem* 2002;110:90-3.
47. del Rey A, Wolff C, Wildmann J, Randolph A, Hahnel A, Besedovsky HO, Straub RH. Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis. **Arthritis Rheum** 2008;58:3090-9.
48. Ekblad E, Edvinsson L, Wahlestedt C, Uddman R, Hakanson R, Sundler F. Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers. *Regul Pept* 1984;8:225-35.
49. Bernet F, Dedieu JF, Laborie C, Montel V, Dupouy JP. Circulating neuropeptide Y (NPY) and catecholamines in rat under resting and stress conditions. Arguments for

- extra-adrenal origin of NPY, adrenal and extra-adrenal sources of catecholamines. *Neurosci Lett* 1998;250:45-8.
50. Jorgensen C, Sany J. Modulation of the immune response by the neuro-endocrine axis in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12:435-41.
 51. Itotagawa T, Yamanaka H, Wakisaka S, Sasaki Y, Kato J, Kurisu K, Tsuchitani Y. Appearance of neuropeptide Y-like immunoreactive cells in the rat trigeminal ganglion following dental injuries. *Arch Oral Biol* 1993;38:725-8.
 52. Tesser-Viscaíno SA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Ervolino E, Cruz-Rizzolo RJ, Costa SK, Muscará MN, Casatti CA. Putative antinociceptive action of nitric oxide in the caudal part of the spinal trigeminal nucleus during chronic carrageenan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint. *Brain Research* 2009;302:85-96.
 53. Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 2003;**104**:567–77.
 54. Calzà L, Pozza M, Zanni M, Manzini CU, Manzini E, Hökfelt T. Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience* 1998;82:575-89.
 55. Carleson J, Bileviciute I, Theodorsson E, Appelgren B, Appelgren A, Yousef N, Kopp S, Lundeberg T. Effects of adjuvant on neuropeptide-like immunoreactivity in the temporomandibular joint and trigeminal ganglia. *J Orofac Pain* 1997;11:195-9.
 56. Spears R, Dees LA, Sapozhnikov M, Bellinger LL, Hutchins B. Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. *J Orofac Pain* 2005;19:34-40.

57. Aloe L, Tuveri MA, Levi-Montalcini R. Studies on carrageenan-induced arthritis in adult rats: presence of nerve growth factor and role of sympathetic innervation. *Rheumatol Int* 1992;12:213-6.
58. Wu Z, Nagata K, Iijima T. Immunohistochemical study of NGF and its receptors in the synovial membrane of the ankle joint of adjuvant-induced arthritic rats. *Histochem Cell Biol* 2000;114:453-9.
59. Amann R, Sirinathsinghji DJ, Donnerer J, Liebmann I, Schuligoi R. Stimulation by nerve growth factor of neuropeptide synthesis in the adult rat in vivo: bilateral response to unilateral intraplantar injections. *Neurosci Lett* 1996;203:171-4.
60. Lotz M, Moats T, Villiger PM. Leukemia inhibitory factor is expressed in cartilage and synovium and can contribute to the pathogenesis of arthritis. *J Clin Invest* 1992;90:888-96.
61. Thompson SW, Vernallis AB, Heath JK, Priestley JV. Leukaemia inhibitory factor is retrogradely transported by a distinct population of adult rat sensory neurons: co-localization with trkA and other neurochemical markers. *Eur J Neurosci* 1997;9:1244-51.
62. Carleson J, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Theodorsson E, Lundberg T.. A model for the study of experimentally induced temporomandibular arthritis in rats: the effect of human recombinant interleukin-1 alpha on neuropeptide-like immunoreactivity. *J Orofac Pain* 1996;10:9-14.