

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

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 colocalizam 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 colocalização 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 colocalização 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 .

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 sanguínea, 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 sanguínea (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 espinhal de peixes, cuja estrutura é anatomicamente análoga à neuro-hipófise humana (Barysytte 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 hidroeletrolítico (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 subsequentes 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.

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

Com relação a expressão do RNAm de CRF₂ é similar entre rato e camundongo e 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 imunomarcção. 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 trigêmeo 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 sensorio-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 seqüência 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 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 denteado 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.

De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

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 Beha.* 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. *Proc Acad 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.

Patthy 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 Soc Lett*. 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-hypophysial-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.