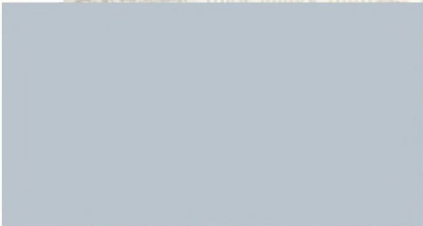


LUCIA REGINA GASPARETTO ARNT

ASPECTOS IMUNOCITOQUÍMICOS DOS NEURÔNIOS
QUE ELABORAM UROTENSINA I E UROTENSINA II NA
EXTREMIDADE CAUDAL DA MEDULA ESPINHAL DE
Carassius auratus (LINNAEUS) - Análise morfométrica
após administração de metopirona e dexametasona



Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Morfologia do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas — área de concentração: Biologia Celular

CURITIBA
1990

LUCIA REGINA GASPARETTO ARNT

ASPECTOS IMUNOCITOQUÍMICOS DOS NEURÔNIOS
QUE ELABORAM UROTENSINA I E UROTENSINA II NA
EXTREMIDADE CAUDAL DA MEDULA ESPINHAL DE
Carassius auratus (LINNAEUS) - Análise morfométrica
após administração de metopirona e dexametasona

Tese apresentada ao curso de Pós-Gradua-
ção em Morfologia do Departamento de
Biologia Celular da Universidade Federal
do Paraná, para obtenção do grau de Mes-
tre em Ciências Biológicas — área de con-
centração: Biologia Celular

CURITIBA
1990

LUCIA REGINA GASPARETTO ARNT

**ASPECTOS IMUNOCITOQUÍMICOS DOS NEURÔNIOS QUE ELABORAM
UROTENSINA I E UROTENSINA II NA EXTREMIDADE CAUDAL DA
MEDULA ESPINHAL DE *Carassius auratus* (LINNAEUS) - Análise
morfométrica após administração de metopirona e dexametasona**

Tese apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Morfologia do
Departamento de Biologia Celular da
Universidade Federal do Paraná,
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas - área de
concentração: Biologia Celular

CURITIBA
1990

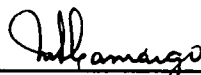
**ASPECTOS IMUNOCITOQUÍMICOS DOS NEURÔNIOS QUE ELABORAM
UROTENSINA I E UROTENSINA II NA EXTREMIDADE CAUDAL DA
MEDULA ESPINHAL DE *Carassius auratus* (LINNAEUS) - Análise
morfométrica após administração de metopirona e dexametasona**

por

LUCIA REGINA GASPARETTO ARNT

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em
Morfologia - área de concentração Biologia Celular,
pela Comissão formada pelos Professores:

ORIENTADORA:



Profa. Maria de Lourdes Zanardini Camargo,
Universidade Federal do Paraná - Brasil.



Prof. Paulo de Tarso Chaves,
Universidade Federal do Paraná - Brasil.



Prof. Waldemiro Gremski,
Universidade Federal do Paraná - Brasil.

Curitiba, 07 de agosto de 1990.

ORIENTADORES

Professora MARIA DE LOURDES ZANARDINI CAMARGO

Orientação Geral e Morfo-Histologia

Departamento de Biologia Celular

Universidade Federal do Paraná - Brasil

Professor Dr. JAMES NOLAN FRYER

Neuroendocrinologia, Imunocitoquímica e Morfometria

Departamento de Anatomia

Universidade de Ottawa - Canadá

A

Regina Maura,
minha mãe, um exemplo;
 ensinaste-me a amar a vida,
 a conhecer a realidade,
 a conquistar pela perseverança.

Ivo Carlos,
meu pai, meu mestre;
 orientador nos objetivos da vida,
 contigo aprendi como é fácil e bom viver,
 ensinaste-me a difícil arte de conviver.

Ivo Carlos Filho,
meu irmão, meu amigo;
 companheiro de todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir o currículo universitário, duas opções se me apresentaram: assumir as tarefas exigidas pelo trabalho profissional ou prosseguir na busca de novos conhecimentos e aperfeiçoar os ensinamentos básicos auferidos no curso de Biologia.

A escolha veio do íntimo. Senti que a conquista da primeira fase acadêmica deveria seguir-se uma nova etapa, para o aperfeiçoamento profissional e a gratificação pessoal.

Ouvi meus pais e deles recebi incentivos. Seus conselhos ensinaram-me que a busca do saber ocupa o tempo, aprimora a cultura, desenvolve a inteligência, para um aperfeiçoamento pessoal e para melhor servir ao semelhante.

Quando eles falavam do meu futuro, diziam que cada oportunidade, cada experiência, cada momento deve ser aproveitado com humildade e simplicidade, cultivado com carinho, apreendido com sabedoria e guardado com inteligência, para posteriormente ensinar, divulgar e aperfeiçoar.

Obrigada meus pais, por me terem mostrado que a vida metódica torna a rotina diária uma sucessão agradável de momentos felizes, enquanto o convívio com os fatos exige a

douta sabedoria da liberdade formal, da amizade sincera e da espera alerta.

Professores do ensino básico, exemplos de dedicação, de compreensão e de paciência; moldavam cada um para que, no futuro, desenvolvesse suas potencialidades. A vocês, o meu reconhecimento.

A **Universidade** é o lugar privilegiado para gerar conhecimentos, produzir verdades, desenvolver pesquisas. Foi aí, em uma de nossas Universidades, a **Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, que mestres de talento, com largo tirocínio e sólida cultura, preocupados com a formação da juventude, ensinaram os meandros da ciência, as técnicas e os avanços tecnológicos. A cada um de meus **Professores universitários**, a homenagem, o respeito e a amizade, que resistirão, vitoriosamente, às provas do tempo e da distância.

A **Pós-Graduação a nível de Mestrado** foi o compromisso que assumi para prosseguir no aperfeiçoamento tecnológico, na ampliação e solidificação dos conhecimentos. Escolhi, na **Universidade Federal do Paraná**, a Morfologia como o curso para meu Mestrado, acatando sugestão do Professor **Dr. Waldemiro Gremski**. Fui discípula de eminentes professores, sempre preocupados com a formação acadêmica e com o estímulo à investigação, geradora do progresso. **Amigos e companheiros** mais experientes transmitiram seus ensinamentos, guiando-me e conduzindo-me com seus pensamentos, idéias e exemplos. Obrigada, Mestres!

Entre todos aqueles aos quais tenho gratidão, busquei na minha Orientadora geral e de Morfo-Histologia, Professora Maria de Lourdes Zanardini Camargo, o estímulo à investigação, à perfeição das técnicas de laboratório. Mentora de várias gerações de juventude, educadora exemplar, sabe, como poucos, transformar o básico, o simples e o rotineiro, em fundamental e primordial. Ao valorizar os pequenos fatos e as simples rotinas, cria substratos importantes para novos trabalhos e novos conhecimentos. Com os mais sinceros agradecimentos e respeitoso reconhecimento dirigidos à minha orientadora, sou imensamente grata por todas as lições prelecionadas, pelo calor humano e carinho com que acalma e orienta meus passos de mestranda.

Os agradecimentos são extensivos aos eminentes Professores, **Dr. Waldemiro Gremski**, Vice-Diretor do Setor de Ciências Biológicas, exemplo de tenacidade e competência; **Dra. Maria Célia Jamur**, coordenadora amiga e incentivadora; **Dra. Edith Fanta**, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Morfologia e aos demais **Professores do corpo docente** do Departamento de Biologia Celular, da Universidade Federal do Paraná. O incentivo, a compreensão e o estímulo destes docentes levaram-me à conclusão do Mestrado e concederam-me a oportunidade de realizar um estágio no Laboratório do Professor Dr. James Nolan Fryer, do Departamento de Anatomia da Universidade de Ottawa (Ottawa - Canadá).

À Professora **Dra. Maura Valim do Val-Sella**, da Universidade Estadual de São Paulo, agradeço a acolhedora re-

cepção no Departamento de Fisiologia Geral, onde tive o privilégio de freqüentar o curso Sistemas Endócrinos de Peixes.

Aos **colegas mestrando**s, pelo estímulo e amizade pessoais.

A dissertação de Mestrado, trabalho final do Curso, estava programada para desenvolver-se em histologia dos peixes.

O estágio no Departamento de Anatomia da Universidade de Ottawa, Laboratório do Professor Dr. James Nolan Fryer, fez com que aprendesse novos métodos e me interessasse pela neuroendocrinologia do sistema neurosecretor caudal dos peixes.

As técnicas de laboratório do Dr. James Nolan Fryer e do Dr. Karl Lederis introduziram as bases de minha pesquisa.

A permanência no referido serviço, o entusiasmo com a metodologia laboratorial e os primeiros êxitos com os resultados obtidos permitiram ao Dr. James Nolan Fryer sugerir a utilização do tema em estudo, para minha tese de Mestrado, com a qual pretendo obter o grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Celular, no Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

A partir de então, o apoio e o entusiasmo, a orientação sãbia e segura do Dr. James Nolan Fryer estiveram sempre presentes no comando de cada um dos experimentos.

Durante a realização das pesquisas e na elaboração desta tese, colaboraram:

na determinação do nível do cortisol plasmático através da técnica de radioimunoensaio: **Bärbel Traynor;**

nas fotografias: **Ken Lawrence, Bill Elis;**

na orientação do manuseio dos computadores: **Lyndon Keeping, Bea Valentine, Lucy Pickavance;**

na orientação e discussão da técnica imunocitoquímica: **Yanming Che;**

com valiosas sugestões no desenvolvimento do trabalho e nas correções dos termos técnicos utilizados: **Maxwell Hincke, Eunice Lee, Leonard Maler, Roberto Narbaitz, William Staines, Walter Hendelman, Joseph Hinke, R.M. Pelletier e Susan Tolnai,** do Departamento de Anatomia da Universidade de Ottawa; **Maria Célia Jamur, Paulo de Tarso Chaves, Waldemiro Gremski,** do Departamento de Biologia Celular; **Bento Arce Gomez,** do Departamento de Genética; **Romeu Schultz,** do Departamento de Fisiologia; **José Domingos Fontana,** do Departamento de Bioquímica; **Luiz Pereira Ramos,** do Departamento de Química; **Luiz Gonzaga Caleffe e Nelva Maria Zibetti Sganzerla,** do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná;

nas referências bibliográficas e obtenção das separatas: **Suzana Guimarães Castilho,** da Biblioteca do Setor de Ciências da Saúde; a **Equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná;**

na correção do vernáculo: **Myrian Izabel Scheffer Carneiro;**

na correção do inglês, para o Summary, Philip Albert James Gorin;

com o suporte financeiro: **Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).**

A todos, meus profundos e sinceros agradecimentos.

A elaboração de um trabalho científico exige a presença e a dedicação de uma equipe.

Na equipe de serviço onde desenvolvi este experimento e meu aperfeiçoamento científico, os agradecimentos estendem-se ao Pesquisador Chefe, Professor **Dr. James Nolan Fryer**. Sua modéstia esconde um grande mestre, e sua humildade, um sábio pesquisador.

Sempre preocupado com a formação de outrem, sabe transformar a metodologia científica em fatos novos. Ao estimular a pesquisa, aproveita os avanços tecnológicos para melhorar os métodos científicos. Para superar problemas, busca as mais simples soluções escondidas. Para obtenção do êxito, enfeita as rotinas com o trabalho ético, o capricho, a perseverança e a ação metódica.

Minha gratidão a esse pesquisador, a esse mestre e orientador que me ensinou, aperfeiçoou e orientou no desenvolvimento do protocolo de pesquisa que se constituiu nesta tese de mestrado.

Como homenagem especial e eterna gratidão, indiquei o Professor **Dr. James Nolan Fryer** como meu **orientador nos temas de neuroendocrinologia, imunocitoquímica e morfometria.**

A arte de traduzir pensamentos em frases e a ciência de interpretar fatos e valorizar resultados foi-me ensinada pelo Professor Dr. Ivo Carlos Arnt, do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná.

A ele, um agradecimento especial, pela dedicação com que percorreu cada linha desta tese, procurando ensinar e orientar cada uma das fases da montagem editorial.

Com ele aprendi a reunir os fatos, alinhar as frases, ajustar os parágrafos e, por fim, concluir e apresentar o texto.

Ao encerrar os termos de agradecimentos, quero registrar o reconhecimento especial e perene àqueles que me auxiliaram a ter a honra de ser admitida no Curso de Pós-Graduação a nível de Doutorado, na Escola de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade de Ottawa, Canadá, disciplina de Anatomia, área de especialização: Neuroendocrinologia.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxii
RESUMO	xxiv
SUMMARY	xxvii
OBJETIVOS	xxxi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Sistema neurosecretor caudal dos peixes	6
2.2 Urotensinas	14
2.2.1 Urotensina I	16
2.2.2 Urotensina II	21
2.3 Localização imunocitoquímica dos peptídeos UI e UII	25
2.3.1 Localização imunocitoquímica da urotensina I.	25
2.3.2 Localização imunocitoquímica da urotensina II	28
2.4 Imunocitoquímica	30
2.4.1 Teste de co-localização	33
2.4.2 Teste de especificidade	34
2.5 Morfometria	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Técnicas histo-imunocitoquímicas	40
3.1.1 Teste de co-localização	46
3.1.2 Teste de especificidade	47
3.2 Morfometria	48
3.3 Avaliação quantitativa do cortisol plasmático por radioimunoensaio	52

4	RESULTADOS	53
4.1	Aspectos gerais do sistema neurosecretor caudal do <i>Carassius auratus</i> (L.)	54
4.2	Análise histológica e morfométrica dos neurônios imunorreativos à urotensina I	55
4.2.1	Peixes tratados com solução salina 0,6% (grupo "A", controle)	55
4.2.2	Peixes tratados com metopirona (grupo "B") ..	65
4.2.3	Peixes tratados com dexametasona (grupo "C").	69
4.3	Análise histológica e morfométrica dos neurônios imunorreativos à urotensina II	74
4.3.1	Peixes tratados com solução salina 0,6% (grupo "A", controle)	84
4.3.2	Peixes tratados com metopirona (grupo "B") ..	88
4.3.3	Peixes tratados com dexametasona (grupo "C").	97
4.4	Teste de co-localização	110
4.5	Teste de especificidade	110
4.6	Radioimunoensaio	119
5	DISCUSSÃO	124
5.1	Aspectos gerais do sistema neurosecretor caudal	124
5.2	Análise histológica e morfométrica dos neurônios imunorreativos à urotensina I e à urotensina II	126
5.3	Teste de co-localização	135
5.4	Teste de especificidade	135
5.5	Radioimunoensaio	139
	CONCLUSÕES	141
6	APÊNDICE	142
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

LISTA DE TABELAS

I	Características gerais do experimento realizado com Carassius auratus (L.)	38
II	Dados gerais das amostras de Carassius auratus (L.)	39
III	Análise morfométrica das áreas das células neurosecretores imunorreativos à urotensina I (pericários e núcleos)	63
IV	Análise estatística das áreas dos pericários neurosecretores imunorreativos à urotensina I. Comparação dos grupos "A" e "B"	71
V	Análise estatística das áreas dos núcleos neurosecretores imunorreativos à urotensina I. Comparação dos grupos "A" e "B"	72
VI	Análise estatística das áreas dos pericários das células neurosecretores imunorreativos à urotensina I. Comparação dos grupos "A" e "B"	73
VII	Análise estatística das áreas dos núcleos das células neurosecretores imunorreativos à urotensina I. Comparação dos grupos "A" e "C"	75
VIII	Análise morfométrica das áreas das células neurosecretores imunorreativos à urotensina II (pericários e núcleos)	86
IX	Análise morfométrica das áreas das células neurosecretores imunorreativos à urotensina	

	II que contactam o fluido cerebrospinal (pericários e núcleos)	87
X	Análise estatística das áreas dos pericários neurosecretores imunorreativos à urotensina II. Comparação dos grupos "A" e "B"	92
XI	Análise estatística das áreas dos núcleos das células neurosecretoras imunorreativas à urotensina II. Comparação dos grupos "A" e "B"	94
XII	Análise estatística das áreas dos pericários neurosecretores imunorreativos à urotensina II que contactam o fluido cerebrospinal. Comparação dos grupos "A" e "B"	99
XIII	Análise estatística das áreas dos núcleos das células neurosecretoras imunorreativas à urotensina II que contactam o fluido cerebrospinal. Comparação dos grupos "A" e "B"..	101
XIV	Análise estatística das áreas dos pericários neurosecretores imunorreativos à urotensina II. Comparação dos grupos "A" e "C"	104
XV	Análise estatística das áreas dos núcleos das células neurosecretoras imunorreativas à urotensina II. Comparação dos grupos "A" e "C"	105
XVI	Análise estatística das áreas dos pericários neurosecretores imunorreativos à urotensina II que contactam o fluido cerebrospinal. Comparação dos grupos "A" e "C"	108
XVII	Análise estatística das áreas dos núcleos das células neurosecretoras imunorreativas à urotensina II que contactam o fluido cerebrospinal. Comparação dos grupos "A" e "C"..	109

LISTA DE FIGURAS

1	Diagrama representativo das relações mútuas entre os fatores que influenciam o resultado final de um processo de reação imunocitoquímica.	3
2	Ilustração esquemática do sistema nervoso central de um teleosteos típico, segundo LEDERIS (1984)	9
3	Comparação da seqüência de aminoácidos da urotensina I (UI) de <i>Cyprinus carpio</i> , hormônio liberador de corticotropina (HLC) e ovino e da sauvagina (SVG) da pele do sapo	18
4	Comparação da seqüência de aminoácidos dos seis peptídios UII conhecidos e da somatostatina-14.	22
5	Aspectos macroscópicos de um exemplar adulto de <i>Carassius auratus</i> (L.)	37
6	Representação esquemática dos 7 cortes seriados utilizados para reações imunocitoquímicas e para os testes de especificidade de um peptídio com o anti-soro específico	43
7	Representação esquemática dos 10 cortes paralelos e adjacentes numerados em seqüência alternada, gradualmente crescente, utilizados para pesquisa de co-localização da UI-ir e/ou da UII-ir, em quatro lâminas separadas	44
8	Microscópio composto Zeiss com uma câmara clara acoplada	49

9	Aspectos do conjunto eletrônico utilizado para medição dos neurônios imunorreativos e análise dos resultados	51
10	Corte histológico sagital do sistema neurosecretor caudal de C. auratus do grupo "A". Teste imunocitoquímico para UI	56
11	Corte histológico sagital da urófise de C. auratus do grupo "A". Teste imunocitoquímico para UI	57
12	Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A", incluindo parte do sistema neurosecretor caudal. Teste imunocitoquímico para UI	58
13	Corte histológico sagital de parte da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste imunocitoquímico para UI	60
14	Detalhe de um corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste imunocitoquímico para UI .	61
15	Aspecto parcial de um corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste imunocitoquímico para UI	62
16	Área dos pericários secretores de UI-ir dos C. auratus do grupo "A"	64
17	Área dos núcleos de neurônios secretores de UI-ir dos C. auratus do grupo "A"	64
18	Área dos pericários secretores de UI-ir dos C. auratus do grupo "B"	66
19	Área dos núcleos de neurônios secretores de UI-ir dos C. auratus do grupo "B"	66

20	Média das áreas dos pericários secretores de UI-ir dos C. auratus tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C")	67
21	Média das áreas dos núcleos de neurônios secretores de UI-ir	68
22	Área dos pericários secretores de UI-ir dos C. auratus do grupo "C"	70
23	Área dos núcleos de neurônios secretores de UI-ir dos C. auratus do grupo "C"	70
24	Corte histológico sagital próximo da linha mediana da porção caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste imunocitoquímico para UII	76
25	Corte histológico sagital da medula espinhal de C. auratus do grupo "A", mostrando diferentes populações celulares. Teste imunocitoquímico para UII	77
26	Detalhe de um corte histológico sagital da medula espinhal de C. auratus do grupo "A", mostrando os neurônios secretores imunorreativos à UII pequenos. Teste imunocitoquímico para UII	79
27	Detalhe de um corte histológico sagital da medula espinhal de C. auratus do grupo "A", mostrando as células Dahlgren imunorreativas à UII, de tamanho médio. Teste imunocitoquímico para UII	80
28	Aspecto dos pericários grandes da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A"; corte histológico sagital. Teste imunocitoquímico para UII	81
29	Corte histológico sagital da porção caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A",	

	mostrando células neurosecretoras que contactam o fluido cerebrospinal. Teste imunocitoquímico para UII	82
30	Aspecto de um corte histológico sagital, mostrando os pericários parvo e magnocelulares imunorreativos à UII que contactam o fluido cerebrospinal de <i>C. auratus</i> do grupo "A". Teste imunocitoquímico para UII	83
31	Área dos pericários secretores de UII-ir dos <i>C. auratus</i> do grupo "A"	85
32	Área dos núcleos de neurônios secretores de UII-ir dos <i>C. auratus</i> do grupo "A"	85
33	Área dos pericários dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos <i>C. auratus</i> do grupo "A"	89
34	Área dos núcleos de neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos <i>C. auratus</i> do grupo "A"	89
35	Área dos pericários secretores de UII-ir dos <i>C. auratus</i> do grupo "B"	90
36	Área dos núcleos de neurônios secretores de UII-ir dos <i>C. auratus</i> do grupo "B"	90
37	Média das áreas dos pericários secretores de UII-ir dos <i>C. auratus</i> tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C")	93
38	Média das áreas dos núcleos de neurônios secretores de UII-ir dos <i>C. auratus</i> tratados com solução salina (0,6%) (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C")	95
39	Área dos pericários dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos <i>C. auratus</i> do grupo "B"	96

40	Área dos núcleos de neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos C. auratus do grupo "B"	96
41	Média das áreas dos pericários dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos C. auratus tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C")	98
42	Média das áreas dos núcleos dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos C. auratus tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C")	100
43	Área dos pericários secretores de UII-ir dos C. auratus do grupo "C"	102
44	Área dos núcleos de neurônios secretores de UII-ir dos C. auratus do grupo "C"	102
45	Área dos pericários dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos C. auratus do grupo "C"	107
46	Área dos núcleos de neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos C. auratus do grupo "C"	107
47	Neurônios secretores da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A"; corte histológico sagital. Teste de co-localização com o anti-soro UI	111
48	Células neurosecretoras da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A"; corte histológico sagital. Teste de co-localização com o anti-soro UII	112
49	Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste de especificidade com UI (anti-soro) ...	114

50	Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste de especificidade com UI (peptídio) + UI (anti-soro)	115
51	Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste de especificidade com HLC (peptídio) + UI (anti-soro)	116
52	Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste de especificidade com UII (anti-soro) ..	117
53	Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste de especificidade com UII (peptídio) + UII (anti-soro)	118
54	Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de C. auratus do grupo "A". Teste de especificidade com somatostatina (peptídio) + UII (anti-soro)	120
55	Nível médio de corticóide no plasma sanguíneo de C. auratus tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C")	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Complexo avidina-biotina-peroxidase (" Avidin-biotin-peroxidase complex")
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
°C	Temperatura em graus centígrados
CAPES	Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Co.	"Cooperation"
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HLC	Hormônio liberador de corticotropina
HRP	"Horseradish peroxidase"
¹²⁵ I	Iodo radioativo
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Mfg.	"Manufacturing"

N	Tamanho da amostra
NH ₂	Resíduo amino-terminal ou resíduo N-terminal
p	Nível de probabilidade
PAP	Peroxidase-anti-peroxidase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato ("Phosphate buffered saline")
Pro	Prolina
Ser	Serina
SVG	Sauvagina
t	Teste t de "Student"
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
UI	Urotensina I
UI-ir	Urotensina I-imunorreativa
UII	Urotensina II
UII-ir	Urotensina II-imunorreativa
Val	Valina
V.P.	Via peritoneal

RESUMO

Em 36 espécies de *Carassius auratus* (L.) estudou-se a porção caudal da medula espinhal.

Os peixes, separados em três grupos de 12 exemplares, foram tratados diariamente, durante seis dias, com injeções via peritoneal de 100 µl de diferentes drogas: solução salina 0,6% (grupo controle, grupo "A"); metopirona (grupo "B"); dexametasona (grupo "C").

A imunocitoquímica com anti-soro urotensina I de *Catostomus commersoni* e urotensina II de *Gillichthys mirabilis*, combinada com análise morfométrica computadorizada, foram utilizadas para investigar a ação do nível de corticóide sobre os neurônios imunorreativos a urotensina I (UI-ir) e a urotensina II (UII-ir) do sistema neurosecretor caudal do peixe dourado.

Ao microscópio óptico, verificou-se que os neurônios secretores imunorreativos à UI agrupavam-se em duas populações: células neurosecretoras pequenas (parvocélulas) e neurônios imunorreativos de maior tamanho (magnocélulas). A análise morfométrica mostrou que, nos peixes tratados com metopirona, as áreas das superfícies celulares e nucleares das células neurosecretoras imunorreativas à UI diminuíram significativamente, em relação ao grupo controle. Ao contrário, nos exemplares tratados com dexametasona, os resultados apresentaram um aumento signi-

ficativo das áreas celulares e nucleares.

Os cortes histológicos também apresentaram imunorreatividade com UII e foram identificados três grupos celulares: células neurosecretoras pequenas, de tamanho intermediário e grandes. Em células pequenas e grandes, fortemente imunorreativas à UII, observaram-se algumas ramificações dendríticas bulbares que, atravessando as células do revestimento do canal central, entram em contacto com o fluido cerebrospinal.

A análise morfométrica mostrou que as áreas dos neurônios imunorreativos à UII que não contactam o fluido cerebrospinal e de seus núcleos, diminuíram significativamente após o tratamento com metopirona. Porém, as injeções de dexametasona não determinaram alterações significativas no pericário e núcleo das células neurosecretoras de UII-ir que não contactam o fluido cerebrospinal, dos peixes do grupo "C". Somente nas células que contactam o fluido cerebrospinal, o aumento da área dos neurônios e de seus núcleos foi significativo, nos exemplares deste grupo.

A imunorreação obtida em cortes adjacentes tratados com anti-soros para UI e UII revelou a possibilidade da co-existência de UI-ir e UII-ir em um mesmo neurônio. Todas as células neurosecretoras apresentaram imunorreatividade para UII. A co-localização de imunorreatividade para UI e para UII foi observada em alguns pericários neurosecretores. Não foram notadas células neurosecretoras contendo imunorreatividade para UI, somente.

Nos peixes submetidos a tratamento com metopirona, os níveis de cortisol do plasma sanguíneo estavam significativamente elevados, quando comparados com aqueles que receberam inje -

ções de dexametasona; nestes, o cortisol plasmático mostrou níveis muito baixos, ou até não detectáveis.

Esses resultados demonstram que os hormônios adrenocorticoesteróides influenciam a atividade secretora do sistema neurosecretor caudal do peixe dourado e sugerem que os hormônios adrenocorticoesteróides promovem a secreção seletiva de UI, mas não de UII.

Novas investigações serão necessárias para determinar se os hormônios adrenocorticoesteróides influenciam a secreção de UI diretamente por ação sobre as células Dahlgren, ou indiretamente alterando processos fisiológicos, como a osmorregulação, que é, por sua vez, regulada pela UI.

SUMMARY

The caudal spinal cord was dissected from 36 specimens of *Carassius auratus* (L.) and studied.

Fish were divided into three groups, with 12 specimens per group. Each group received a 6 day treatment involving peritoneal injections of 100 μ l saline 0.6% (control group), metopirone or dexamethasone.

Immunocytochemical investigations with an antiserum to *Catostomus commersoni* urotensin I and *Gillichthys mirabilis* urotensin II, combined with computer-assisted morphometric analysis were used to assess the effects of corticoid status on urotensin I-immunoreactive (UI-ir) and urotensin II-immunoreactive (UII-ir) on neurons of the goldfish neurosecretory system.

Light microscopy revealed that UI-ir neurons were distributed in two populations: small (parvocellular) neurosecretory cells and large (magnocellular) secretory neurons. Morphometric analysis revealed, with fish treated with metopirone, significant decreases in both cellular and nuclear areas of the UI-ir cells, compared with those of the control group. In contrast with the results obtained with metopirone, dexamethasone administration resulted in significant increases in both cellular and nuclear area of UI-ir neurons.

Histological sections also demonstrated immunoreactive

ty with the UII antiserum and indicated the presence of three different cell groups, namely small-, medium- and large-sized perikarya. Some small and large strongly UII-ir neurons gave rise to bulbous dendrite-like processes that were in contact with the cerebrospinal fluid.

Morphometric analysis indicated with fish treated with metopirone, significant decreases in both cellular and nuclear areas of the cerebrospinal fluid contacting UII-ir cells. However, dexamethasone injections did not give rise to significant variations in perikarya and nuclear areas of UII-ir cells that did not contact with cerebrospinal fluid. The cerebrospinal fluid contacting cells of fish receiving dexamethasone revealed significant increases in cellular and nuclear areas.

Immunocytochemistry on adjacent sections treated with UI or UII antiserum indicated the possibility of co-existence of UI-ir and UII-ir in the same neuron. All neurosecretory cells contained UII immunoreactivity. A colocalization of UII- and UI-immunoreactivities was observed in many, but not all of the neurosecretory perikarya. No neurosecretory cells contained UI-immunoreactivity only.

Metopirone treated goldfish showed a significant increase of plasma cortisol levels, in contrast with fish treated with dexamethasone which had low or undetectable levels of cortisol.

These results demonstrate that adrenocorticosteroids hormones influence the secretory activity of the goldfish caudal neurosecretory system and suggest that adrenocorticosteroid hormones promote the selective secretion of UI, but not of UII.

Further investigations will be required to determine if

adrenocorticosteroid hormones influence the secretion of UI directly by actions on Dahlgren cells or indirectly by altering physiological processes (i.e., osmoregulation) which are in turn regulated by UI.

Em vez de lamentar a juventude universitária, saibamos dar-lhe ânimo, ensinando-lhe o caminho da ciência e da verdade. E, a juventude sabe agradecer com uma resposta surpreendente ...
Elvio CLEMENTE

OBJETIVOS

- * Demonstrar a ocorrência e a localização dos neurônios que elaboram urotensina I e urotensina II no sistema neurosecretor caudal de *Carassius auratus*
- * Investigar a possibilidade de co-localização dos neuropeptídeos urotensina I e urotensina II no sistema neurosecretor caudal de *Carassius auratus*
- * Determinar se a atividade secretora dos pericários que elaboram urotensina I e urotensina II é influenciada pelos hormônios adrenocorticosteróides

1 INTRODUÇÃO

Os peixes, vertebrados primitivos (ORR, 1986), apresentam características especiais em seu sistema nervoso e neuroendócrino, que permitem importantes pesquisas neurobiológicas (ARNT *et alii*, 1990; BERN & LEDERIS; 1969; BERN *et alii*, 1985; COHEN & KRIEBEL, 1989; FALKMER *et alii*, 1984; FRIDBERG & BERN, 1968; FRYER & BOUDREAULT-CHÂTEAUVERT, 1981, 1985; FRYER *et alii*, 1988; KOBAYASHI *et alii*, 1986a; KRIEBEL *et alii*, 1985; LEDERIS *et alii*, 1974; PETER & FRYER, s.d.).

Os teleósteos, exceto os peixes integrantes das famílias Molidae, Sygnothidae e Muraenidae (FRIDBERG, 1962), apresentam neurônios secretores especiais, descritos por DAHLGREN (1914), que estendem seus axônios a uma expansão caudal (ENAMI, 1955) conhecida como urófise (HOLMGREN, 1959). O conjunto formado pelas células neurosecretoras, seus axônios e pela urófise produz, armazena e libera neuro-hormônios, entre eles, urotensina I (UI) (ICHIKAWA *et alii*, 1982) e urotensina II (UII) (BERN *et alii*, 1973), formando um verdadeiro sistema endócrino (sistema neurosecretor caudal) (ENAMI, 1955).

O sistema neurosecretor caudal dos teleósteos possui vários circuitos sinápticos locais, circundados por densa

rede capilar, com importantes funções neurofisiológicas e neuroendócrinas (MORITA *et alii*, 1961).

As técnicas imunocitoquímicas influenciaram profundamente o desenvolvimento da neurobiologia, nos últimos dois decênios.

As reações imunocitoquímicas são específicas e a especificidade depende da valorização dos fatores (fig. 1) que influenciam o resultado final dessas reações. Uma das condições para a especificidade é a prova de que a substância em investigação, no tecido, é realmente imunorreativa a um anti-soro puro específico (POOL *et alii*, 1982).

Testes de especificidade permitem a comprovação de uma imunorreação e demonstram, como resultado, a localização de um determinado antígeno, em um dado tecido, por estímulo de um anti-soro específico. Assim, o emprego das reações imunocitoquímicas tornou-se um dos mais poderosos instrumentos para identificar os transmissores específicos dos neurônios (COHEN & KRIEBEL, 1989; MACMILLAN & CUELLO, 1986), bem como as enzimas biossintéticas (GEFFEN, 1982), ou estudar novos neuropeptídios (BERN *et alii*, 1985; LEDERIS *et alii*, 1985b, 1987).

A presença dos peptídios urotensina I-imunorreativa (UI-ir) e urotensina II-imunorreativa (UII-ir) nas células do sistema neurosecretor caudal da medula espinhal, de espécimens de *Carassius auratus* (L.), é pesquisada neste experimento. Essa espécie, conhecida como peixe dourado ("goldfish"), é o teleosteo mais investigado quanto à regulação neu-

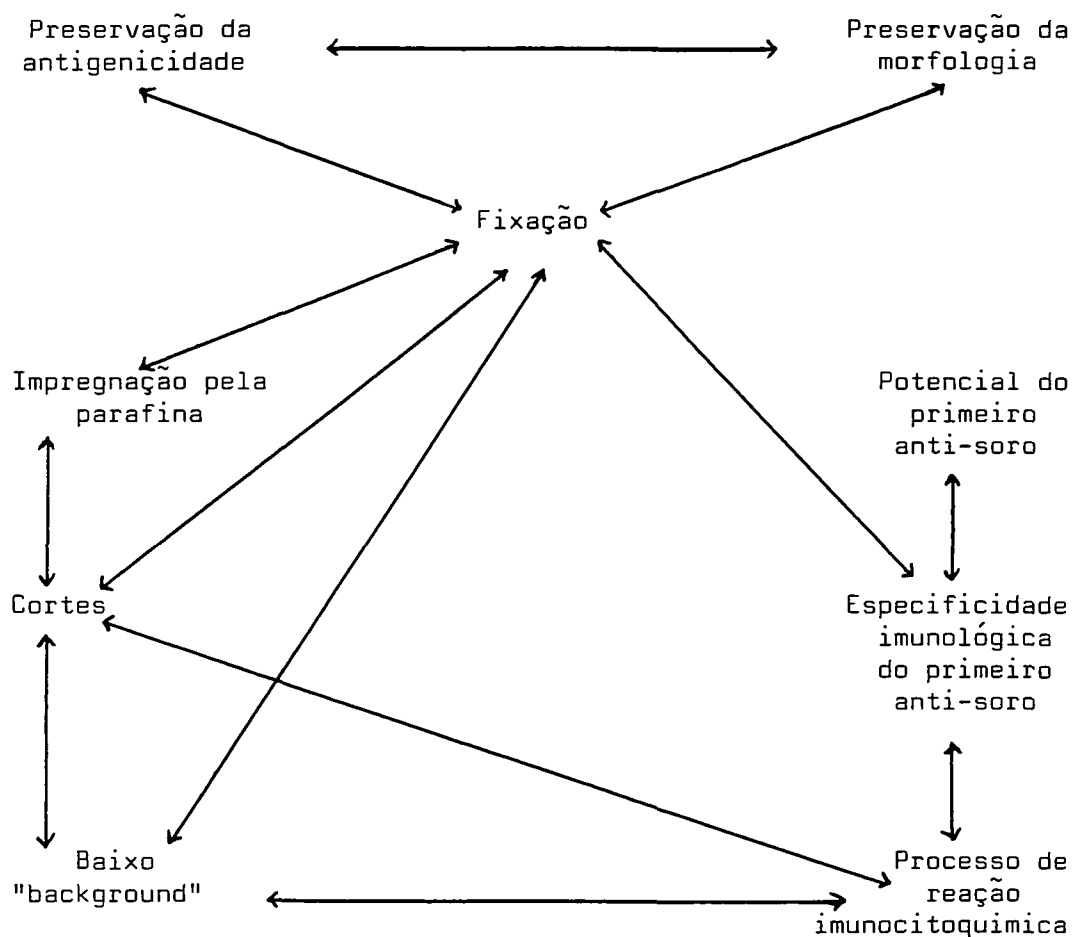


Figura 1. Diagrama representativo das relações mútuas entre os fatores que influenciam o resultado final de um processo de reação imunocitoquímica.

roendócrina e neurofisiológica (FRYER, 1981, 1989; FRYER & BOUDREAU-CHÂTEAUVERT, 1981; FRYER *et alii*, 1984, 1985a; FRYER & LEUNG, 1982; ICHIKAWA *et alii*, 1982, 1984, 1988; KOBAYASHI *et alii*, 1986b; MAETZ *et alii*, 1963; McMASTER & LEDERIS, 1988; MIDDLEBROOK & FRYER, 1984; YAMADA *et alii*, 1985, 1988; YULIS & LEDERIS, 1986b, 1987, 1988b).

O protocolo experimental desta investigação imunocitoquímica e morfométrica realizada no peixe dourado, visa demonstrar e avaliar a atividade secretora dos neurônios da medula espinhal caudal que elaboram UI e UII de um grupo controle de peixes. Em outros dois grupos distintos de *Carrasius auratus*, a atividade secretora dos neurônios da medula espinhal caudal que produzem UI e UII, será observada direta e indiretamente por imunorreações e pela morfometria, após administração de metopirona e dexametasona. A influência desses fármacos no nível de corticóide do plasma sanguíneo será estimada por técnica de radioimunoensaio.

A presença dos neuropeptídeos UI-ir e UII-ir em um mesmo corte será investigada pelas observações dos preparados imunocitoquímicos, em cortes seriados adjacentes, através de testes de co-localização.

Segundo PETER & FRYER (s.d.), a regulação dos mecanismos fisiológicos e neuroendócrinos que elaboram, armazenam e liberam neuro-hormônios ou neurotransmissores depende de impulsos e estímulos centrais e periféricos. Estímulos físicos, químicos ou físico-químicos, de qualquer ordem, podem excitar os sensores externos ou internos de um animal, pro-

vocando respostas em seus mecanismos de regulação neuro-endócrina.

Os fármacos metopirona e dexametasona (CARNES et alii, 1987; REBAR, 1986), agindo como estímulos químico-farmacológicos, interferem no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, permitindo estudar e avaliar os efeitos diretos e indiretos das alterações neuro-hormonais sobre a atividade secretora dos neurônios do sistema neurosecretor caudal.

Os estudos imunocitoquímicos realizados em tecidos do sistema nervoso e endócrino de vertebrados superiores e inferiores, têm significativa importância biomédica (KOBAYASHI et alii, 1986b).

O entendimento dos processos endócrinos dos vertebrados inferiores, tem provido informações fundamentais para a compreensão dos sistemas de mamíferos. O aparente conservacionismo no aspecto anatômico da maioria dos sistemas neurosecretores do cérebro dos vertebrados, sugere que os animais não mamíferos são, em geral, modelos apropriados para investigação.

A compreensão das alterações evolutivas na escala zoológica com o conhecimento dos mecanismos e funções originais de um organismo, como por exemplo, o mecanismo de regulação neurofisiológica e a fisiologia neuroendócrina em vertebrados inferiores, tornará mais fácil a compreensão e a interpretação desses fenômenos nos vertebrados superiores.

Quando se conhece mais da história filogenética e ontogênica de cada espécie, pode-se conseguir um entendimento mais profundo do maravilhoso mundo animal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SISTEMA NEUROSSECRETOR CAUDAL DOS PEIXES

ARSAKY (1813) observou em alguns peixes, pela primeira vez, a presença de um alargamento na região caudal da medula espinhal, o qual foi descrito anatomicamente por diferentes biólogos do século XIX e do início deste século (VERNE, 1914; FAVARO, 1925).

Mais tarde, DAHLGREN (1914), trabalhando com onze espécies de raia (Rajidae), descreveu a presença de células grandes, com características secretoras, na região caudal da medula espinhal. Essas células foram relacionadas, pelo mesmo, com o sistema elétrico dessas espécies.

A presença de grânulos eosinófilos, reunidos densamente ao redor dos vasos sanguíneos do alargamento caudal da medula espinhal, foi observada por VERNE (1914) em onze espécies de teleósteos. Ele relacionou o alargamento caudal da medula espinhal dos teleósteos com o lobo neural da hipófise dos vertebrados superiores, uma vez que algumas células desta região eram consideradas secretoras de neuro-hormônios.

SPEIDEL (1919) observou que a raia adulta, *Raia ocellata*, apresenta 120 vértebras. As células neurosecretoras,

em número próximo a 600, são encontradas ao longo da medula espinhal, a partir da sexagésima vértebra, até o final da região caudal. No mesmo experimento, o autor descreveu função secretora para as células descobertas por DAHLGREN (1914), contrariando as conclusões deste pesquisador.

Mais tarde, SPEIDEL (1922) relatou função secretora de algumas células do sistema nervoso e confirmou a presença de células neurosecretoras caudais em 30 espécies de peixes entre teleósteos, elasmobrânquios e ganóides, designando-nas como células Dahlgren.

FAVARO (1925) descreveu a expansão da parte caudal da medula espinhal da maioria dos teleósteos como sendo saciforme, e a considerou um órgão endócrino.

Trinta anos mais tarde, ENAMI (1955), em pesquisas realizadas na enguia japonesa, *Anguilla japonica*, demonstrou que as células Dahlgren apresentam ligação, através de seus axônios, com o alargamento caudal (órgão de armazenamento e liberação de material neurosecretor), designando esse conjunto como sistema neurosecretor caudal.

ENAMI (1955) notou que, em relação ao tamanho, é possível distinguir duas ou três classes de células: pequenas, intermediárias e grandes, em várias espécies de teleósteos (FRIDBERG, 1962, 1963; FRIDBERG & BERN, 1968; BERN & LEDERIS, 1978; KRIEBEL et alii, 1979; YAMAMOTO, 1979; OWADA et alii, 1985a; KOBAYASHI et alii, 1986b; ARNT et alii, 1990).

No mesmo ano, ENAMI (1955), realizando um corte no sistema neurosecretor, próximo à urófise, observou que a área se regenera no local da lesão e as células neurosecretoras próximas sobrevivem (FRIDBERG et alii, 1966).

O alargamento terminal da medula espinhal foi denominado de urófise, após várias discussões etimológicas (HOLMGREN, 1959; SANO, 1961; FRIDBERG, 1962, 1963; BERN et alii, 1967; BERN, 1969; BERN & LEDERIS, 1978). Por outro lado, a designação de sistema neurosecretor caudal (fig. 2) foi confirmada, face aos resultados de investigações anatômicas e histológicas, realizadas por HOLMGREN (1959), SANO (1961), FRIDBERG (1962, 1963); KRIEBEL et alii (1979), LEDERIS (1984); e pesquisas farmacológicas, fisiológicas e químicas, realizadas por KOBAYASHI et alii (1968); BERN & LEDERIS (1969, 1978), LEDERIS (1970, 1984), ZELNICK & LEDERIS (1973), LEDERIS et alii (1974).

Segundo observações de ENAMI (1959), a maioria dos peixes teleósteos estudados apresenta sistema neurosecretor caudal semelhante (fig. 2) (SANO & KAWAMOTO, 1959; BENNETT & FOX, 1962; FRIDBERG, 1962, 1963; HOMANA, 1962; ISHIBASHI, 1962; STERBA, 1962; PEYROT, 1964; SANO, 1965; SANO et alii, 1966; BERN et alii, 1967, 1985; FRIDBERG & BERN, 1968; HOMANA & TAMURA, 1967; BERN, 1969; YAMAMOTO, 1979; LEDERIS, 1984; OWADA et alii, 1985a; ARNT et alii, 1990).

Conforme SANO & KAWAMOTO (1959), nas regiões onde há maior quantidade de células Dahlgren está presente rica rede vascular e capilar, o que faz prever importante atividade

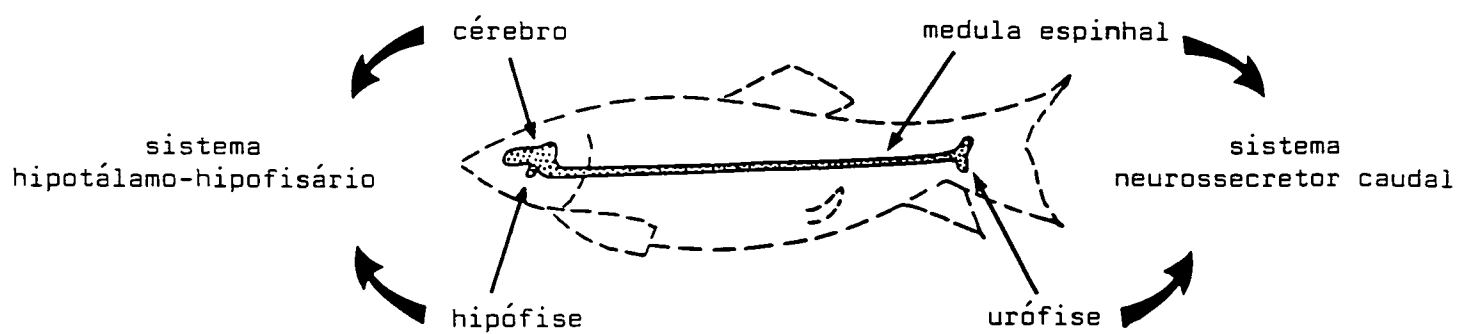


Figura 2. Ilustração esquemática do sistema nervoso central de um teleósteo típico, segundo LEDERIS (1984).

metabólica e hormonal. Estes pesquisadores demonstraram que a urófise também é ricamente vascularizada. KOBAYASHI *et alii* (1986b) afirmam que os axônios das células neurosecretoras terminam nos capilares.

Segundo SANO (1961, 1965), as células Dahlgren grandes da região caudal, do sistema neurosecretor dos teleósteos, parecem ser derivadas dos neuroblastos, enquanto as células neurosecretoras menores, localizadas na região dorsal, parecem derivar-se dos asteroblastos. Este pesquisador observou que a diferenciação da urófise ocorre em diferentes momentos da fase final do desenvolvimento larval, variando de espécie para espécie.

O desenvolvimento da urófise em diferentes espécies de peixes tem sido motivo de profundas pesquisas realizadas por BERN *et alii* (1967), FRIDBERG & BERN (1968), BERN (1969).

FRIDBERG (1962) e OWADA *et alii* (1985b) demonstraram, através de experimentos realizados em elasmobrânquios, que as células neurosecretoras caudais diminuem de tamanho à medida que se aproximam da porção terminal da medula espinhal nesses peixes.

Os peixes das famílias Molidae, Sygnathidae e Muraenidae não possuem o sistema neurosecretor caudal (FRIDBERG, 1962). HAMANA (1962), porém, demonstrou que, fugindo à regra, duas espécies da família Muraenidae, *Gymnothorax kidako* e *G. hepatica*, possuem o sistema, mas a urófise é achatada.

BENNETT & FOX (1962) chamam atenção para a complexidade e a intensidade da inervação do sistema neurosecretor

caudal, e sugerem importante desempenho fisiológico para o sistema (ISHIBASHI, 1962; SANO *et alii*, 1966; LEDERIS *et alii*, (1985b; BERN *et alii*, 1985).

STERBA (1962), através de estudos em microscopia eletrônica, concluiu que a morfologia ultra-estrutural das células neurosecretoras caudais é semelhante à das células neurosecretoras em geral. Os grânulos neurosecretores maduros emanam do aparelho de Golgi para o citoplasma e são transportados à urófise, pelo axônio. O axônio apresenta microtúbulos e mitocôndrias e, ao terminar na urófise, contém grânulos neurosecretores eletrodensos, com hormônios urofisários e pequenas estruturas sinápticas semelhantes a vesículas, possivelmente ricas em acetilcolina (FRIDBERG & BERN, 1968; KOBAYASHI *et alii*, 1986b).

FRIDBERG (1963) realizou estudos em elasmobrânquios e teleósteos. Naqueles, encontrou feixes neurosecretores, semelhantes ao axônio dos peixes ósseos, que seguiam ventral e lateralmente o canal central, para terminar na área vascular da urófise, o que mais tarde foi confirmado por FRIDBERG & BERN (1968). No mesmo experimento, FRIDBERG (1963) observou que os pericários das células Dahlgren dos teleósteos localizam-se nas porções ventral e lateral do canal central da medula espinhal caudal, entre a quinta e a oitava vértebras terminais (KRIEBEL *et alii*, 1979; LEDERIS, 1984; BERN *et alii*, 1985; KOBAYASHI *et alii*, 1986b).

PEYROT (1964) verificou que nos elasmobrânquios os pericários neurosecretores são muito grandes e distribuem-se ao longo da medula espinhal.

SANO *et alii* (1966) observaram que os neurônios secretores dos teleósteos possuem axônios, geralmente desmielinizados, que se estendem em direção à urófise. Este fato é citado também por FRIDBERG *et alii* (1966), BERN & LEDERIS (1978), KRIEBEL *et alii* (1979), YAMAMOTO (1979), OWADA *et alii* (1985a), KOBAYASHI *et alii* (1986b).

FRIDBERG *et alii* (1966) afirmaram que algumas espécies de teleósteos têm a capacidade de transformar células ependimais em células neurosecretoras, no período de regeneração, mesmo ocorrendo a total extirpação do sistema neurosecretor caudal.

Os mesmos autores, examinando eletromicroscopicamente células da glia, em *Pomilodus aestivalis*, apontaram algumas similaridades com as células do lobo neural da hipófise, o que mais tarde foi confirmado por KRIEBEL *et alii* (1979).

HONMA & TAMURA (1967) estudaram a irrigação sanguínea, a partir da última vértebra da porção caudal da medula espinhal e da urófise em teleósteos, e observaram características especiais: o sangue arterial, que circula nas artérias existentes entre as células dorsais, após percorrer várias ramificações, forma um plexo vascular em torno da urófise. Os capilares drenam o sangue para vasos mais espessos que se ramificam e levam o sangue venoso, através da veia caudal, até a veia porta renal.

A descrição histológica dos neurônios secretores caudais foi realizada por FRIDBERG & BERN (1968). Eles identificaram células com pericário grande e polimorfo, geral-

mente corado pelos corantes ácidos, com exceção de um pequeno número de células basófilas e cromóforas.

FRIDBERG & BERN (1968) comentam que a presença de células da glia é pouco freqüente na porção caudal da medula espinhal dos peixes ósseos.

Não há evidência da presença de células neurosecretoras na medula espinhal de tetrápodes (BERN, 1969).

PEARSON *et alii* (1980), estudando a porção caudal da medula espinhal de peixes ósseos, verificaram que algumas células Dahlgren apresentam dendrites que podem atingir o canal central e, assumindo a forma bulbosa, contactam o líquido cerebrospinal. Essas observações foram confirmadas, mais tarde, por OWADA *et alii* (1985a), YULIS & LEDERIS (1986b, 1988b), LEDERIS & YULIS (1987).

KRIEBEL *et alii* (1985) notaram que o sistema neurosecretor caudal dos teleósteos é ricamente innervado por feixes aminérgicos e, ocasionalmente, colinérgicos e peptidérgicos, oriundos do cérebro, e que alguns circuitos sinápticos locais também estão presentes.

Entre as espécies de teleósteos estudadas por KOBAYASHI *et alii* (1986b), a urófise apresentou peso entre 0,04 e 0,54 mg por 100 g de peso corporal.

2.2 UROTENSINAS

Segundo ENAMI (1959), o sistema neurosecretor caudal dos teleósteos é capaz de armazenar e secretar neuro-hormônios (BERN & LEDERIS, 1969).

Para MAETZ *et alii* (1963), a urotensina III é estimulador de Na⁺ nos peixes.

BERN *et alii* (1967) afirmam que a urotensina IV é indistinguível da arginina vasotocina, e está presente somente em poucas espécies de teleósteos. A urotensina IV age no mecanismo de retenção de água dos anfíbios (ICHIKAWA *et alii*, 1984).

Para LEDERIS (1969), BERN *et alii* (1985), as urofisininas, conjunto de proteínas putativas, livres de cisteína, análogas a neurofisininas, apresentam relações biogenéticas com as urotensinas, ainda não bem estabelecidas.

Os pesquisadores MUNEKATA *et alii* (1981), ICHIKAWA *et alii* (1984), LEDERIS (1984), McMASTER *et alii* (1984, 1986), BERN *et alii* (1985), estudando a urotensina II, peptídio de 12 aminoácidos, parcialmente homóloga e parcialmente análoga à somatostatina-14, observaram que ela participa na contração da musculatura lisa dos peixes.

A urotensina I, peptídio de 41 aminoácidos, é considerada homóloga e análoga ao hormônio liberador de corticotropina nos mamíferos, por ICHIKAWA *et alii* (1982), LEDERIS *et alii* (1982, 1983, 1985b, 1987), LEDERIS (1984), McMASTER *et alii* (1984, 1987), BERN *et alii* (1985).

Entre 1981 e 1984, os dois principais neuro-hormônios urofisários, urotensina I (UI) e urotensina II (UII), foram purificados e suas estruturas primárias determinadas por diversos pesquisadores: MUNEKATA *et alii* (1981), ICHIKAWA *et alii* (1982, 1984, 1988), LEDERIS (1984), LEDERIS *et alii* (1983), McMASTER & LEDERIS (1983), McMASTER *et alii* (1984).

LEDERIS (1984) e BERN *et alii* (1985) afirmaram que essas urotensinas são verdadeiros peptídios hormonais do sistema neurosecretor caudal dos peixes e que o local de produção destes peptídios parece ser as células Dahlgren, presentes nos segmentos caudais da medula espinhal dos peixes teleosteos, ganóides e elasmobrânquios.

LEDERIS (1984) mostrou que as estruturas para síntese, transporte, armazenamento e liberação das urotensinas seguem o modelo dos neurônios existentes no complexo hipotálamo-neuro-hipofisário. O autor supõe que os produtos de síntese dos neurônios caudais são transportados pela fluência axoplasmática, para posterior armazenamento na urófise ou até mesmo para serem por ela liberados. Para o pesquisador, em termos estruturais, a urófise pode ser considerada uma "segunda neuro-hipófise". Essa homologia entusiasmou novas pesquisas na busca de substâncias farmacologicamente ativas, possivelmente relacionadas estrutural ou biologicamente aos hormônios neuro-hipofisários (ICHIKAWA *et alii*, 1984; BERN *et alii*, 1985; LEDERIS *et alii*, 1985b, 1987; McMASTER *et alii*, 1986, 1987). A complexidade do sistema neu-

rossecretor caudal, diz o autor, dificulta o entendimento de suas funções fisiológicas, bem como a compreensão de seu complexo mecanismo endocrinológico. Ele observa que a busca intensa para elucidação das funções fisiológicas dos neurônios secretores, juntamente com a definição de sua estrutura e a caracterização da síntese e dos efeitos farmacológicos dos neuropeptídios, permitirá decifrar o enigmático sistema neurossecretor.

FRYER & LEDERIS (1985) consideram que os efeitos hipofisiotrópicos das urotensinas nos peixes estão bem esclarecidos. Os teleósteos são considerados primariamente dependentes do cortisol, o principal produto secretor homólogo da adrenocortical, responsável pela regulação hiperosmótica (adaptação dos peixes à água salgada) e pela regulação hiposmótica (adaptação dos peixes à água doce).

BERN *et alii* (1985) indicaram a capacidade das urotensinas para regular o transporte transepitelial diretamente através de diversas superfícies osmorreguladoras (LEDERIS *et alii*, 1985a).

BERN *et alii* (1985) também detectaram a acetilcolina em alta concentração na urófise, mas com função ainda não conhecida nesse local.

2.2.1 UROTENSINA I

A urotensina I (UI) influencia a hipófise dos peixes ósseos. A hipófise dos teleósteos também apresenta modifica-

ções relativas ao sexo e à idade, conforme VAL-SELLA *et alii* (1977), VAL-SELLA & FAVA-DE-MORAES (1979a, 1979b).

A UI é um peptídio de 41 resíduos de aminoácidos (fig. 3), os quais foram isolados do sistema neurosecretor caudal de três espécies de peixes teleósteos: *Catostomus commersoni* (LEDERIS *et alii*, 1982), *Cyprinus carpio* (ICHIKAWA *et alii*, 1982) e *Hippoglossoides elassodon* (McMASTER *et alii*, 1987). Essas urotensinas diferem umas das outras somente por dois resíduos de aminoácidos e têm uma seqüência semelhante a mais de 50% da cadeia peptídica do hormônio liberador de corticotropina (HLC) de 41 resíduos de aminoácidos isolados do hipotálamo de carneiro (fig. 3) (LEDERIS *et alii*, 1982, 1985b).

A sauvagina, peptídio de 40 resíduos de aminoácidos, isolado da pele do anfíbio *Phyllomedusa sauvagei* (fig. 3) (RENTA *et alii*, 1982), e a UI apresentam marcada homologia estrutural com o HLC e também participam na atividade secretora da corticotropina, o que foi comprovado nos trabalhos de RENTA *et alii* (1982), LEDERIS *et alii* (1985a), LEDERIS (1987), FRYER & LEDERIS (1988), GONZALEZ & LEDERIS (1988), MINNITI *et alii* (1989).

O HLC ovino é um estimulador do ACTH hipofisário em peixes e anfíbios. Estudos realizados por FRYER & LEUNG (1982) demonstraram que o HLC ovino estimula a secreção do ACTH, *in vitro*, da rostral pars distalis de *Carassius auratus* e aumenta a secreção do cortisol, *in vivo*, no mesmo peixe (FRYER *et alii*, 1983, 1984, 1985a; FRYER & LEDERIS, 1985, 1988; WELD & FRYER, 1987, 1988; FRYER, 1989).

UROSENSINA I	1	H - Asn - Asp - Asp - Pro - Pro - Ile - Ser - Ile - Asp - Leu - Thr - Phe - His - Leu - Leu - Arg - Asn - Met -	18
HLC	1	H - Ser - Gln - Glu - <u>Pro - Pro - Ile - Ser</u> - Leu - <u>Asp - Leu - Thr - Phe - His - Leu - Leu - Arg</u> - Glu - Val -	18
SAUVAGINA	1	pGlu - Gly - <u>Pro - Pro - Ile - Ser - Ile - Asp - Leu</u> - Ser - Leu - Glu - <u>Leu - Leu - Arg</u> - Lys - <u>Met</u> -	17
UROSENSINA I	19	Ile - Glu - Met - Ala - Arg - Asn - Glu - Asn - Gln - Arg - Glu - Gln - Ala - Gly - Leu -	33
HLC	19	Leu - <u>Glu - Met</u> - Thr - Lys - Ala - Asp - Gln - Leu - Ala - Gln - <u>Gln - Ala</u> - His - Ser -	33
SAUVAGINA	18	<u>Ile - Glu</u> - Ile - Glu - Lys - Gln - <u>Glu</u> - Lys - Glu - Lys - Gln - <u>Gln - Ala</u> - Ala - Asn -	32
UROSENSINA I	34	Asn - Arg - Lys - Tyr - Leu - Asp - Glu - Val - NH ₂	41
HLC	34	<u>Asn - Arg - Lys</u> - Leu - <u>Leu - Asp</u> - Ile - Ala - NH ₂	41
SAUVAGINA	33	<u>Asn - Arg</u> - Leu - Leu - <u>Leu - Asp</u> - Thr - Ile - NH ₂	40

Figura 3. Comparação da sequência de aminoácidos da urotensina I (UI) de **Cyprinus carpio**, hormônio liberador de corticotropina (HLC) ovino e da sauvagina (SVG) da pele do sapo. Os resíduos de aminoácidos do HLC e da SVG sublinhados demonstram a identidade na sequência com os resíduos de aminoácidos da UI de **Cyprinus carpio**. O outro peptídeo UI conhecido (isolado do **Catostomus commersoni**), difere da UI acima demonstrada, pelas substituições nas posições 24 (Ile) e 27 (Glu). (LEDERIS **et alii**, 1985).

BAKER *et alii* (1985), em experimentos realizados com o HLC ovino em *Salmo gairdneri*, e OKAWARA *et alii* (1988), face aos resultados obtidos com *Catostomus commersoni*, afirmaram ter observado que ocorre o mesmo fenômeno descrito no parágrafo anterior, com as espécies por eles pesquisadas.

A hipótese de que o sistema neurosecretor caudal interfere na regulação da função hipofisário-adrenal dos peixes teleósteos foi levantada por FRYER *et alii* (1983). Através de estudos em *Carassius auratus*, eles demonstraram que nesta espécie a UI estimula o eixo hipófise-adrenal e que a secreção do cortisol é estimulada *in vivo* pelo HLC ovino.

FRYER *et alii* (1984) estudaram diferentes espécies de teleósteos, *in vitro*, e observaram que a UI é de duas a três vezes mais potente, para a liberação do ACTH, que o HLC ou a sauvagina (FRYER *et alii*, 1985b; WELD & FRYER, 1988; FRYER, 1989). FRYER *et alii* (1984) supõem que a atividade da urotensina pode ser "fisiológica", uma vez que o potencial de liberação do ACTH decresce pela administração prévia ou simultânea de cortisol exógeno (LEDERIS *et alii*, 1985a; LEDERIS, 1987).

LEDERIS (1984) acredita ser prematuro considerar a UI como exclusivo fator liberador de corticotropina dos peixes; entretanto há evidências circunstanciais que demonstram que, ao menos um dos fatores liberadores de corticotropina hipotalâmica é a UI, ou um peptídeo muito semelhante a ela (LEDERIS *et alii*, 1985a, 1985b).

LEDERIS (1984), em estudos realizados em mamíferos, observou que a UI produz efeitos hemodinâmicos nesses animais; sua ação no rato mostra vasodilatação na região mesentérica e em outros leitos vasculares, fenômeno confirmado por LEDERIS *et alii* (1985a, 1985b). Por outro lado, LEDERIS (1984) mostrou que no cachorro a vasodilatação é observada somente a nível da região mesentérica.

BERN *et alii* (1985) comentam que, se a UI atua como um fator liberador de corticotropina nos teleósteos, então o cortisol, que é secretado como resultado da estimulação da secreção do ACTH, pode ter efeito metabólico importante, relacionado com a glicogênese.

A demonstração de que a UI, o HLC e a sauvagina estimulam a liberação do ACTH da **pars intermedia** do peixe dourado sugere, segundo FRYER & LEDERIS (1985), que esse peptídeo deve desempenhar papel regulador da secreção dos peptídeos derivados da molécula de pro-opiomelanocortina da **pars intermedia** dos teleósteos (FRYER, 1989; TRAN *et alii*, s.d.).

FRYER *et alii* (1985a) e FRYER & LEDERIS (1985) compararam os efeitos da UI, da sauvagina e do HLC no peixe dourado e perceberam que os dois últimos peptídeos estimulam a liberação do ACTH, 42% e 33%, respectivamente, menos que a UI.

Para SAWCHENKO (1987) e TRAN *et alii* (s.d.), o HLC isolado do hipotálamo de carneiro é um potente estimulador da secreção de adrenocorticotropina e β -endorfina da glândula hipofisária anterior dos mamíferos, *in vivo* e *in vitro*.

Por outro lado, WELD *et alii* (1987) demonstraram, em experimentos realizados em rato, que o análogo do HLC, o HLC- α hélice (9-41), age de forma semelhante.

ITOH & LEDERIS (1987) indicaram, através de estudos realizados em preparados de membranas de vasos sanguíneos de rato, que o sítio de ligação da UI com os receptores vasculares não só altera o fluxo de Ca^{2+} , como também antagoniza a ação ou a mobilização do Ca^{2+} intracelular.

A exemplo da UI e do HLC, WELD & FRYER (1987, 1988) demonstraram que as angiotensinas I e II também estimulam a liberação do ACTH da hipófise do peixe dourado.

Dependendo do método de extração empregado para a UI, pode-se obter um peptídeo completamente ativo, com 38 resíduos de aminoácidos (UI 4-41), segundo McMASTER *et alii* (1987).

GONZALEZ & LEDERIS (1988), em experimentos realizados no anfíbio *Rana catesbeiana*, observaram que o anti-soro específico para UI não apresentou imunorreação nos cortes histológicos do cérebro desta espécie.

TRAN *et alii* (1989) observaram que o TRH (hormônio tireotrópico) estimula os peptídeos derivados da molécula pro-opiomelanocortina no peixe dourado, da mesma forma que a UI.

2.2.2 UROTENSINA II

O princípio urofisário UII foi caracterizado biologicamente e seus aminoácidos sequenciados da urófise do teleosteo *Gillichthys mirabilis* (fig.4), por BERN *et alii* (1967).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
UII de Gillichthys	Ala	- Gly	- Thr	- Ala	- Asp	- Cys	- Phe	- Trp	- Lys	- Tyr	- Cys	- Val	
UII- α de Cyprinus	Gly	- Gly	- Gly	- Ala	- Asp	- Cys	- Phe	- Trp	- Lys	- Tyr	- Cys	- Val	
UII- β_1 de Cyprinus	Gly	- Ser	- Asn	- Thr	- Glu	- Cys	- Phe	- Trp	- Lys	- Tyr	- Cys	- Val	
UII- β_2 de Cyprinus	Gly	- Gly	- Asn	- Thr	- Glu	- Cys	- Phe	- Trp	- Lys	- Tyr	- Cys	- Val	
UII- γ de Cyprinus	Gly	- Gly	- Gly	- Ala	- Asp	- Cys	- Phe	- Trp	- Lys	- Tyr	- Cys	- Ile	
UII-A de Catostomus	Gly	- Ser	- Gly	- Ala	- Asp	- Cys	- Phe	- Trp	- Lys	- Tyr	- Cys	- Val	
UII-B de Catostomus	Gly	- Ser	- Asn	- Thr	- Glu	- Cys	- Phe	- Trp	- Lys	- Tyr	- Cys	- Val	
SOMATOSTATINA-14	Ala	- Gly	- Cys	- Lys	- Asn	- Phe	- Phe	- Trp	- Lys	- Thr	- Phe	- Thr	- Ser - Cys

Figura 4. Comparação da sequência de aminoácidos dos seis peptídeos UII conhecidos e da somatostatina-14. Os diferentes resíduos de aminoácidos sublinhados demonstram a identidade na sequência com os resíduos de aminoácidos da UII de **Gillichthys mirabilis**. A UII- β_1 de **Cyprinus carpio** tem a estrutura primária semelhante a estrutura primária da UII-B de **Catostomus commersoni** (KOBAYASHI et alii, 1986).

Segundo LEDERIS (1970), a UII é um dodecapeptídio parcialmente homólogo à somatostatina-14 (fig. 4), diferindo desta na localização e significado dos resíduos de cisteína (PEARSON *et alii*, 1980).

LEDERIS e colaboradores observaram que a atividade espasmogênica causada pela UII, é sucedida por uma ação vasoconstritora geral, em *Salmo gairdnerii* (LEDERIS, 1970) e em *Gillichthys* (ZELNICK & LEDERIS, 1973).

FRYER *et alii* (1979) demonstraram que a somatostatina é potente inibidor da secreção espontânea do hormônio de crescimento da tilápia (*Sarotherodon mossambicus*) (PEARSON *et alii*, 1980).

A UII apresenta evidentes efeitos biológicos nos peixes teleosteos, entre eles o vasoconstritor e o diurético secundário, segundo PEARSON *et alii* (1980), ICHIKAWA *et alii* (1984), LEDERIS (1984), BERN *et alii* (1985), McMASTER *et alii* (1986), YULIS & LEDERIS (1988a).

PEARSON *et alii* (1980) encontraram duas UII diferentes em *Catostomus commersoni*, UII A e UII B (fig. 4). O mesmo foi observado por McMASTER & LEDERIS (1983).

LEDERIS (1984) sugere que a UII, aparentemente, não possui ação hipofisiotrófica nos mamíferos.

Em experimentos realizados com *Cyprinus carpio*, ICHIKAWA *et alii* (1984) isolaram quatro tipos de UII (UII α , UII β_1 , UII β_2 , UII γ) (fig. 4). Desses peptídios, apenas a UII β_1 era idêntica à UIIB encontrada no *Catostomus commersoni* (fig. 4).

Foi demonstrado por BERN et alii (1985) que a UII e a somatostatina-14 têm efeitos lipolíticos no fígado de *Salmo gairdneri*, resultado do aumento da atividade da lipase, triglicerol e do aumento da liberação ácida não esterificada da gordura.

Dados recentes formulam a hipótese de uma provável intervenção das urotensinas nos mecanismos de trocas osmóticas e iônicas. BERN et alii (1985) notaram que, em virtude da atividade vasoconstritora, a UII regula o fluxo sanguíneo para diferentes superfícies osmorreguladoras, influenciando o índice pelo qual os íons e a água podem ser absorvidos ou excretados. Os autores demonstram, como consequência da vasoconstrição, que os peixes injetados com UII apresentam um índice de filtração glomerular maior.

Na mesma pesquisa, os autores comentam a existência de células neurosecretoras de UII em ganóides e elasmobrânquios.

Todos os tipos do peptídeo UII até então estudados, consistem de 12 resíduos de aminiácidos, homólogos entre as posições 6-11 (fig. 4) (KOBAYASHI et alii, 1986a).

GRAU & HELMS (1989) realizaram estudos na tilápia (*Sarotherodon mossambicus*) e sugeriram que os efeitos da somatostatina na liberação da prolactina devem ser mediados através de ações dos sistemas mensageiros de Ca^{2+} e adenosina monofosfato cíclico (AMPC).

BALDISSEROTTO et alii (1990), através da aplicação de extrato urofisiário e de UII em órgãos isolados de traíra (*Hoplias malabaricus*), observaram que esta espécie apresenta

fluxo de água mucoso-serosa nos intestinos médio e posterior e não tem fluxo significativo na vesícula biliar. Os autores notaram que o extrato urofisário não altera significativamente o fluxo da água nas porções estudadas; e que a UII aumenta o fluxo da água no intestino médio e na vesícula biliar, mas não o modifica no intestino posterior.

2.3 LOCALIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DOS PEPTÍDIOS UI E UII

2.3.1 LOCALIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA UROTENSINA I

BERN & LEDERIS (1969), estudando a localização da maioria das células imunorreativas à UI na medula espinhal em *Catostomus commersoni* e *Cyprinus carpio*, demonstraram que elas formam duas fileiras parassagitais, que se estendem até a região dorsal da urófise. Essa localização foi confirmada em diversas espécies de teleósteos por vários pesquisadores: BERN & LEDERIS (1978), FISHER *et alii* (1984), LARSON *et alii* (1984, 1986), ONSTOTT & ELDE (1984, 1986b), BERN *et alii* (1985), LEDERIS *et alii* (1985a, 1987), YAMADA *et alii* (1985), KOBAYASHI *et alii* (1986a, 1986b), YULIS & LEDERIS (1986a, 1986b), YULIS *et alii* (1986), LEDERIS & YULIS (1987), ICHIKAWA *et alii* (1988), ARNT *et alii* (1990).

RENTA *et alii* (1982) localizaram, através de estudos imunocitoquímicos, a sauvagina, peptídeo que provavelmente, reage com a UI no sistema neurosecretor caudal de algumas es-

pécies de peixes ósseos. Baseados nesses resultados, BERN *et alii* (1985) e MINNITI *et alii* (1989) mostraram que a sauvagina e a UI têm estrutura e localização similares.

A demonstração da distribuição dos neurônios secretores de UI no sistema neurosecretor caudal de *Catostomus commersoni* foi realizada por FISHER *et alii* (1984), através de técnicas imunocitoquímicas. Estes pesquisadores confirmaram, assim, a presença de células neurosecretoras na região caudal da medula espinhal, descritas por DAHLGREN (1914) e SPEIDEL (1919).

No telencéfalo de peixes teleósteos estudados por LEDERIS *et alii* (1985b), fibras imunorreativas a UI foram encontradas em cortes histológicos imunocorados, obtidos próximo ao **nucleus post commissuralis**. Nestes mesmos cortes foram observados alguns pericários parvocelulares imunorreativos à UI. Nos **nuclei telencephalic ventralis**, as fibras imunorreativas formam um cordão difuso (LEDERIS *et alii*, 1985a; KOBAYASHI *et alii*, 1986c; YULIS *et alii*, 1986; SAWCHENKO, 1987; McMASTER & LEDERIS, 1988; COHEN & KRIEBEL, 1989).

Algumas fibras nervosas imunorreativas a UI foram localizadas logo abaixo do cerebelo, por BERN *et alii* (1985) e LEDERIS *et alii* (1985b). Outro grupo de fibras mesencefálicas situa-se próximo ao **nucleus interpendicularis**, segundo BERN *et alii* (1985), LEDERIS *et alii* (1985b), SUESS *et alii* (1986), COHEN & KRIEBEL (1989).

No diencéfalo, LEDERIS *et alii* (1985b) e YULIS *et alii* (1986) observaram fibras finas e lisas na região ventral,

próximo ao **epithalamus**. Na região dorsal do **thalamus**, outras fibras nervosas foram encontradas principalmente na área **pre-talis**. Esses mesmos pesquisadores descreveram numerosas fibras imunorreativas à UI no **hypothalamus**. Nas regiões caudal e ventral deste, visualizaram alguns pericários imunorreativos à UI, entre os neurônios parvocelulares do **nucleus lateralis tuberis**.

FRYER *et alii* (1985a), FRYER & LEDERIS (1985, 1988), SUESS *et alii* (1986) e McMASTER & LEDERIS (1988) observaram na hipófise de **Carassius auratus** imunorreatividade à UI, restrita às fibras presentes na **proximal pars distalis**, próximo às células adeno-hipofisárias.

KRIEBEL *et alii* (1985) observaram a presença de pelo menos dois tipos de células neurosecretoras no sistema neurosecretor caudal dos peixes ósseos, uma vez que encontraram diferentes reações de coloração, tamanho e densidade dos grânulos elementares dos axônios terminais, e diferentes respostas eletrofisiológicas para as trocas osmóticas.

KOBAYASHI *et alii* (1986c) detectaram UI imunorreativa (UI-ir) em células do cérebro, medula espinhal e urófise do **Cyprinus carpio** e do **Catostomus commersoni**, porém não foram confirmadas imunorreações à UI em cortes histológicos do trato gastrointestinal e de órgãos endócrinos, realizados pelos mesmos autores.

LARSON *et alii* (1986), utilizando técnicas de imuno-fluorescência, empregaram como anti-soro o HLC de ovino, para reagir com a UI no teleósteo **Gillichthys mirabilis**. Na análise dos resultados, as células neurosecretoras caudais

mostravam imunofluorescência, exceto a maioria das parvocélulas. Estas células Dahlgren não reativas podem corresponder à subpopulação descrita por OWADA *et alii* (1985a), que aparentemente secretam UII.

SAKANAKA *et alii* (1987b) localizaram estruturas imunorreativas ao HLC no *colliculus inferior* do rato e observaram a presença do HLC imunorreativo (HLC-ir) no cérebro do mesmo, o que sugere que o HLC, como outros neuro-hormônios e peptídios, deve atuar como neurotransmissor e/ou neuromodulador em numerosos circuitos extra-hipotalâmicos, como também participar da regulação neuroendócrina.

SAKANAKA *et alii* (1987a) identificaram a presença de UI-ir em cortes histológicos de retina de *Carassius auratus*, valendo-se de estudos imunocitoquímicos e de radioimunoensaio.

2.3.2 LOCALIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA UROTENSINA II

BERN & LEDERIS (1969) observaram que os neurônios secretores do sistema neurosecretor caudal apresentam imunorreatividade à UII. As células imunorreativas a UII são de tamanho e forma diversos. Esses estudos têm sido confirmados em vários experimentos (BERN *et alii*, 1973, 1985; VIGH *et alii*, 1977; BERN & LEDERIS, 1978; PEARSON *et alii*, 1980; LARSON *et alii*, 1984, 1986; ONSTOTT & ELDE, 1986a, 1986b; OWADA *et alii*, 1985a, 1985b; YAMADA *et alii*, 1985; KOBAYASHI *et alii*, 1986a; McMASTER *et alii*, 1986; YULIS & LEDERIS, 1986b, 1988a, 1988b; LEDERIS & YULIS, 1987).

Outra população celular imunorreativa a UII foi descrita por VIGH & VIGH-TEICHMANN (1973) e confirmada por VIGH *et alii* (1977), LEDERIS & YULIS (1987), YULIS & LEDERIS (1988b). Esses neurônios possuem dendrites que terminam no lúmen do canal central, e, por meio de uma protuberância bulbosa, contactam o líquido cerebrospinal.

BERN & LEDERIS (1978) admitem a presença de dois tipos celulares na região caudal da medula espinhal dos teleósteos: de acordo com a especificidade da imunorreação, um tipo deve produzir UI, e o outro, UII (LARSON *et alii*, 1984; BERN *et alii*, 1985; YAMADA *et alii*, 1985; KOBAYASHI *et alii*, 1986a; ONSTOTT & ELDE, 1986a; YULIS & LEDERIS, 1986b; LEDERIS & YULIS, 1987).

OWADA *et alii* (1985a), examinando uma série de cortes do tecido nervoso do sistema neurosecretor caudal de peixes teleósteos preparados com o anti-soro UII de *Gillichthys*, observaram que o *Cyprinus carpio*, entre muitas outras espécies de peixes ósseos, possui neurônios secretores imunorreativos à UII.

ICHIKAWA *et alii* (1988) sugerem que a maioria dos neurônios caudais ativos sintetizam UI, UII- α e UII- γ ; porém, em alguns neurônios, todos ou alguns hormônios são rapidamente transportados para a urófise, resultando uma imunorreatividade baixa ou não detectável no pericário.

2.4 IMUNOCITOQUÍMICA

Há mais de 50 anos, MARRACK (1934) demonstrou que um anticorpo pode ser usado como reagente histoquímico, desde que marcadores apropriados sejam ligados à molécula do anticorpo, sem prejudicar sua capacidade de reagir com o antígeno específico. Entre vários marcadores testados por MARRACK (1934), somente os fluorescentes apresentaram a sensibilidade necessária para o êxito da reação.

O primeiro anticorpo marcado com isocianeto fluorescente foi usado por COONS *et alii* (1942) para localizar o antígeno pneumocócico em tecido infectado.

Os métodos imunocitoquímicos que influenciaram de modo marcante o curso da moderna neurociência, não foram usados originariamente para resolver questões neurobiológicas. As primeiras experiências imunocitoquímicas realizadas em histopatologia visavam detectar antígenos microbianos e auto-anticorpos. Posteriormente, na endocrinologia, as reações imunocitoquímicas tiveram por escopo identificar o lugar das sínteses de diversos hormônios (COONS *et alii*, 1942). Estes pesquisadores desenvolveram uma técnica indireta para imunocitoquímica, também chamada de "sanduíche".

Mais recentemente, HSU *et alii* (1981) introduziram uma técnica imunocitoquímica para a localização de antígenos, utilizando a avidina e a biotina. A avidina é uma glicoproteína da clara do ovo, com grande afinidade pela biotina, vitamina de baixo peso molecular, encontrada na

gema do ovo. A biotina pode ser acoplada à imunoglobulina, ou a marcadores como estreptovidina marcada com peroxidase (HRP = "Horseradish peroxidase-labelled streptavidin"). Por sua vez, a avidina pode ser acoplada a marcadores como o HRP.

Diferentes processos imunocitoquímicos utilizam princípios incluindo a avidina e a biotina como substrato básico. A técnica mais comumente utilizada é o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC = "avidin-biotin-peroxidase complex").

MACMILLAN & CUELLO (1986) comentam que nos avanços tecnológicos imunocitoquímicos, a avidina foi substituída pela estreptovidina, uma proteína da parede celular de **Streptomyces avidinii**, que tem as mesmas propriedades de ligação que a avidina, com a vantagem de que a interação com a carga das moléculas é minimizada. A introdução desta melhoria tecnológica eliminou os inconvenientes comumente presentes ao se usar o ABC.

A estrutura anatômica e histológica do cérebro, bem como suas conexões, foram estudadas durante um longo período por técnicas que utilizavam a impregnação pela prata; a coloração de fibras degeneradas; o transporte retrógrado de substâncias marcadas ou reações enzimáticas (GEFFEN, 1982). As investigações realizadas por estes meios permitiam admitir que a informação entre neurônios do cérebro ocorresse mais por um processo de transmissão química do que elétrica. Os pesquisadores em neurologia admitiam, também, que algumas substâncias pudessem estar envolvidas no processo transmis-

sor. Para demonstrar alguns desses verdadeiros transmissores, aperfeiçoaram-se as técnicas de coloração, tais como a reação de Falck-Hillarp, ou técnicas enzimoquímicas para os sistemas colinérgicos, ou a coloração Gomori para os sistemas neurosecretores. A introdução das técnicas imunocitoquímicas para estudos histológicos do sistema nervoso permitiu a localização das verdadeiras substâncias transmissoras e abriu novos caminhos para a neurobiologia (GEFFEN, 1982; CUELLO et alii, 1982; MACMILLAN & CUELLO, 1986).

MACMILLAN & CUELLO (1986) explicam que a imunocitoquímica é uma técnica sensível direta ou indireta, utilizada para detectar substâncias no tecido nervoso. As técnicas diretas são menos sensíveis, uma vez que não há ampliação de sinal e o processo de conjugação pode afetar a ligação anticorpo-antígeno.

As técnicas imunocitoquímicas diretas foram substituídas pelas indiretas, já que estas têm especificidade singular (SHIOSAKA & TOHYAMA, 1986). Estes autores demonstraram que as técnicas indiretas de imunocitoquímica utilizam uma primeira camada de anti-soro específico para o peptídeo celular em estudo e uma segunda camada de anti-soro específico para a imunoglobulina. O segundo anti-soro é conjugado com uma enzima ou um marcador fluorescente, cujo efeito é ampliar o sinal do primeiro anti-soro. A terceira camada utiliza o complexo HRP e anti-soros contrários a ele. Essa técnica é chamada complexo peroxidase-antiperoxidase (PAP = "peroxidase antiperoxidase") e foi utilizada em experimentos realizados por YULIS et alii, 1986.

Outros procedimentos de identificação dos neurotransmissores em diferentes áreas do cérebro, conforme MACMILLAN & CUELLO (1986), utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência, radioimunoensaio, ensaios para radioenzima ou a combinação de uma dessas técnicas com microdissecção. Alguns desses procedimentos são utilizados para quantificar as substâncias químicas em uma amostra. No entanto, nenhuma dessas técnicas analíticas permitem a localização das substâncias neurotransmissoras em uma subpopulação de neurônios. Métodos imunocitoquímicos têm sido utilizados com sucesso para este fim. Desta forma, a localização de substâncias transmissoras no tecido nervoso, é efetivada por reações imunocitoquímicas contra anticorpos específicos.

2.4.1 TESTE DE CO-LOCALIZAÇÃO

Nos estudos imunocitoquímicos necessita-se, às vezes, demonstrar mais de um antígeno na mesma célula. A pesquisa de dois antígenos em uma mesma célula, explica VANDESANDE (1982), pode ser realizada pela coloração imunocitoquímica de cortes semifinos, dispostos de modo seqüencial e seriado, adjacente (MACMILLAN & CUELLO, 1986; SHIOSAKA & TOHYAMA, 1986). Usando cortes semifinos é possível identificar uma mesma célula em várias secções seriadas adjacentes, conforme foi demonstrado em pesquisas de LARSON et alii (1986), ONSTOTT & ELDE (1986a), YULIS & LEDERIS (1987), ICHIKAWA et alii (1988).

Para demonstrar dois ou mais antígenos diferentes em um mesmo corte de tecido, podem ser utilizados outros métodos, descritos por VANDESANDE (1982) e SHIOSAKA & TOHYAMA (1986).

2.4.2 TESTE DE ESPECIFICIDADE

A introdução das reações imunocitoquímicas permitiu caracterizar e identificar as substâncias antigênicas dos tecidos, graças à imunorreatividade aos anti-soros específicos (HSU *et alii*, 1981). POOL *et alii* (1982) explicam que uma das condições para a especificidade de uma imunorreação é a utilização de um componente imunorreativo que somente reage com o antígeno presente no tecido em investigação. Para os autores, a especificidade antigênica, característica que valorizou a técnica, é resultante da utilização de anticorpos compatíveis, responsáveis pela imunorreatividade.

MACMILLAN & CUELLO (1986) esclarecem que, quando o anti-soro é suficientemente puro e específico, somente reage com um único componente do tecido no teste de especificidade para o anti-soro. Segundo os pesquisadores, pode-se concluir então, que este anti-soro, conseqüentemente, tem uma localização monoespecífica para uma determinada substância, no tecido em estudo.

YULIS & LEDERIS (1987, 1988a), ARNT *et alii* (1990), através da aplicação de testes de especificidade em seus experimentos, concluíram que, devido às suas reações típicas,

características e específicas, os métodos imunocitoquímicos estão revolucionando a investigação biológica, em particular a neurobiologia.

2.5 MORFOMETRIA

A morfometria tem especial valor para correlacionar estrutura e função de uma célula ou de um tecido (WEIHEL & BOLENDER, 1970; RUBAL & VAL-SELLA, 1980; ZOLI *et alii*, 1986; TAM *et alii*, 1988).

Para obtenção de informações numéricas, vinculadas à estrutura anatômica, macroscópica ou microscópica, em termos quantitativos, tais como volume, área de uma superfície, número e tamanho dos componentes, um conjunto de técnicas morfométricas foi introduzido (AHERNE & DUNNILL, 1987).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 36 peixes adultos, teleósteos da espécie **Carassius auratus** (L.) (fig. 5), de ambos os sexos. Os espécimens, adquiridos comercialmente, foram conservados à temperatura de 19°C, em um tanque com capacidade de 800 l ("Living Stream" - 800 L unit, Blissfield Mfg. Co.), pertencente ao Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Ottawa, Canadá.

Os experimentos realizados no Laboratório dirigido pelo Professor Dr. James Nolan FRYER, da mesma Universidade, deram preferência ao peixe dourado, por ser de fácil obtenção e de melhor adaptação em cativeiro.

Os peixes, separados por uma parede de tela fina em três grupos de doze espécimens, foram alimentados diariamente com ração comercial e expostos a ambientes claro e escuro em períodos intercalados de 12 em 12 horas, durante 60 dias antes do experimento. Os grupos, formados ao acaso, eram constituídos por exemplares de tamanho variável, entre 10 e 20 cm, com peso entre 73 e 122 g (tabelas I e II).

Os peixes de cada um dos grupos foram tratados diariamente com drogas, durante seis dias. Os espécimens do grupo controle (grupo "A") receberam injeções, via perito-



Figura 5. Aspectos macroscópicos de um exemplar adulto de **Carassius auratus**.

T A B E L A N° ICARACTERÍSTICAS GERAIS DO EXPERIMENTOREALIZADO COM *Carassius auratus* (L.)

Tipo de tratamento	Nº do animal	Sexo	Tamanho (cm)	Peso (g)	Total de lâminas preparadas	Total de cortes analisados
GRUPO "A" (controle)	S1	feminino	12	92	15	105
	S2	feminino	10	75	10	70
	S3	masculino	12	93	12	84
Injeções	S4	feminino	11	85	15	105
V.P. de solução salina 0,6%	S5	masculino	10	77	15	105
	S6	masculino	10	77	13	91
	S7	masculino	11	82	10	70
	S8	feminino	13	117	15	105
	S9	feminino	15	120	10	70
	S10	feminino	13	118	9	63
	S11	masculino	12	106	10	70
	S12	masculino	11	111	10	70
GRUPO "B"	M1	masculino	10	73	15	105
	M2	masculino	11	87	13	91
Injeções	M3	feminino	15	121	13	91
V.P. de metopirona	M4	feminino	14	120	15	105
	M5	feminino	10	125	15	105
	M6	masculino	15	119	16	112
	M7	feminino	17	121	10	70
	M8	feminino	15	120	15	105
	M9	masculino	11	85	12	84
	M10	masculino	12	104	12	84
	M11+	masculino	14	115	-	-
	M12++	masculino	13	107	-	-
GRUPO "C"	D1	feminino	15	122	11	77
	D2	feminino	13	110	10	70
Injeções	D3	masculino	11	86	17	119
V.P. de dexametasona	D4	masculino	10	79	15	105
	D5	feminino	14	113	13	91
	D6	masculino	12	95	10	70
	D7	feminino	15	120	11	77
	D8	feminino	15	119	10	70
	D9	masculino	11	85	15	105
	D10	masculino	11	87	15	105
	D11	masculino	12	92	12	84
	D12	feminino	14	120	11	77

+ Morreu no quinto dia do tratamento

++ Morreu no sexto dia do tratamento

V.P. - Via peritoneal

T A B E L A N º II

DADOS GERAIS DAS AMOSTRAS DE *Carassius auratus* (L.)

Tamanho, peso e sexo

Tratamento		Grupo "A"		Grupo "B"		Grupo "C"	
		solução salina 0,6%		metopirona		dexametasona	
Dados		N	%	N	%	N	%
Tamanho (cm)	10- 15	12	100,0	10	83,4	12	100,0
	16- 20	-	0,0	2	16,6	-	0,0
Peso (g)	71- 80	3	25,0	1	8,4	1	8,3
	81- 90	2	16,7	2	16,7	3	25,0
	91-100	1	8,4	-	0,0	2	16,6
	101-110	1	8,4	2	16,7	1	8,4
	111-120	5	41,7	4	33,2	4	33,4
	121-130	-	0,0	3	25,0	1	8,3
Sexo	feminino	6	50,0	5	41,6	6	50,0
	masculino	6	50,0	7	58,4	6	50,0

neal de 100 µl de solução salina 0,6%; em outro grupo (grupo "B") foram aplicadas injeções, via peritoneal, de 100 µl de solução de metopirona ("metyrapone") ("2-methyl-1, 2-di-3-pyridyl-1-propanone", Sigma Chemical Company, USA) diluída em solução salina 0,6% a 50 µg/ml; e os peixes do terceiro grupo (grupo "C") receberam, também por via peritoneal, injeções de 100 µl de uma solução contendo 500 µg de dexametasona ("9-fluoro-16-methylprenisolone", Sigma), diluídos em 1 ml de etanol e 100 µl de óleo vegetal.

3.1 TÉCNICAS HISTO-IMUNOCITOQUÍMICAS

Os peixes, depois do tratamento com drogas, foram sacrificados no sétimo dia por decapitação, e a medula espinhal foi cuidadosamente dissecada. Após a exposição da sétima ou oitava vértebra da porção distal da coluna vertebral, retiraram-se aproximadamente os 2 cm terminais da medula espinhal, incluindo a urófise, que foram distendidos em uma placa de Petri, com gotas de Bouin. A seguir, o material foi transferido para frascos com solução Bouin e fixado por 3 horas. Retirado do fixador, foi deixado por 2 horas em solução salina tamponada com fosfato 0,1M, pH 7,4, (PBS=" Phosphate buffered saline"), sendo, então, pós-fixado em Bouin sem ácido acético, durante a noite, a 4°C, seguindo metodologia usada por FRYER*.

* Metodologia demonstrada por James N. FRYER, por ocasião de meu estágio realizado na Universidade de Ottawa, Canadá, no período de maio a dezembro de 1989.

Na seqüência, prepararam-se os tecidos para inclusão em parafina, segundo CAMARGO (1979). Inicialmente o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol (50%, 70%, 95%, puro), em banhos de 45 minutos cada um, e imersos em etanol e xilol (1:1) durante 30 minutos. Em seguida, as peças foram diafanizadas em xilol puro, com dois banhos de 45 minutos cada um, e a seguir deixadas no agente intermediário (xilol) saturado com parafina, por 30 minutos, à temperatura de 57°C. Finalmente, impregnaram-se as peças com parafina fundida a 57°C, em dois banhos de uma hora cada um. Para a inclusão e emblocagem na parafina, foram utilizadas caixas de plástico, do tamanho adequado às peças e estas, orientadas para cortes sagitais.

Uma vez solidificada a parafina, os blocos, retirados dos moldes e recortados em forma de pirâmide quadrangular, foram cortados com a espessura de 5 µm, em um micrótomo modelo Minot, depois do que foram colocados em lâminas previamente revestidas com uma camada de gelatina (GONZALEZ*) para sua posterior adesão. Cada corte das fitas de parafina foi isolado com o auxílio de um bisturi e estendido com a superfície brilhante para baixo, em banho-maria, à temperatura de 50°C.

Tanto para os testes de imunorreação, como para a análise morfométrica, ou para os testes de especificidade de um peptídeo imunorreativo, com os anti-soros, foram utilizados

*Opinião expressa por Guido GONZALEZ, por ocasião de minha estada no Laboratório do Professor Dr. Karl LEDERIS, do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Universidade de Calgary, Canadá, em julho de 1989.

sete cortes seriados (fig. 6). Para a pesquisa de co-localização dos peptídeos urotensina I-imunorreativa (UI-ir) e/ou urotensina II-imunorreativa (UII-ir), os cortes foram distribuídos em quatro lâminas separadas, cada uma com dez cortes paralelos e adjacentes, em seqüência alternada, gradualmente crescente (fig. 7).

Para retirar do banho maria os cortes seriados, mergulhava-se a lâmina na água e, com o auxílio de um pincel, depositava-se sobre ela a série de cortes. Para a retirada dos cortes adjacentes do banho maria, utilizaram-se quatro lâminas, sobre as quais foi depositado cada corte, de modo alternado, com o auxílio de um pincel.

Escorrido o excesso de água, as lâminas foram levadas à estufa, à temperatura de 37°C, durante uma noite, para secagem dos cortes. Estes, uma vez desparafinizados em xilol, passaram por uma série decrescente de soluções de etanol (puro, 95%, 70%, 50%) e, a seguir, foram lavados em água destilada, por 1 minuto, e submetidos a duas trocas de 10 minutos cada uma em PBS, cujo excesso foi retirado com papel absorvente. Uma fina camada de esmalte foi passada ao redor dos cortes, a fim de evitar que os anti-soros aplicados sobre o tecido se espalhassem.

Para o estudo imunocitoquímico, utilizou-se o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC="avidin-biotin-peroxidase complex"), seguindo técnica de MACMILLAN & CUELLO (1986). Usou-se, sem prévia seleção, uma série de cortes de sete dos doze peixes de cada grupo tratado, distribuídos em 149 lâmi-

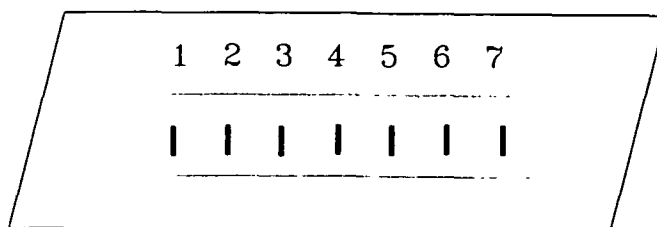
REAÇÕES IMUNOCITOQUÍMICASE TESTES DE ESPECIFICIDADE

Figura 6. Representação esquemática de 7 cortes seriados utilizados para reações imunocitoquímicas e para os testes de especificidade de um peptídeo com o anti-soro específico.

TESTES DE CO-LOCALIZAÇÃO

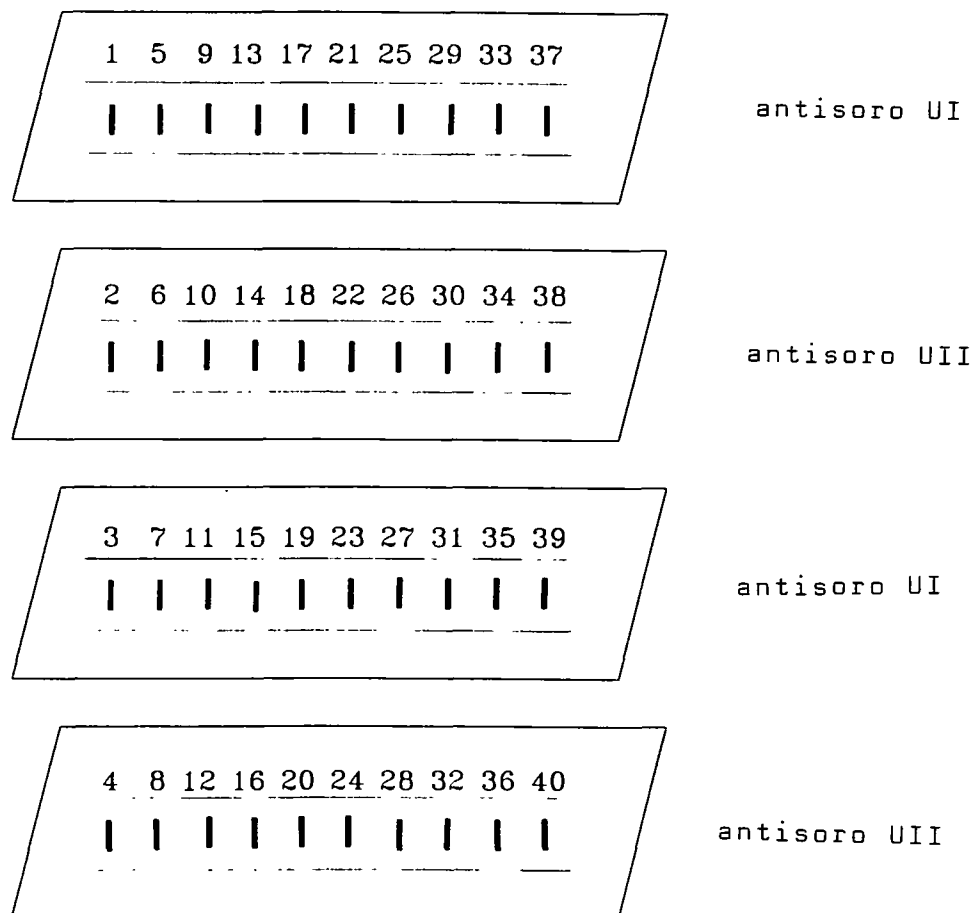


Figura 7. Representação esquemática dos 10 cortes paralelos e adjacentes numerados em sequência alternada, gradualmente crescente, utilizados para pesquisa de co-localização da UI-ir e/ou da UII-ir, em quatro lâminas separadas.

nas, cortes esses previamente incubados com anti-soro UI* de *Catostomus commersoni* (1:800) diluído em PBS contendo 0,3 % de Triton X-100 (Sigma) e 1% de albumina sérica bovina (Sigma), por um período de 18 horas, a 4°C. Outros cortes, distribuídos em 147 lâminas, foram pré-incubados no anti-soro UII* de *Gillichthys mirabilis* (1:400) diluído em solução PBS com 0,3% de Triton X-100 e 1% de albumina sérica bovina, durante 18 horas, a 4°C. A fim de evitar o ressecamento dos cortes, depositaram-se as lâminas assim preparadas em câmara úmida, guardadas em um compartimento com temperatura de 4°C.

Na etapa seguinte, os cortes foram lavados em PBS por 30 minutos (com troca de solução a cada 10 minutos), à temperatura ambiente, e incubados com anti-corpo biotinilado de burro, anticoelho ("biotinylated donkey, anti-rabbit", Amersham Canada Limited, Canadá) por 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida. Este anti-corpo foi diluído (1:100) em PBS contendo 0,3% de Triton x-100 e 1% de albumina sérica bovina. Na seqüência, lavaram-se os cortes durante 15 minutos em PBS (com troca de solução a cada 5 minutos), incubando-os posteriormente com estreptovidina marcada com peroxidase ("horseradish peroxidase-labelled streptavidin", Amersham), diluída em PBS (1:100), por uma hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida o material foi lavado em tampão Tris 50 mM, pH 7,4 ("Tris (hydroxymethyl)-aminomethane", Sigma), durante 15 minutos, com troca de solução a cada 5 minutos. Para ampliar a imunorreação, à última troca da solução de

*Os anti-soros UI e UII foram gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Karl LEDERIS, do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Universidade de Calgary, Canadá, e eram estocados a 80°C negativos.

Tris adicionaram-se 0,2% de diaminobenzidina (Sigma) e 0,00045% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , Sigma), onde as lâminas permaneceram por 3 minutos. A seguir, os cortes foram lavados, rapidamente, com tampão Tris e passados por soluções decrescentes do mesmo tampão, diluído com água destilada (75%, 50%, 25%), desidratados, passando por banhos de soluções crescentes de etanol (50%, 70%, 95%, puro) e diafanizados em xilol puro. As lâminas foram montadas com Permount (Fisher Scientific Company, USA) e observadas ao microscópio óptico Zeiss (Ernest Leitz, Wetzlar, West Germany).

3.1.1 TESTE DE CO-LOCALIZAÇÃO

A fim de examinar a possibilidade da presença da UI-ir ou da UII-ir, ou de ambos os peptídios em um mesmo corte da medula espinhal caudal ou em um mesmo neurônio, foram realizados testes de co-localização, baseados nas investigações de YULIS & LEDERIS (1987).

Os cortes histológicos de um mesmo exemplar foram preparados pelas técnicas imunocitoquímicas já descritas, ordenados de modo adjacente, em quatro lâminas dispostas paralelamente (fig. 7). A imunorreatividade a UI, a UII ou a ambas foi testada, colocando-se os anti-soros específicos, intercalando uma lâmina com o anti-soro UI e outra com o anti-soro UII, conforme MACMILLAN & CUELLO (1986).

3.1.2 TESTE DE ESPECIFICIDADE

A especificidade de um processo de imunorreacção pode ser comprovada por uma reacção antígeno (peptídeo celular - anticorpo (anti-soro reagente). A especificidade da reacção para UI-ir e UII-ir foi avaliada, provocando-se uma reacção **in vitro**. Os peptídeos antigénicos dos neurónios foram testados, utilizando-se o anti-soro UI ou UII sobre o preparado celular.

Preparou-se, em um microtubo, uma solução com o peptídeo UI diluído no anti-soro específico UI (1:800), na proporção de 10 µg/ml, que após agitação foi estocada por uma noite, a 4°C. A seguir, esta solução, onde ocorreu uma reacção antigénica, foi colocada sobre os cortes histológicos preparados.

Outro teste para a confirmação da especificidade das imunorreacções da UI foi realizado, **in vitro**, provocando-se uma reacção antigénica entre o hormónio liberador de corticotropina (HLC) e o anti-soro UI. Para isso, o HLC foi diluído na proporção de 10 µg/ml do anti-soro UI (1:800). Esta diluição foi incubada por uma noite, à temperatura de 4°C.

Utilizando técnica semelhante à acima descrita, procurou-se confirmar a presença de peptídeo UII-ir do neurónio, realizando uma reacção antigénica, **in vitro**, entre UII (peptídeo), 10 µg/ml, e o anti-soro UII (1:400), incubados por uma noite, a 4°C.

Um teste para a confirmação, **in vitro**, da especificidade das imunorreacções da UII, foi realizado provocando-se uma

reação antigênica entre a somatostatina e o anti-soro UII. Usou-se nessa reação a somatostatina diluída na proporção de 10 µg/ml, no anti-soro UII (1:400). A diluição foi incubada em temperatura de 4°C, por uma noite.

Os diferentes líquidos dos microtubos preparados, anteriormente descritos, onde se processaram as reações antigênicas, foram gotejados sobre os cortes histológicos da medula espinhal, iniciando-se nos tecidos o processo imunocitoquímico. Nas lâminas, depois de montadas em Permount para pesquisa, observou-se a ocorrência das imunorreações específicas.

3.2 MORFOMETRIA

A atividade secretora dos pericários e núcleos dos neurônios imunorreativos à UI e à UII da porção caudal da medula espinhal, das amostras de *Carassius auratus*, incluídas em cada grupo tratado, foi avaliada pela morfometria, de acordo com AHERNE & DUNNIL (1982) e ZOLI et alii (1986).

O contorno individual de 20 a 25 células, tomadas ao azar, e seus respectivos núcleos, foi traçado com o auxílio de uma câmara clara Zeiss, acoplada a um microscópio óptico composto Zeiss (Ernest Leitz, Wetzlar, West Germany) (fig. 8), com aumento de 1.250 vezes.

As áreas dos pericários e seus respectivos núcleos, nos cortes histológicos imunorreativos, foram determinadas

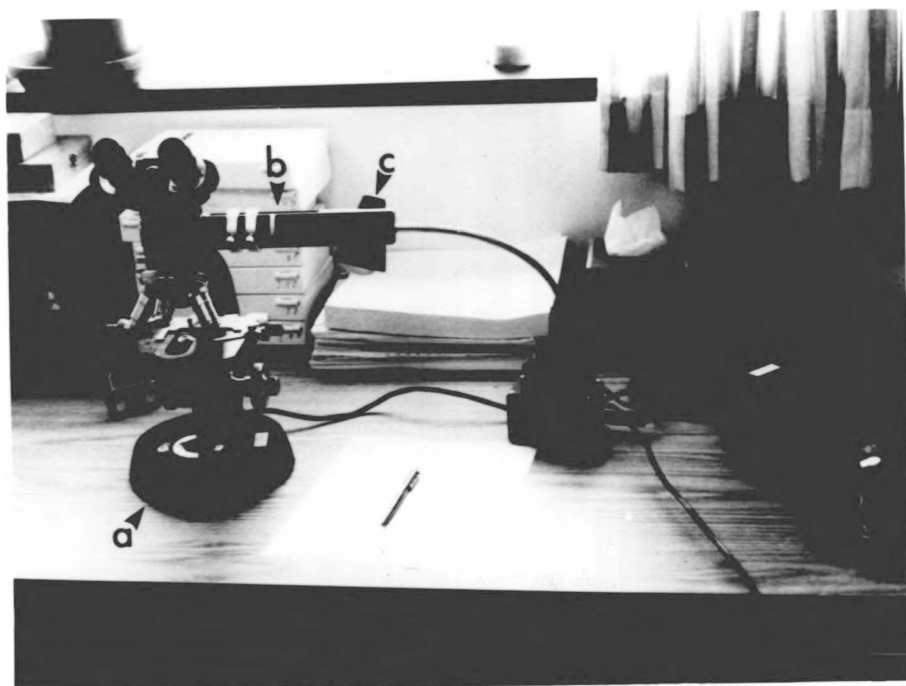


Figura 8. Microscópio composto Zeiss (a) com uma câmara clara (b) acoplada. O conjunto de lentes da câmara clara e a iluminação especial (c), permitem projetar sobre uma folha de papel branco os contornos celulares e nucleares.

pela planimetria, utilizando um analisador de imagens IBAS ("IBAS Image Analyser") e uma mesa magnética digital, adaptada a um computador programado para analisar imagens ("IBAS Videoplan Measuring Programme")* (fig. 9). O programa do computador fez a medição simultânea das áreas dos pericários e seus núcleos, através do traçado de seu perímetro.

A metodologia estatística para a avaliação dos resultados obtidos pelas medições morfométricas das superfícies celulares e nucleares, das células neurosecretoras imunorreativas, em estudo, dos diferentes grupos de peixes, incluiu o cálculo da média e do desvio padrão de cada uma das variáveis estudadas nos respectivos grupos.

A significância estatística da diferença entre as médias das medições realizadas e das variações das concentrações do cortisol no plasma sanguíneo, em amostras independentes, foi avaliada através do teste t de "Student", conforme programa do computador ("IBAS Videoplan Statistics Programme"), tendo sido adotado o nível de significância de 5%.

Sempre que a estatística calculada era maior que o valor crítico, fez-se um destaque no gráfico, com um asterisco.

As representações gráficas dos resultados estatísticos foram preparadas com o auxílio de um computador "Macintosh Personal".

*Cedido pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Ottawa.



Figura 9. Aspectos do conjunto eletrônico utilizado para medição dos neurônios imunorreativos e análise dos resultados.
a) Analisador de imagens IBAS ("IBAS Image Analyser");
b) Mesa magnética digital adaptada a um computador programado para analisar imagens ("IBAS Videoplan Measuring Programme").

3.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO CORTISOL PLASMÁTICO POR RADIOIMUNOENSAIO

O nível do cortisol plasmático foi determinado por radioimunoensaio, por Bärbel TRAYNOR.*

Utilizando um conjunto ("kit") de radioimunoensaio para cortisol (ICN Biomedicals, Inc., distribuído por Bio-Ria, Montreal, Canadá), determinou-se o cortisol do plasma sanguíneo.

Foram coletados 70 μl de sangue de cada um dos 36 peixes estudados, com auxílio de uma cânula no momento do sacrifício do animal. O sangue foi levado imediatamente a um tubo da microcentrífuga (modelo Eppendorf). Após centrifugação de 30 segundos, coletaram-se 50 μl do plasma (sobrenadante), que foram divididos em alíquotas de 10 μl , distribuídas em 5 tubos de ensaio (12x75 mm) e armazenados à temperatura de 30°C negativos. Às amostras de 10 μl de plasma foi adicionado cortisol marcado com iodo radioativo (^{125}I), e todos os tubos agitados vigorosamente. Depois de incubados por 45 minutos à temperatura de 37°C $\pm$ 1°C, decantou-se o conteúdo dos tubos. Com o auxílio de um contador calibrado para ^{125}I , fez-se a avaliação do cortisol plasmático.

* Bärbel TRAYNOR, técnica do Laboratório do Professor Dr. James N. FRYER, do Departamento de Anatomia da Universidade de Ottawa.

4 RESULTADOS

O *Carassius auratus* (L.), Cyprinidae, Cypriniformes (peixe dourado, "goldfish", "kinguio"), peixe selvagem dos rios do Sul da China, começou a ser domesticado em lagos, por volta do século IX. O peixe dourado tem sua origem em uma espécie de carpa selvagem, razão de sua primitiva denominação de *Cyprinus auratus* (HUNNAM et alii, 1981; TOSELLI, 1988). A presença de dois pares de barbilhos e o maior tamanho da carpa fazem a distinção entre as duas espécies.

Com a denominação de peixe japonês, foi introduzido no Japão por volta de 1500 (BURTON & BURTON, 1984).

Mais de cem variedades de cores e formas diferentes já foram identificadas. Seu aspecto externo é muito variável. Nos primeiros meses de vida apresenta coloração bronze-escuro e, ao atingir a fase adulta, aos doze meses de idade, adquire a cor definitiva. Pode apresentar escamas de diferentes tonalidades: do amarelo-latão ao vermelho-vivo. Por vezes, estão presentes escamas transparentes, marcadas por manchas pretas ou prateadas (BURTON & BURTON, 1984; WHEELER, 1985).

Seu tamanho, na idade adulta, pode variar entre 7 e 25 centímetros de comprimento. A diferenciação sexual externa

só é possível na época da reprodução (primavera e início do verão).

4.1 ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA NEUROSSECRETOR CAUDAL DO *Carassius auratus* (L.)

Nos 36 exemplares de *Carassius auratus* selecionados para o experimento, observou-se que, macroscopicamente, a medula espinhal tem aspecto branco-leitoso e afina na porção distal, alargando em seguida para formar uma pequena dilatação terminal, a urófise. Extensa rede vascular irriga esse conjunto. A urófise está alojada na fossa urofisária.

Em cortes histológicos sagitais, foi observado, pela microscopia óptica, que a porção afilada anteriormente descrita constitui uma espécie de ponte entre a urófise e a porção proximal da medula. Em alguns cortes, o canal central do órgão pode ser observado.

As reações imunocitoquímicas, obtidas pela técnica com pelxo avidina-biotina-peroxidase (ABC), permitiram que, ao microscópio óptico, fossem observadas células neurosecretoras de diferentes tamanhos, dispostas ao longo da medula espinhal até a urófise. O sistema neurosecretor caudal dos peixes tratados com solução salina 0,6%, com metopirona ou com dexametasona mostrou, em vários cortes histológicos, células Dahlgren de contorno irregular, com dendrites sem orientação definida e outras, também de contorno irregular, porém possuidoras de ramificações que se dirigem à luz do referido canal.

Foi possível também identificar, além da região ricamente vascularizada junto à urófise, a presença de capilares nas regiões mais densamente povoadas com neurônios secretores.

Os mesmos peixes foram utilizados para investigar a presença de células neurosecretoras de urotensina I (UI) e de urotensina II (UII). Os neurônios secretores de UI e UII, após reagirem com os anti-soros específicos UI de *Catostomus commersoni* ou UII de *Gillichthys mirabilis* respectivamente, apresentaram coloração marrom-intensa sobre fundo bege.

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS À UROTENSINA I

4.2.1 PEIXES TRATADOS COM SOLUÇÃO SALINA 0,6% (GRUPO "A", CONTROLE)

As reações imunocitoquímicas, para verificação dos neurônios imunorreativos à urotensina I (UI), da região caudal da medula espinhal dos *C. auratus* tratados com injeções peritoneais de solução salina 0,6% durante 6 dias, permitiram a demonstração de células neurosecretoras de UI, dispostas ao longo da medula espinhal, até a urófise (fig.10). Nesta, as células e fibras neurosecretoras apresentaram intensa imunorreação ao anti-soro específico UI (fig.11).

De acordo com o tamanho e a forma, dois grupos celulares se destacaram (fig.12): células neurosecretoras pequenas,

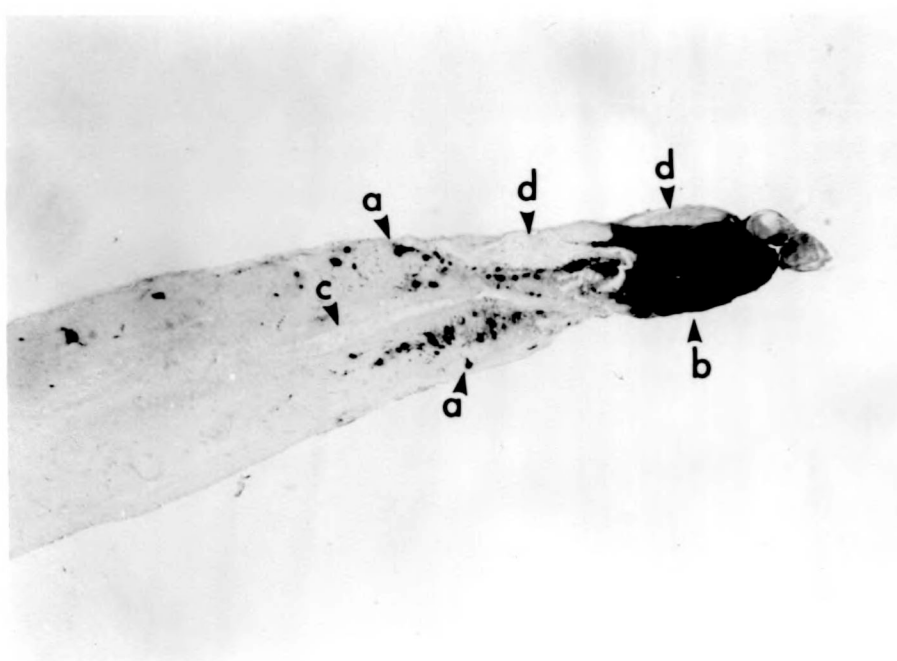


Figura 10. Corte histológico sagital do sistema neurosecretor caudal de **C. auratus** do grupo "A".

Teste imunocitoquímico para UI.

(a) Neurônios secretores imunorreativos à UI, dispostos ao longo da medula espinhal, formando dois grupos parasagittais, que se estendem até a urófise; (b) urófise com forte imunorreatividade à UI; (c) canal central; (d) vascularização intensa da porção terminal da medula espinhal e parte dorsal da urófise.

Aumento: 40X.

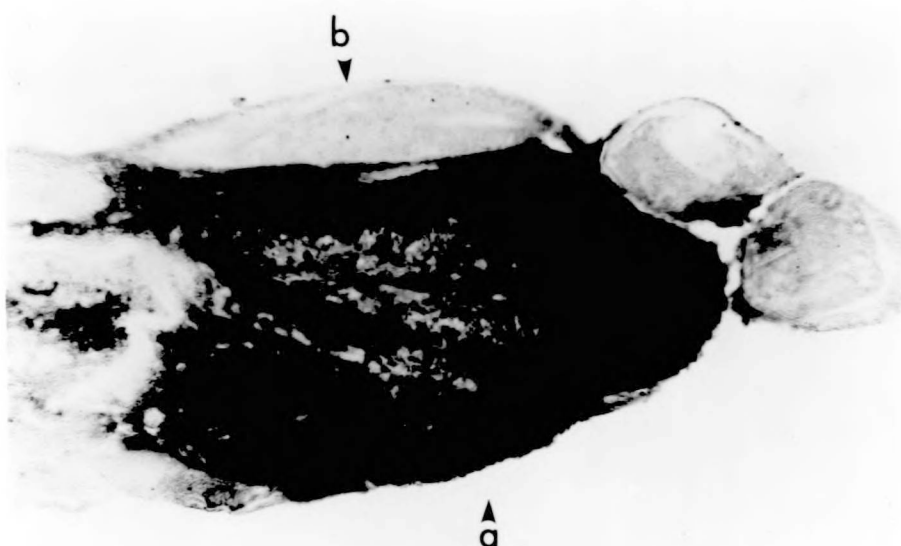


Figura 11. Corte histológico sagital da urófise de *C. auratus* do grupo "A".

Teste imunocitoquímico para UI.

(a) Urofise com intensa imunorreatividade à UI; (b) região dorsal da urófise com grande quantidade de tecido vascular.

Aumento: 160X.

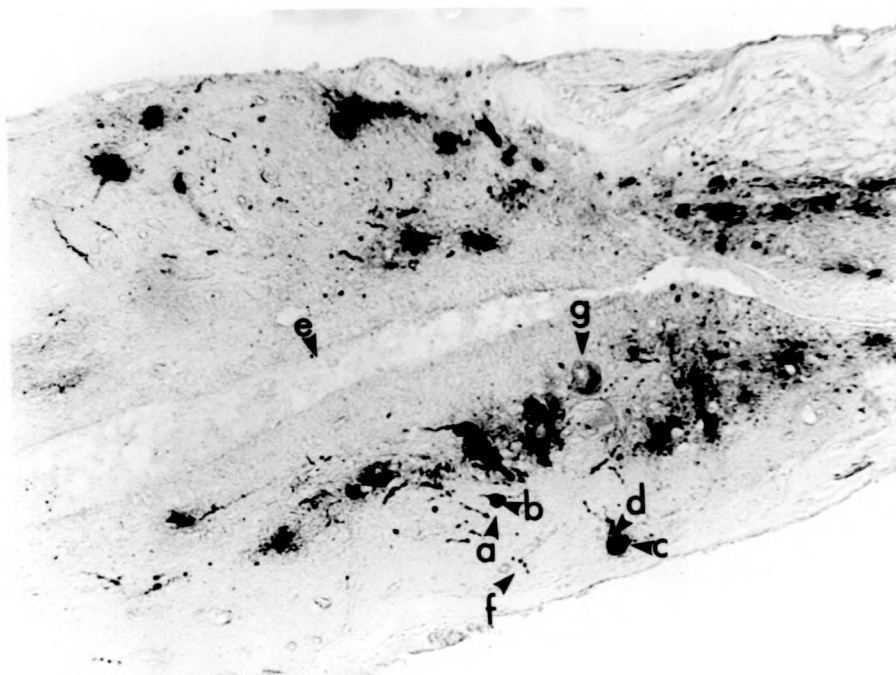


Figura 12. Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de *C. auratus* do grupo "A", incluindo parte do sistema neurosecretor caudal.

Teste imunocitoquímico para UI.

(a) Parvocélulas imunorreativas à UI de contorno irregular, com (b) núcleo também de formato irregular; (c) magnocélulas imunorreativas à UI, com (d) núcleo polimorfo; (e) canal central; (f) fibras com aspecto de rosário, imunorreativas à UI; (g) magnocélula com fraca imunorreatividade à UI.

Aumento: 160X.

parvocélulas*, distais à urófise, mostravam corpo celular e núcleo de forma irregular, com cromatina escassa, por vezes em grânulos grosseiros e aderida à membrana nuclear e um nucléolo grande e subperiférico (figs.12,13,14); Outras células, também imunorreativas à urotensina I, de maior tamanho, magnocélulas*, em geral próximas à urófise, possuíam um núcleo polimorfo, com cromatina e nucléolo apresentando o mesmo aspecto que nas parvocélulas (figs. 12, 14, 15).

Algumas fibras espalhadas ao longo da medula espinhal também apresentaram imunorreatividade à UI (fig. 14).

A análise morfométrica, tanto nos exemplares do sexo masculino, como nos do sexo feminino, confirmou a presença de um universo de células neurosecretores imunorreativos de diferentes tamanhos e formas (tabela III; figs.16,17). A distribuição das amostras celulares analisadas permitiu que os pericários fossem agrupados em duas populações: uma em que eles apresentavam áreas distribuídas entre 237 e 437 μm^2 , isto é, superfícies celulares pequenas (parvocélulas) (fig. 16); e outra população cujos pericários possuíam áreas entre 437 e 712 μm^2 (magnocélulas) (fig. 16).

As parvocélulas apresentavam núcleos com áreas entre 55 e 115 μm^2 (fig.17), enquanto os pericários magnocelulares tinham núcleos com áreas distribuídas entre 115 e 205 μm^2 (fig. 17).

* Denominação utilizada por James N. FRYER.

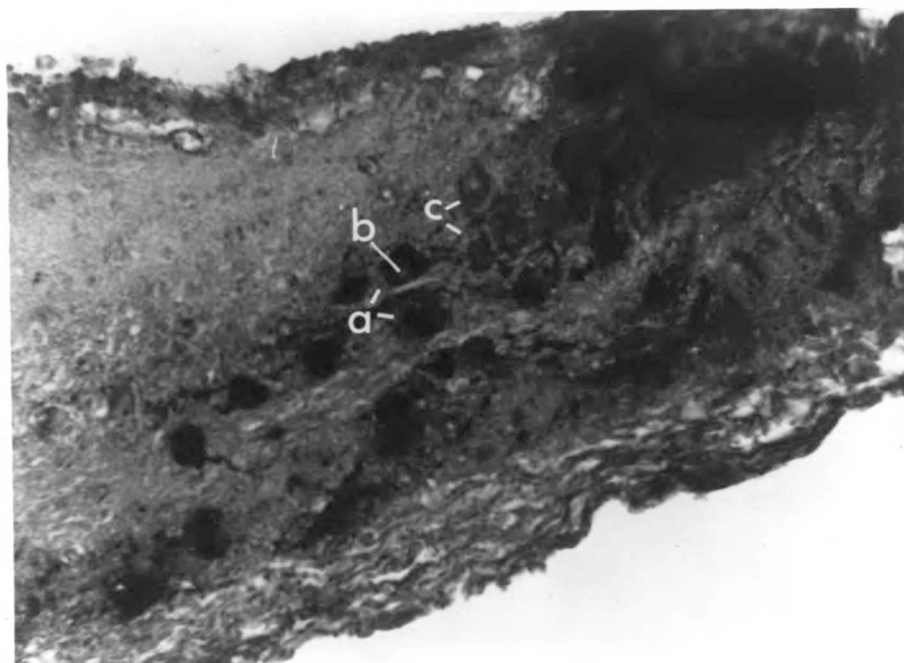


Figura 13. Corte histológico sagital de parte da medula espinhal de **C. auratus** do grupo "A".

Teste imunocitoquímico para UI.

(a) Parvocélulas imunorreativas à UI, com (b) núcleo de forma irregular; (c) neurônios sem imunorreatividade à UI.

Aumento: 160X.

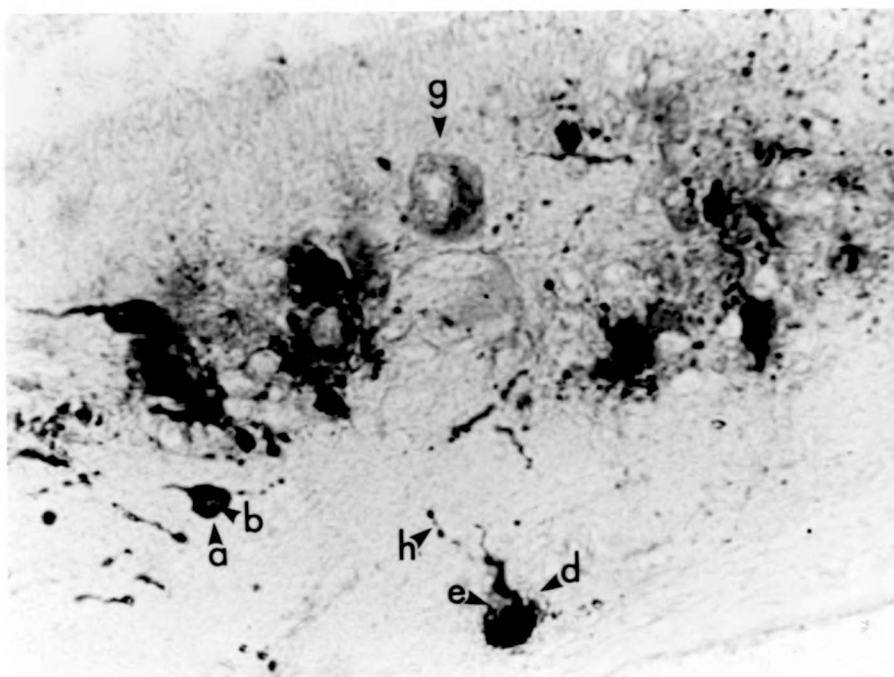


Figura 14. Detalhe de um corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de **C. auratus** do grupo "A".

Teste imunocitoquímico para UI.

(a) Parvocélulas imunorreativas à UI, com corpo celular e (b) núcleo de forma irregular, com (c) um nucléolo grande e subperiférico; (d) magnocélulas imunorreativas à UI, com (e) núcleo polimorfo e (f) um nucléolo grande e subperiférico; (g) neurônio secretor grande sem imunorreatividade à UI; (h) fibras com aspecto de rosário, imunorreativas à UI.

Aumento: 400X



Figura 15. Aspecto parcial de um corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de *C. auratus* do grupo "A".

Teste imunocitoquímico para UI.

(a) Magnocélulas imunorreativas à UI; (b) fibras com aspecto de rosário, imunorreativas à UI.

Aumento: 250X.

T A B E L A Nº III

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ÁREAS DAS CÉ-
LULAS NEUROSSECRETORAS IMUNORREATIVAS
À UROTENSINA I (PERICÁRIOS E NÚCLEOS)

Tipo de tratamento	Nº do animal no experimento	Nº de neurônios estudados	PERICÁRIOS		NÚCLEOS	
			Média (μm^2)	Desvio padrão (μm^2)	Média (μm^2)	Desvio padrão (μm^2)
Solução salina 0,6%	S1	24	398,41	67,00	100,67	18,82
	S3	25	389,71	83,67	88,44	25,24
	S4	25	382,60	81,13	96,49	24,41
	S5	20	483,05	111,29	108,58	36,60
	S6	20	457,98	195,14	104,60	30,16
	S7	20	404,32	103,00	102,62	31,34
	S8	25	440,51	91,67	116,60	21,14
Metopirona	M1	20	384,57	108,40	94,39	23,01
	M2	20	350,56	113,28	84,72	29,13
	M3	20	352,73	114,40	79,99	23,98
	M4	25	329,22	84,94	96,74	29,36
	M5	20	329,71	70,47	86,76	28,77
	M6	22	368,04	95,13	94,43	20,67
	M7	20	367,86	97,14	81,12	23,51
Dexametasona	D1	20	481,78	109,30	119,90	32,57
	D3	20	581,87	135,50	112,11	21,53
	D4	20	475,47	72,57	132,88	36,77
	D5	20	647,90	195,69	121,83	48,44
	D6	25	416,66	95,55	98,53	22,88
	D7	22	423,32	109,96	104,72	31,95
	D8	25	500,71	170,11	140,13	34,90

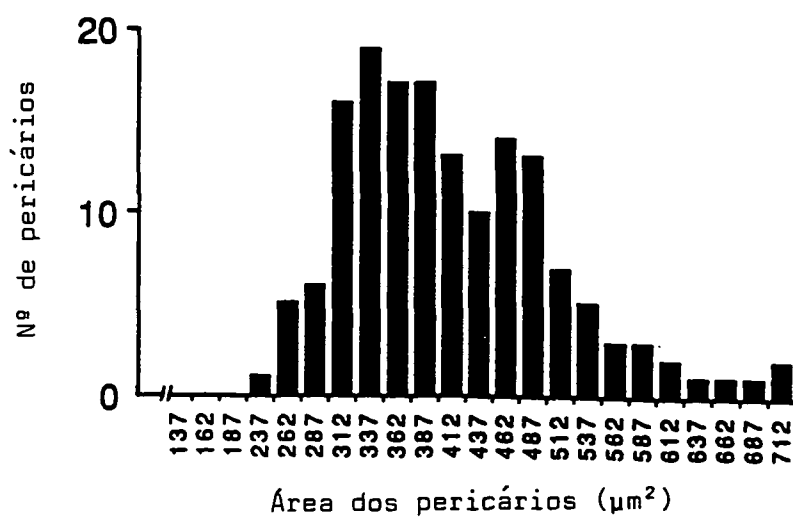


Figura 16. Áreas dos pericários secretores de UI-ir dos *C. auratus* do grupo "A"

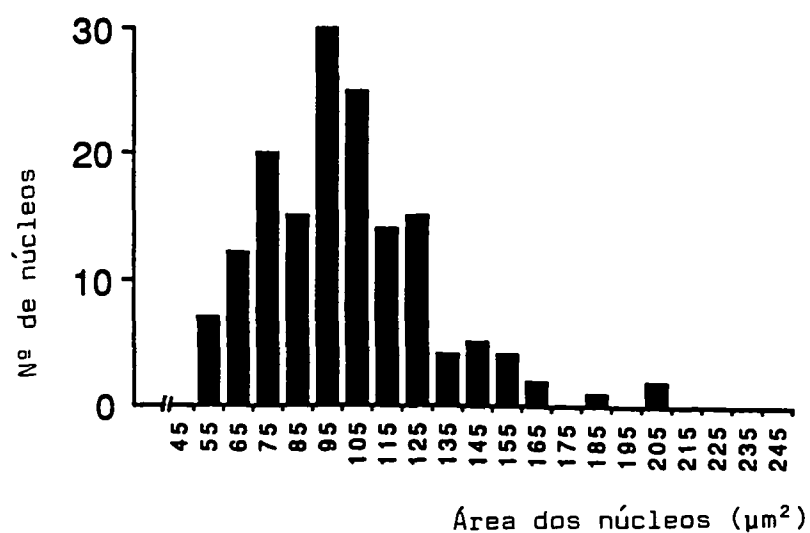


Figura 17. Áreas dos núcleos de neurônios secretores de UI-ir dos *C. auratus* do grupo "A"

4.2.2 PEIXES TRATADOS COM METOPIRONA (GRUPO "B")

A ação da metopirona sobre as células neurosecretores de *C. auratus* foi pesquisada em um grupo de peixes tratados com injeções peritoneais diárias desta droga, durante 6 dias. Os pericários imunorreativos a UI destas amostras apresentaram coloração mais intensa (marrom acentuado) e os nucléolos mais evidentes, quando comparados ao grupo controle.

As áreas medidas nos diversos pericários e em seus respectivos núcleos apresentaram variações neste grupo de peixes tratados (tabela III). A morfometria das superfícies celulares resultou em duas populações, com áreas menores que as das células dos peixes do grupo controle: células pequenas com áreas entre 162 e 412 μm^2 (fig.18), com núcleos também pequenos, cujas áreas variavam entre 45 e 95 μm^2 (fig. 19), e magnocélulas, com áreas distribuídas entre os limites de 412 e 687 μm^2 (fig. 18), as quais possuíam núcleo grande, com áreas entre 95 e 165 μm^2 (fig.19).

O estudo morfométrico das superfícies celulares e nucleares das células Dahlgren imunorreativas a UI mostrou uma diminuição destas áreas nos peixes que foram tratados com metopirona, quando comparado aos peixes do grupo testemunha (figs. 20,21)

Os pericários imunorreativos a UI dos peixes tratados com metopirona foram observados com maior frequência na região posterior da medula espinhal, mais próximos à urófise.

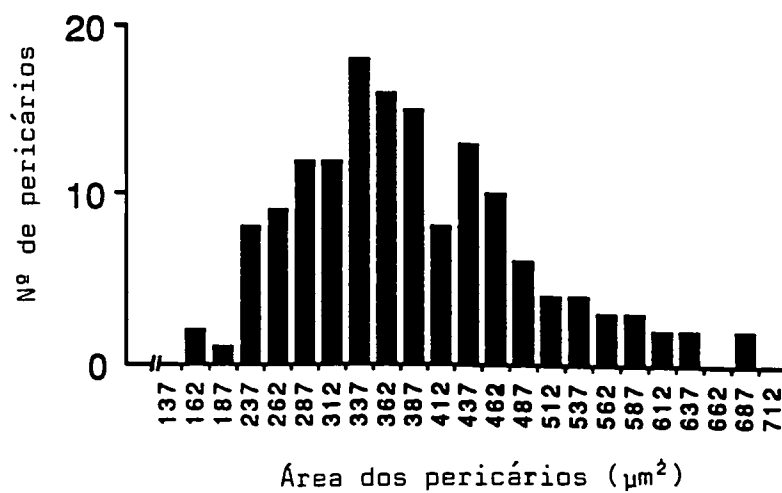


Figura 18. Áreas dos pericários secretores de UI-ir dos *C. auratus* do grupo "B"

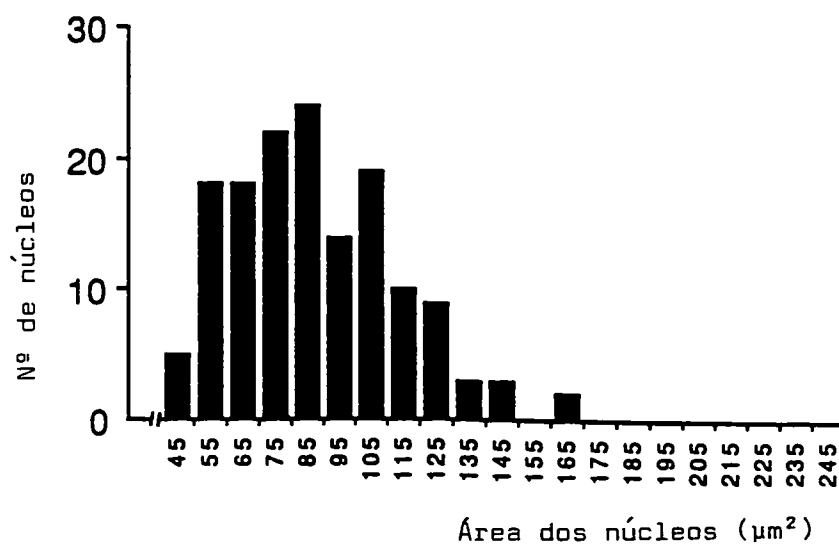


Figura 19. Áreas dos núcleos de neurônios secretores de UI-ir dos *C. auratus* do grupo "B"

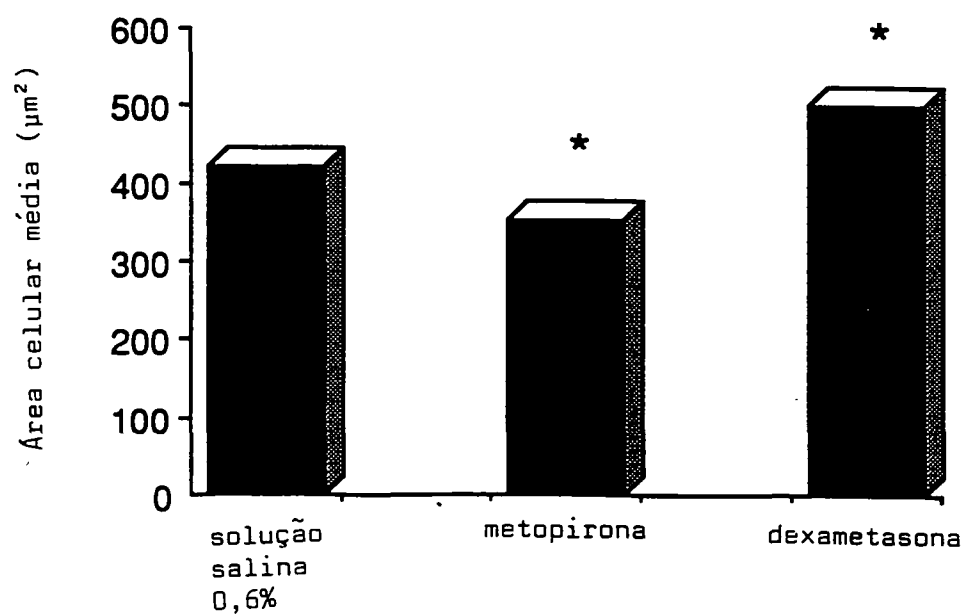


Figura 20. Média das áreas dos pericários secretores de UI-ir dos *C. auratus* tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C").

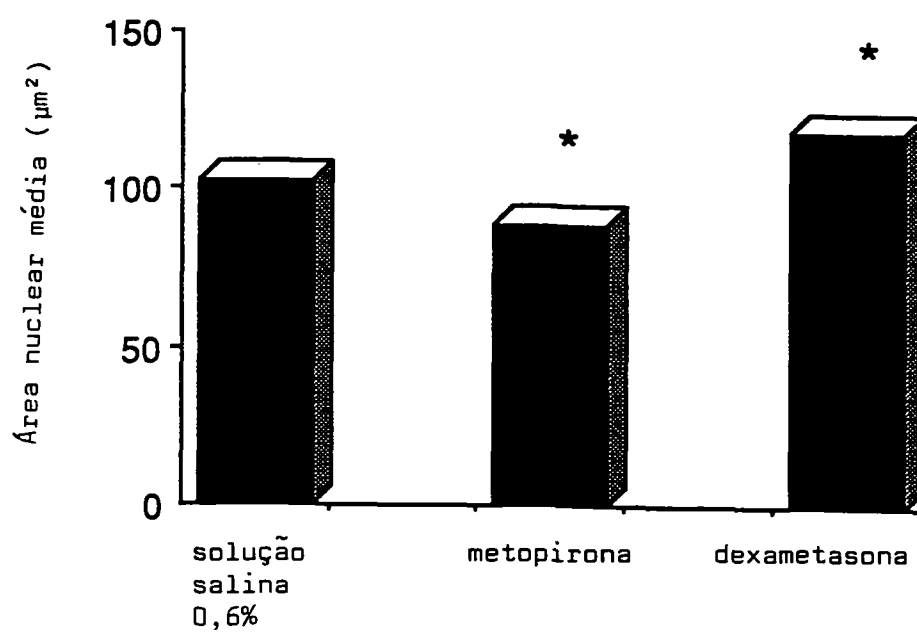


Figura 21. Média das áreas dos núcleos de neurônios secretores de UI-ir dos *C. auratus* tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirone (grupo "B"); dexametasona (grupo "C")

Pode-se afirmar que as diferenças encontradas são estatisticamente significativas a um nível de probabilidades de $p < 0,05$ (tabelas IV e V).

4.2.3 PEIXES TRATADOS COM DEXAMETASONA (GRUPO "C")

Outro grupo de peixes, tratado com injeções peritoneais de dexametasona durante 6 dias, foi posteriormente sacrificado para analisar a ação da droga sobre as superfícies das células neurosecretoras de *C. auratus*.

A população dos peixes tratados com dexametasona apresentou em suas células imunorreativas à UI uma diminuição na intensidade da imunocoloração (marrom mais claro), bem como menor frequência dos nucléolos visíveis, em relação ao grupo controle.

As injeções de dexametasona provocaram alterações de diferentes magnitudes na morfologia das células Dahlgren. Assim, através da morfometria, verificou-se que as áreas celulares (tabela III) situaram-se num intervalo de 237 e 662 μm^2 (fig.22), e as áreas dos núcleos, em valores distribuídos entre 65 e 235 μm^2 (fig.23).

No grupo "C", as células neurosecretoras imunorreativas à UI distribuíram-se de modo irregular ao longo da medula espinhal, margeando o canal central.

A análise estatística revelou um aumento significativo da área celular dos pericários (fig.20), após o tratamento hormonal, a um nível de probabilidade $p < 0,05$ (tabela VI).

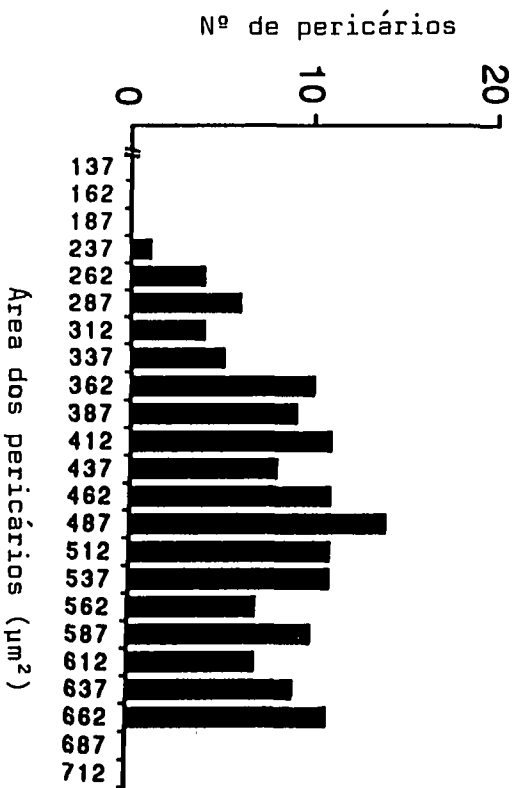


Figura 22. Área dos pericários secretores de UI-ir dos *C. auratus* do grupo "C"

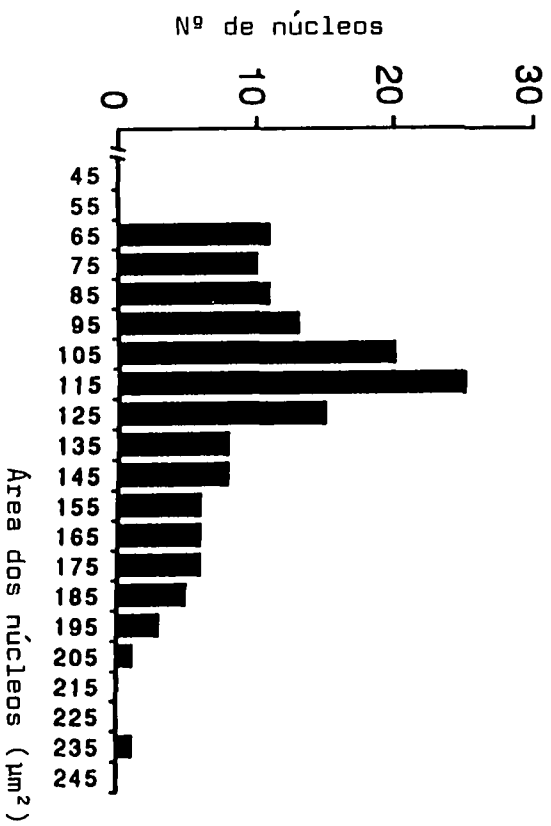


Figura 23. Áreas dos núcleos de neurônios secretores de UI-ir dos *C. auratus* do grupo "C"

T A B E L A N º V

ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS ÁREAS DOS NÚCLEOS DAS CÉLU-
LAS NEUROSECRETORAS IMUNORREATIVAS À UROTENSINA I

COMPARAÇÃO DOS GRUPOS "A" E "B"

Teste t de "Student"

Grupo	Total de núcleos medidos	Média (μm^2)	Desvio padrão (μm^2)	t	gl	p
GRUPO "A" (controle)						
7 peixes	159	102,33	27,74	4,43*	304	<0,05
GRUPO "B" (metopirona)						
7 peixes	147	88,68	26,04			

A diferença entre os grupos "A" e "B" é estatisticamente sig -
nificativa

Por sua vez, a média das áreas dos núcleos das células neurosecretoras do grupo controle mostrou-se significativamente menor (ao nível de probabilidade de $p < 0,05$) (fig. 21), do que a média das áreas dos núcleos dos neurônios que sofreram a ação da dexametasona (tabela VII). Pode-se aceitar que a dexametasona age, direta ou indiretamente, como substância biologicamente ativa, sobre os pericários e os núcleos das células Dahlgren.

Os resultados obtidos nos dois grupos de peixes injetados com metopirona ou dexametasona indicaram que a atividade secretora dos neurônios liberadores de UI é estimulada pelos hormônios adrenocorticosteróides.

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS À UROTENSINA II

As células Dahlgren do sistema neurosecretor caudal, presentes em *C. auratus*, também secretam UII. A presença desse peptídeo foi detectada por uma imunorreatividade granular observada no interior do citoplasma dos neurônios dos exemplares que integravam o grupo controle. O anti-soro específico para UII, utilizado em reações imunocitoquímicas, revelou em cortes histológicos três tipos de células Dahlgren com tamanho e forma diversos (figs. 24,25). Células neurosecretoras de forma arredondada, de tamanho pequeno, possuindo um citoplasma reduzido e um núcleo circular, volumoso,

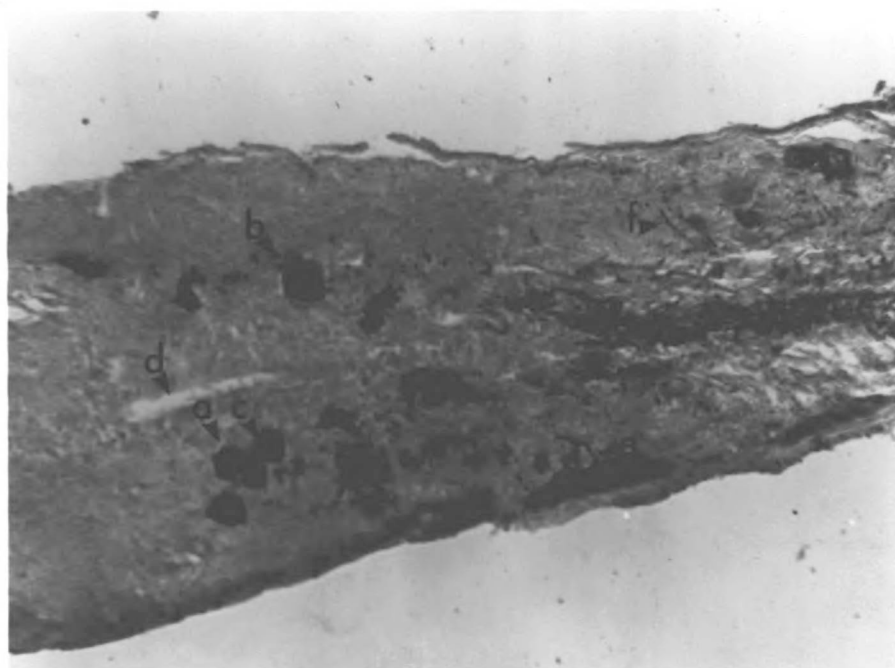


Figura 24. Corte histológico sagital próximo da linha mediana da porção caudal da medula espinhal de *C. auratus* do grupo "A".

Teste imunocitoquímico para UII.

(a) Células Dahlgren imunorreativas à UII, de tamanho médio e formato irregular; (b) neurônios secretores imunorreativos à UII, de tamanho grande, ovóides, com citoplasma abundante, (c) núcleo esférico; (d) vista parcial do canal central; (e) fibras imunorreativas à UII lisas e (f) em forma de rosário.

Aumento: 160X.

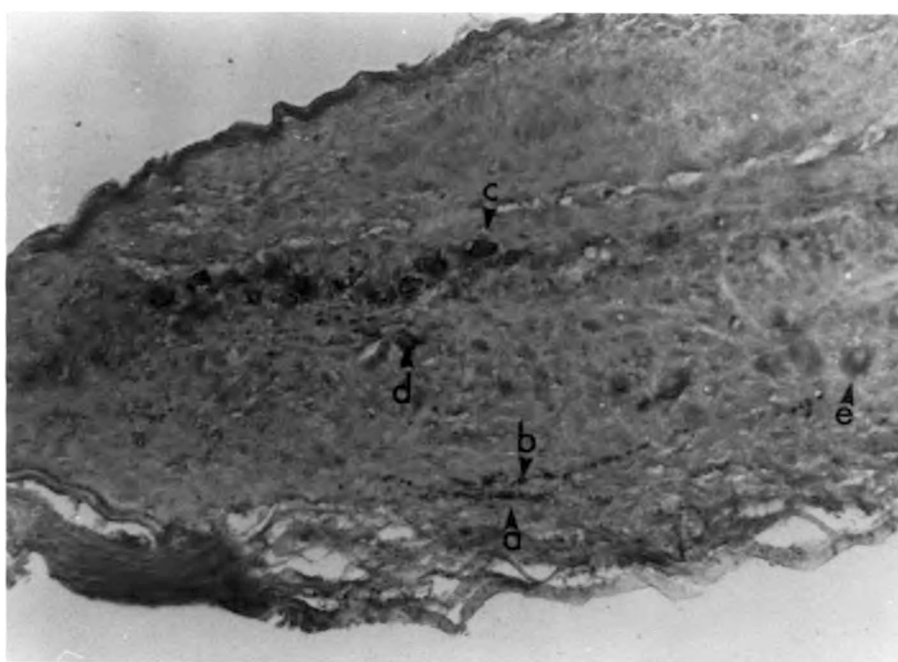


Figura 25. Corte histológico sagital da medula espinhal de **C. auratus** do grupo "A", mostrando diferentes populações celulares.

Teste imunocitoquímico para UII.

(a) Células neurosecretoras imunorreativas à UII pequenas, de forma arredondada, citoplasma reduzido e (b) um núcleo circular volumoso; (c) neurônios secretores imunorreativos à UII de tamanho médio, com citoplasma reduzido, contendo (d) um núcleo esférico muito grande; (e) neurônios com fraca imunorreatividade à UII.

Aumento: 160X.

com escassa cromatina, no qual não foi possível visualizar nucléolo, foram observadas na porção dorsal da medula espinhal (fig.26). Não muito próximo à urófise, submarginais ao canal central, identificaram-se neurônios irregulares de tamanho médio, com citoplasma reduzido, contendo um núcleo esférico muito grande, com cromatina relativamente escassa (fig.27). Nucléolos não foram observados. Em ambos os lados da medula espinhal, em uma região proximal à urófise, encontraram-se células grandes, ovóides, com citoplasma abundante, núcleo esférico e excêntrico, contendo cromatina com aspecto de rede de malhas finas e um nucléolo geralmente central (fig. 28).

Alguns axônios das células maiores e das de tamanho médio estendem-se em direção à urófise, até atingi-la. Nas células neurosecretoras pequenas, alguns axônios de trajeto oblíquo aproximam-se do canal central e, sem atingi-lo, dirigem-se também para a urófise.

Alguns pericários magno e parvocelulares fortemente imunorreativos à UII possuem ramificações que, terminando como bulbos, chegam ao canal central e, atravessando as células de revestimento, entram diretamente em contacto com o fluido cerebrospinal (fig.29). As magnocélulas são ovóides com citoplasma reduzido, núcleo ovalar grande, contendo cromatina esparsa (fig. 30). As parvocélulas, mais ou menos esféricas, também com escasso citoplasma, núcleo grande e esférico, apresentam cromatina espessa, em pequena quantidade (fig.30). Nessas células não foram visualizados nucléolos.

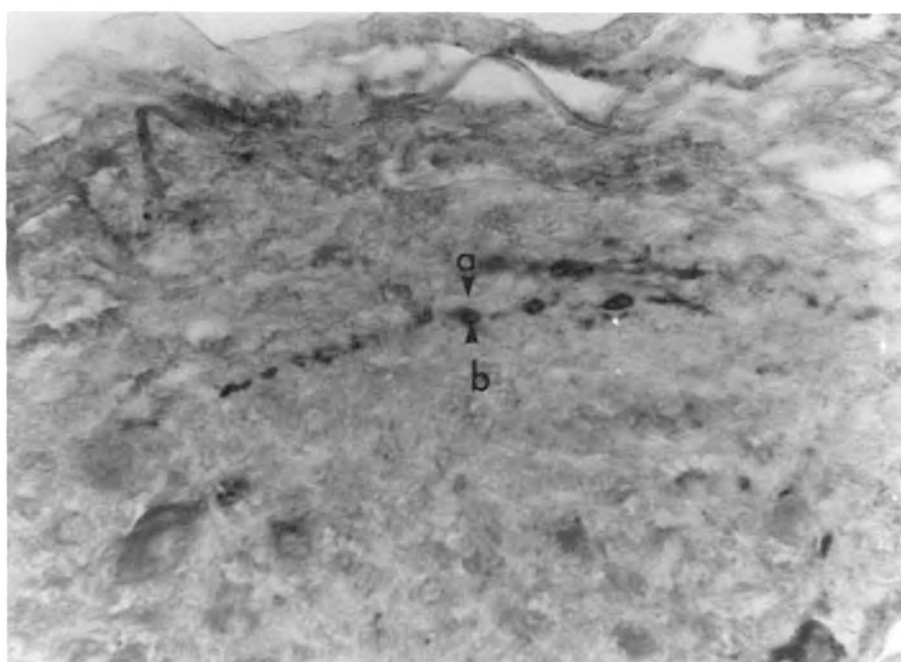


Figura 26. Detalhe de um corte histológico sagital da medula espi-
nhal de *C. auratus* do grupo "A", mostrando os neurônios
secretores imunorreativos à UII pequenos.
Teste imunocitoquímico para UII.
(a) células neurosecretoras imunorreativas à UII pe-
quenas, de forma arredondada, citoplasma reduzido e (b)
um núcleo circular, volumoso.
Aumento: 400X.

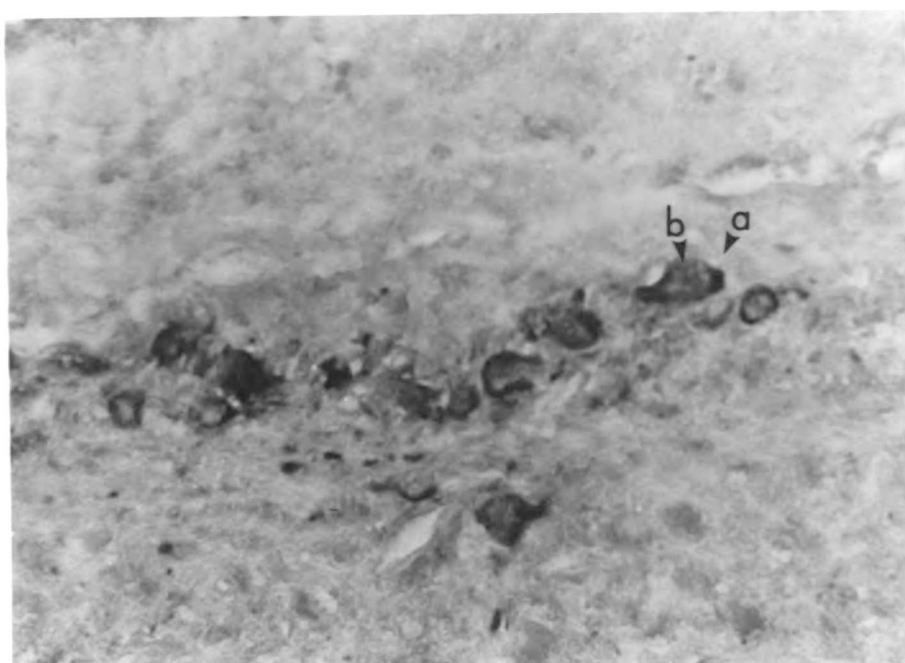


Figura 27. Detalhe de um corte histológico sagital da medula espi-
nhal de **C. auratus** do grupo "A", mostrando as células
Dahlgren imunorreativas à UII, de tamanho médio.
Teste imunocitoquímico para UII.
(a) Células neurosecretoras imunorreativas à UII, de
tamanho médio, com citoplasma reduzido, contendo (b) um
núcleo esférico muito grande.
Aumento: 400X



Figura 28. Aspecto dos pericários grandes da região caudal da medula espinhal de *C. auratus* do grupo "A"; corte histológico sagital.

Teste imunocitoquímico para UII.

(a) Pericários neurosecretores imunorreativos à UII grandes, com citoplasma abundante, (b) núcleo esférico, excêntrico, contendo cromatina com aspecto de rede de malhas finas e (c) um nucléolo central; (d) vista parcial do canal central.

Aumento: 400X.



Figura 29. Corte histológico sagital da porção caudal da medula espinhal de **C. auratus** do grupo "A", mostrando células neu^{ro}secretoras que contactam o fluido cerebrospinal. Teste imunocitoquímico para UII.
(a) Canal central; (b) magnocélula fortemente imuno^{re}ativa à UII; (c) parvocélulas secretoras imuno^{re}ativas à UII.
Aumento: 160X.

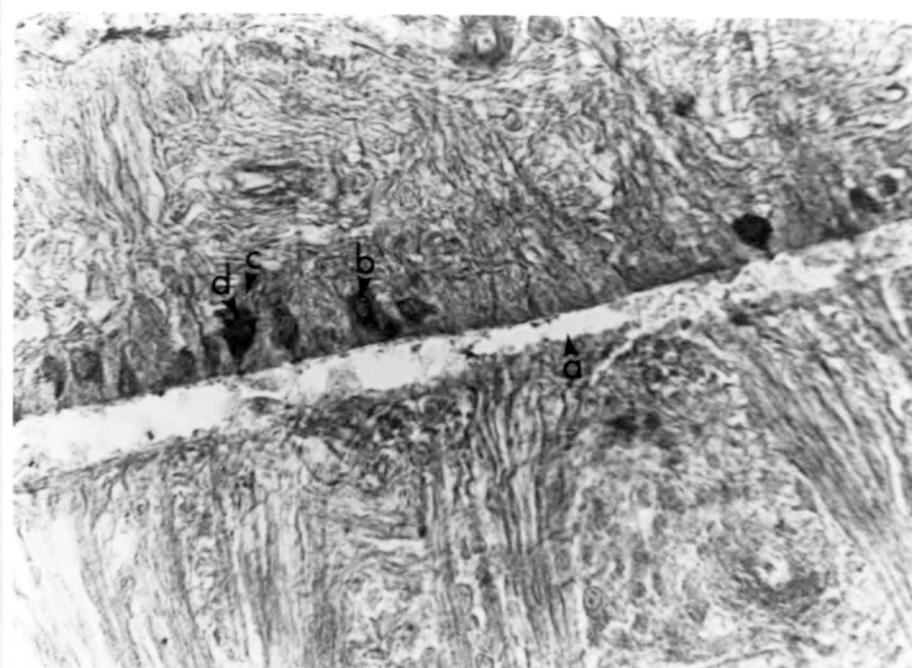


Figura 30. Aspecto de um corte histológico sagital, mostrando os pericários parvo e magnocelulares imunorreativos à UII que contactam o fluido cerebrospinal de **C. auratus** do grupo "A".

Teste imunocitoquímico para UII.

(a) Canal central; parvocélulas secretoras imunorreativas à UII, mais ou menos esféricas, com citoplasma escasso, (b) núcleo grande e esférico, com pequena quantidade de cromatina; (c) magnocélulas secretoras imunorreativas à UII ovóides, com citoplasma reduzido, (d) núcleo ovalar grande, com cromatina esparsa.

Aumento: 400X.

A observação microscópica mostrou esses neurônios agrupados em contínua coluna de células, acompanhando lateralmente o canal central (fig.30).

4.3.1 PEIXES TRATADOS COM SOLUÇÃO SALINA 0,6% (GRUPO "A", CONTROLE)

A pesquisa morfométrica realizada em células neurosecretoras imunorreativas à UII da medula espinhal caudal dos *C. auratus* que compõem o grupo controle (Grupo "A") confirmou a presença de três populações de pericários: células neurosecretoras pequenas, com áreas distribuídas em um intervalo entre 12 e 187 μm^2 (fig.31) e núcleos com área medindo entre 5 e 65 μm^2 (fig.32). Outra população de células de tamanho intermediário mostrava área oscilando entre 187 e 387 μm^2 (fig.31), cujos núcleos apresentaram área entre 65 e 105 μm^2 (fig.32). Em um terceiro grupo com células neurosecretoras grandes, mediram-se áreas celulares variáveis entre 387 e 562 μm^2 (fig.31), com núcleos cuja área estava distribuída entre 105 e 215 μm^2 (fig.32).

Calculou-se a média e o desvio padrão das variáveis em estudo, isto é, a média das áreas dos pericários e dos seus respectivos núcleos (tabela VIII).

As células neurosecretoras imunorreativas à UII do grupo controle que possuem prolongamentos dendríticos que contactam o fluido cerebrospinal foram analisadas morfometricamente (tabela IX). Dois grupos de células destacaram-se: neurônios parvocelulares possuidores de área celular in-

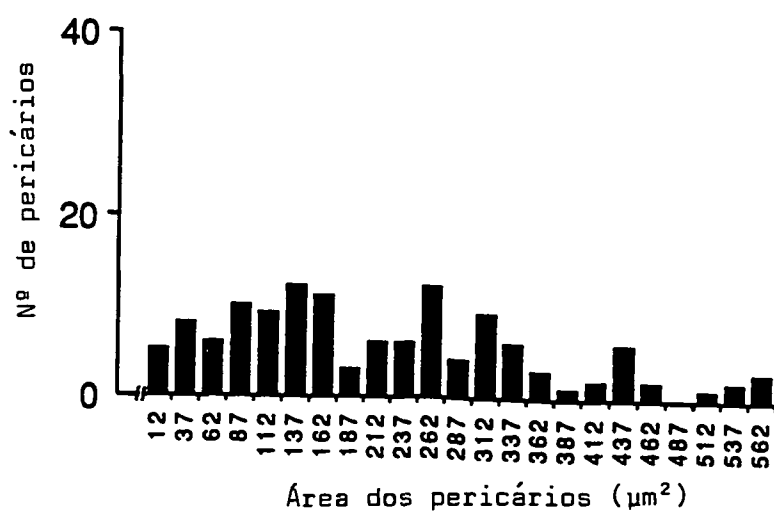


Figura 31. Área dos pericários secretores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "A"

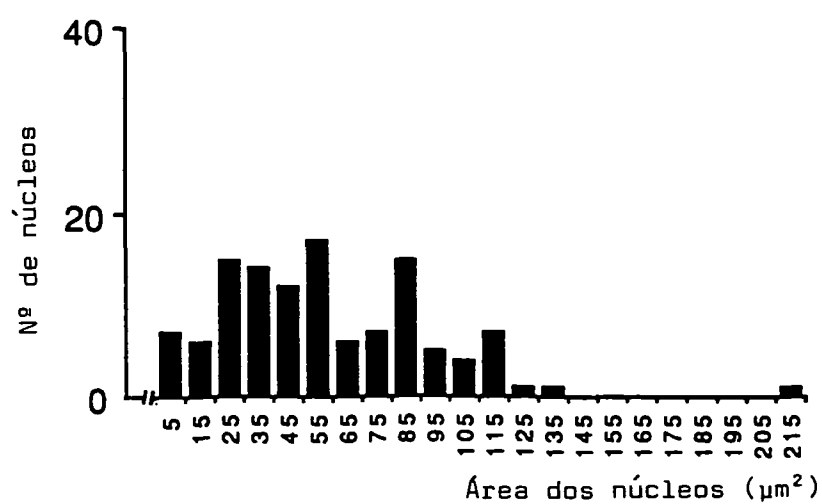


Figura 32. Áreas dos núcleos de neurônios secretores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "A"

T A B E L A Nº VIII

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ÁREAS DAS CÉ-LULAS NEUROSSECRETORAS IMUNORREATIVASÀ UROTENSINA II (PERICÁRIOS E NÚCLEOS)

Tipo de tratamento	Nº do animal no experimento	Nº de neurônios estudados	PERICÁRIOS		NÚCLEOS	
			Média (μm^2)	Desvio padrão (μm^2)	Média (μm^2)	Desvio padrão (μm^2)
Solução salina 0,6%	S2	23	211,26	130,86	61,51	33,92
	S5	20	235,71	148,58	60,06	34,68
	S6	20	306,23	130,20	66,90	26,78
	S8	21	293,63	104,39	68,39	26,98
	S9	20	160,85	77,57	56,60	41,19
	S10	23	114,63	145,95	27,12	29,45
Metopirona	M3	20	61,23	58,34	16,24	13,68
	M5	21	113,04	52,43	31,44	10,10
	M6	25	52,46	37,13	17,14	10,95
	M9	25	97,96	92,44	24,22	21,22
	M10	25	171,79	70,96	49,82	22,23
Dexametasona	D6	22	355,30	103,57	88,61	30,92
	D7	20	329,22	78,29	67,47	17,33
	D8	20	210,75	130,44	63,33	42,90
	D9	25	285,87	115,55	72,67	30,69
	D10	24	210,01	125,94	47,99	25,89
	D11	25	100,29	125,54	29,30	37,91

T A B E L A N° IX

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ÁREAS DAS CÉ-
LULAS NEUROSSECRETORAS IMUNORREATIVAS
À UROTENSINA II QUE CONTACTAM O FLUI-
DO CEREBROSPINAL (PERICÁRIOS E NÚCLEOS)

Tipo de tratamento	Nº do animal no experimento	Nº de neurônios estudados	PERICÁRIOS		NÚCLEOS	
			Média (µm²)	Desvio padrão (µm²)	Média (µm²)	Desvio padrão (µm²)
Solução salina 0,6%	S2	25	44,15	57,89	10,32	9,24
	S3	8	283,52	151,04	62,58	25,79
	S5	25	30,01	22,43	8,52	4,73
	S6	8	283,52	151,04	62,58	25,79
	S7	3	290,43	48,23	90,62	22,41
	S8	14	16,26	8,79	5,19	3,32
	S9	7	95,21	29,33	30,78	11,47
	S10	25	16,75	10,20	4,89	3,57
Metopirona	M3	25	52,39	26,16	16,10	9,39
	M5	20	62,24	29,18	14,97	7,91
	M9	25	117,71	90,88	34,88	31,33
Dexametasona	D6	20	67,95	14,81	25,31	6,56
	D7	25	172,54	88,85	47,21	23,90
	D8	22	65,77	15,13	27,03	7,86
	D9	21	65,99	15,26	27,33	7,25
	D10	25	173,91	123,47	44,52	30,59
	D11	22	170,40	90,85	58,51	27,52
	D12	25	152,79	104,51	40,59	28,90

ferior a $112 \mu\text{m}^2$ (fig. 33), portadores de núcleo com área nuclear igualmente pequena, oscilando entre 5 e $65 \mu\text{m}^2$ (fig. 34); outros neurônios magnocelulares com área celular entre 112 e $487 \mu\text{m}^2$ (fig. 33) apresentavam núcleo com área entre 65 e $115 \mu\text{m}^2$ (fig. 34). A maior frequência de amostras celulares desses neurônios secretores estudados no grupo "A" era de parvocélulas. A caracterização de um neurônio individual padrão foi dificultada, devido à distribuição dispersiva das amostras celulares estudadas (tabela IX).

4.3.2 PEIXES TRATADOS COM METOPIRONA (GRUPO "B")

Após as injeções de metopirona num grupo de *C. auratus*, observou-se, em microscopia óptica, que a ação desta droga reduziu o tamanho das áreas celulares nas células Dahlgren imunorreativas à UII. Entretanto, pela análise morfométrica, verificou-se que, embora reduzidas as superfícies dos neurônios e dos seus núcleos, foram mantidas as três populações: pequenos, médios e grandes. As áreas das células Dahlgren pequenas mediam entre 12 e $37 \mu\text{m}^2$ (fig. 35) e a área nuclear tinha entre 5 e $15 \mu\text{m}^2$ (fig. 36); neurônios de tamanho intermediário, com área dos pericários variando entre 37 e $162 \mu\text{m}^2$ (fig. 35) e área nuclear entre 15 e $65 \mu\text{m}^2$ (fig. 36), foram encontrados; as células neurosecretoras grandes apresentavam corpo celular com área entre 162 e $287 \mu\text{m}^2$ (fig. 35) e núcleos variando entre 65 e $95 \mu\text{m}^2$ (fig. 36).

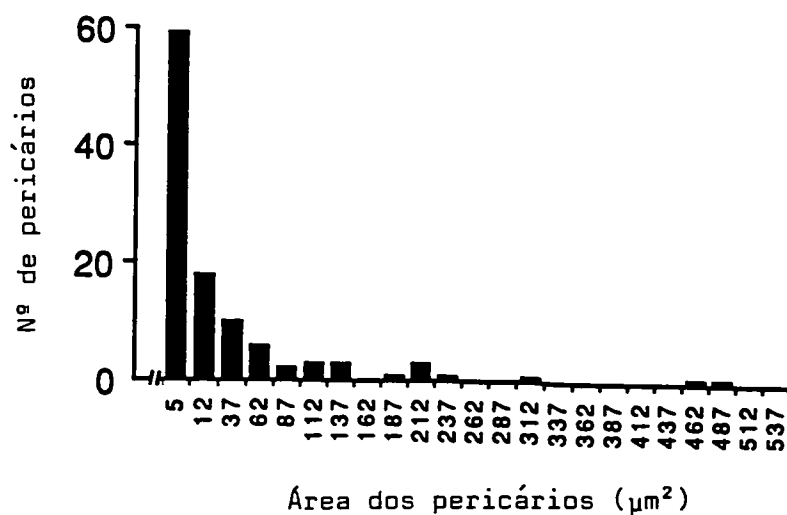


Figura 33. Área dos pericários dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretadores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "A" .

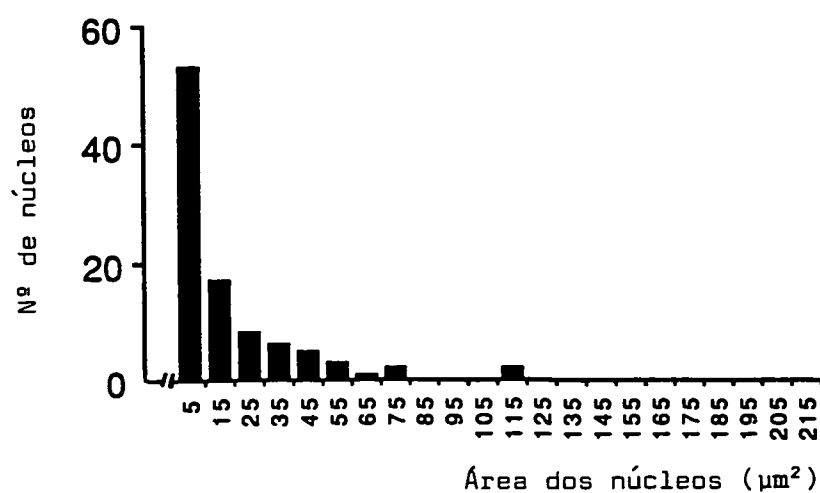


Figura 34. Área dos núcleos de neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretadores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "A".

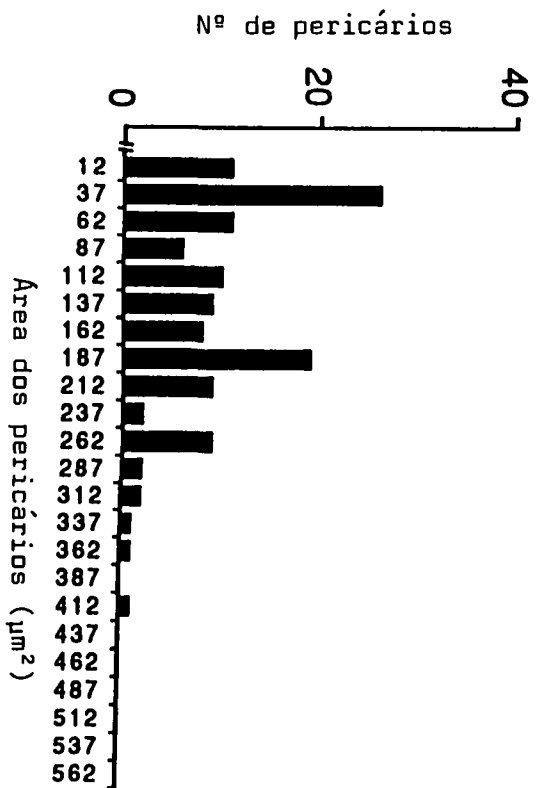


Figura 35. Área dos pericários secretores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "B"

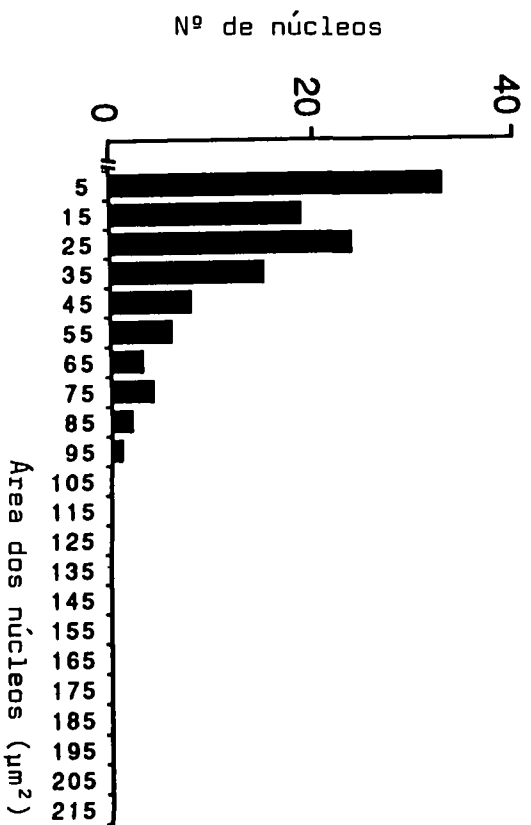


Figura 36. Área dos núcleos de neurônios secretores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "B"

As células Dahlgren dessas populações diminuíram significativamente sua área, a um nível de probabilidade $p < 0,05$ (tabela X, fig. 37), bem como as respectivas áreas nucleares (tabela XI; fig. 38), quando comparadas com a análise morfométrica das médias das mesmas variáveis estudadas no grupo testemunha.

Sob a ação da metopirona, a distribuição dos pericários e dos seus respectivos núcleos, ao longo da medula espinhal, bem como a intensidade da imunorreação à UII, não sofreram alterações em relação ao grupo controle.

As células neurosecretoras imunorreativas à UII que contactam o fluido cerebrospinal, dos *C. auratus* tratados com metopirona por seis dias, foram medidas morfometricamente. Esses neurônios apresentaram as mesmas características das populações celulares anteriormente descritas no grupo "A", observando-se, apenas, um pequeno aumento da área dos neurônios secretores e de seus respectivos núcleos (tabela IX).

A análise morfométrica das parvocélulas mostrou áreas celulares inferiores a $162 \mu\text{m}^2$ (fig. 39) e áreas nucleares abaixo de $65 \mu\text{m}^2$ (fig. 40). Os neurônios magnocelulares apresentaram área celular entre 162 e $287 \mu\text{m}^2$ (fig. 39) e eram portadores de núcleo de área nuclear entre 65 e $135 \mu\text{m}^2$ (fig. 40).

As análises morfométricas das áreas pericárias e nucleares, realizadas nos neurônios secretores incluídos neste grupo "B", mostraram que, após a injeção de metopirona, ocor-

T A B E L A N° XANÁLISE ESTATÍSTICA DAS ÁREAS DOS PERICÁRIOSNEUROSSECRETORES IMUNORREATIVOS À UROTENSINA IICOMPARAÇÃO DOS GRUPOS "A" E "B"

Teste t de "Student"

<u>Grupo</u>	<u>Total de células medidas</u>	<u>Média (µm²)</u>	<u>Desvio padrão (µm²)</u>	<u>t</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
GRUPO "A" (controle)						
6 peixes	127	218,25	141,24	8,14*	199	<0,05
GRUPO "B" (metopirona)						
5 peixes	116	100,46	77,89			

A diferença entre os grupos "A" e "B" é estatisticamente significativa

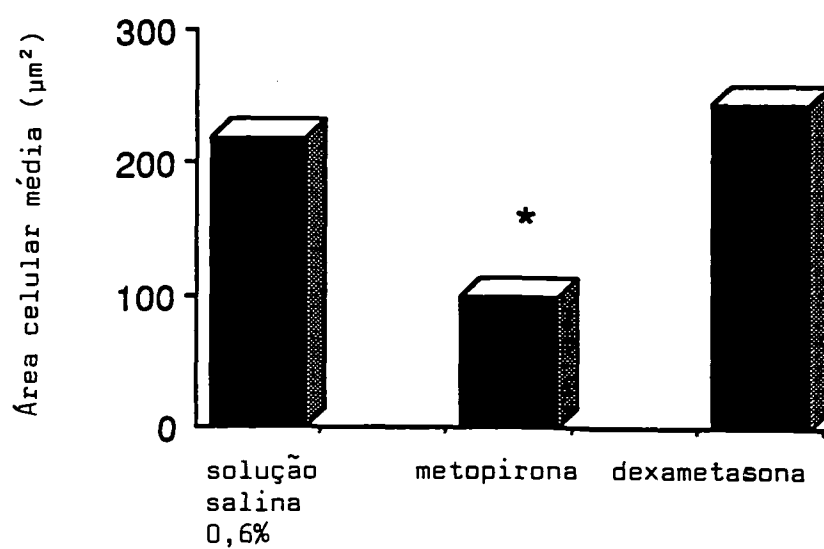


Figura 37. Média das áreas dos pericários se - cretores de Ull-ir dos *C. auratus* tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C").

T A B E L A N° XI

ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS ÁREAS DOS NÚCLEOS DAS CÉLU-
LAS NEUROSSECRETORAS IMUNORREATIVAS À UROTENSINA II

COMPARAÇÃO DOS GRUPOS "A" E "B"

Teste t de "Student"

<u>Grupo</u>	<u>Total de núcleos medidos</u>	<u>Média (μm^2)</u>	<u>Desvio padrão (μm^2)</u>	<u>t</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
GRUPO "A" (controle)						
6 peixes	127	56,27	34,90	7,71*	208	<0,05
GRUPO "B" (metopirona)						
5 peixes	116	28,11	20,79			

A diferença entre os grupos "A" e "B" é estatisticamente significativa

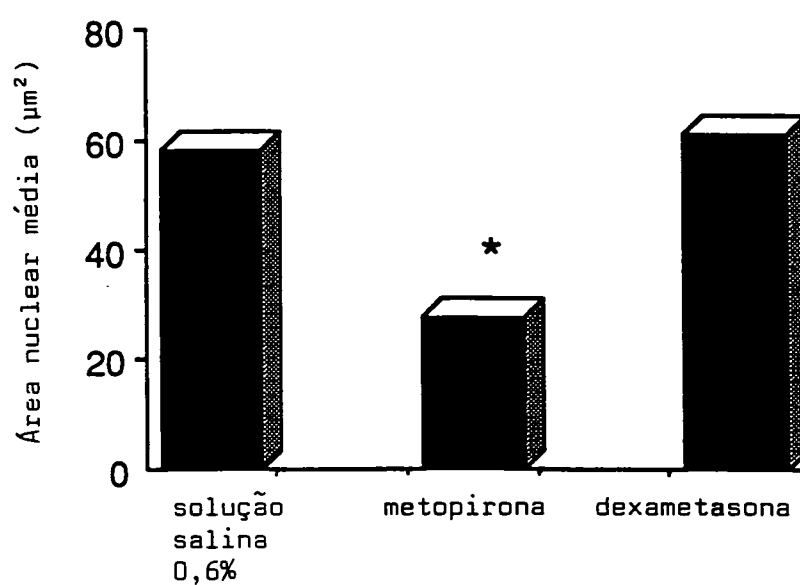


Figura 38. Média das áreas dos núcleos de neurônios secretores de UII dos *C. auratus* tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C").

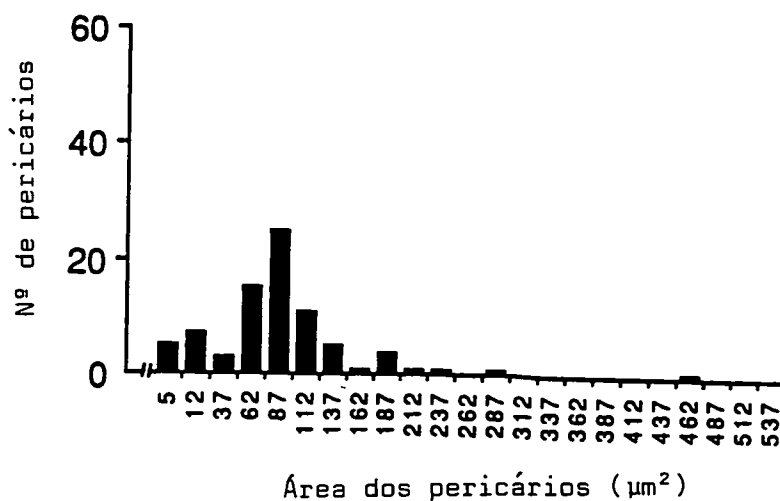


Figura 39. Área dos pericários dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretadores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "B".

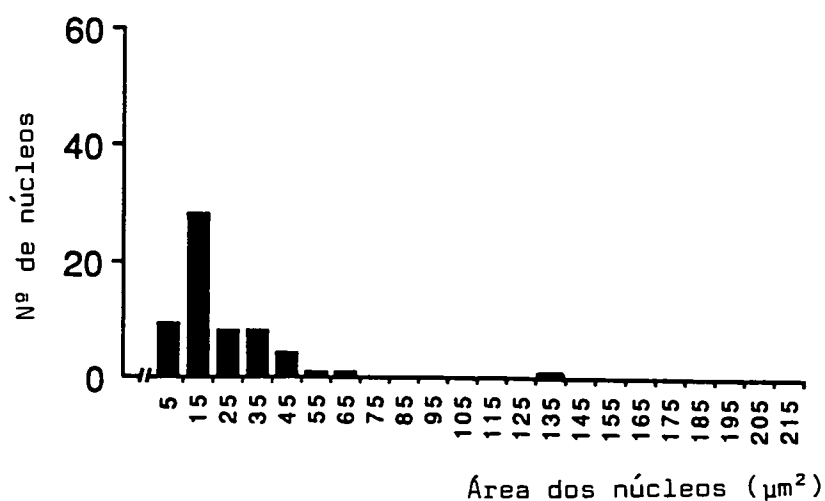


Figura 40. Área dos núcleos de neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretadores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "B".

reu um aumento não significativo das superfícies celulares e nucleares comparadas com a média das áreas pericárias e nucleares do grupo controle (figs. 41,42; tabelas XII e XIII).

As células neurosecretoras imunorreativas à UII que contactam o fluido cerebrospinal foram observadas somente em três peixes tratados com metopirona, apesar de pesquisadas em todos os cortes histológicos dos exemplares estudados neste grupo.

4.3.3 PEIXES TRATADOS COM DEXAMETASONA (GRUPO "C")

Ao serem analisados os resultados da análise morfométrica dos neurônios imunorreativos à UII dos peixes do grupo "C", tratados com dexametasona durante seis dias, observou-se que as superfícies celulares e nucleares não foram significativamente alteradas, em relação ao grupo controle (tabela VIII).

Com este tratamento, também foram encontradas três populações celulares: células pequenas, com área entre 12 e 187 μm^2 (fig. 43), com núcleos de áreas igualmente pequenas, entre 5 e 55 μm^2 (fig. 44); os neurônios de tamanho médio foram incluídos entre as células com áreas de 187 e 362 μm^2 (fig. 43), tendo seus núcleos área entre 55 e 95 μm^2 (fig. 44); por outro lado, as células grandes apresentaram áreas acima de 362 μm^2 (fig. 43) e seus núcleos, áreas acima de 95 μm^2 (fig. 44).

As células neurosecretoras imunorreativas à UII dos

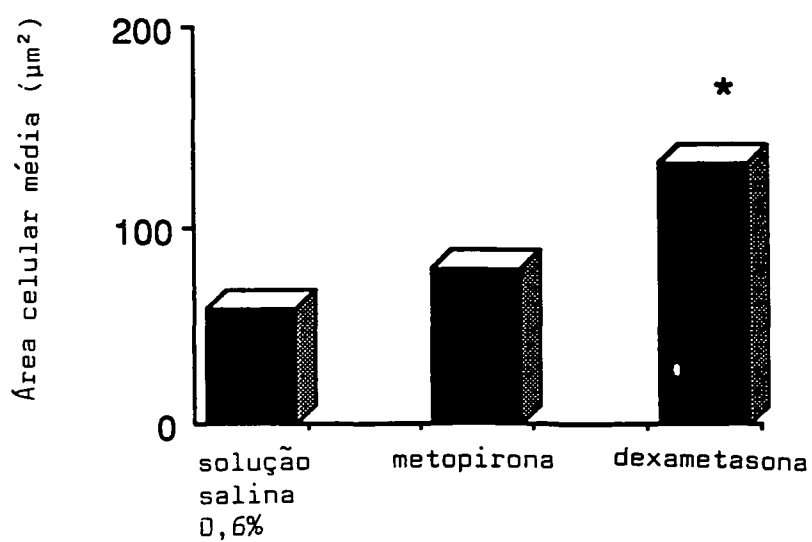


Figura 41. Média das áreas dos pericários dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos *C. auratus* tratados com solução salina 0,6% (grupo "A"); metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C").

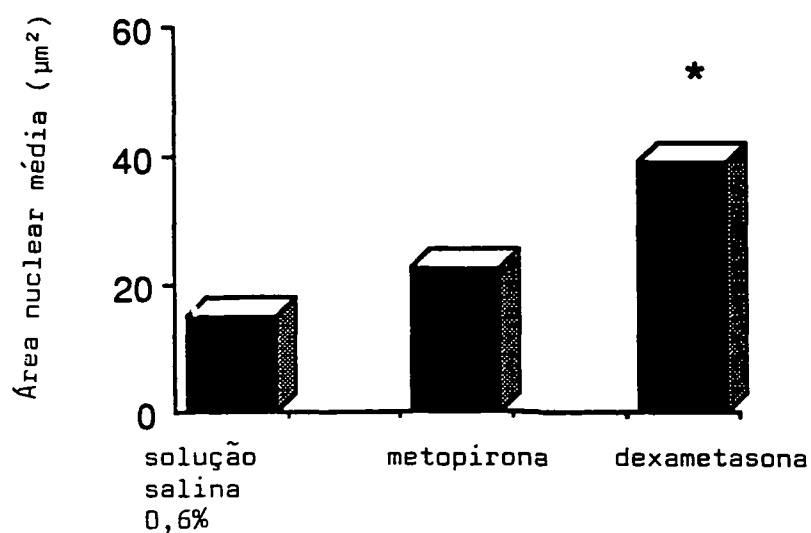


Figura 42. Média das áreas dos núcleos de neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos *C. auratus* tratados com solução salina 0,6% (grupo "A") ; metopirone (grupo "B") e dexametasona (grupo "C").

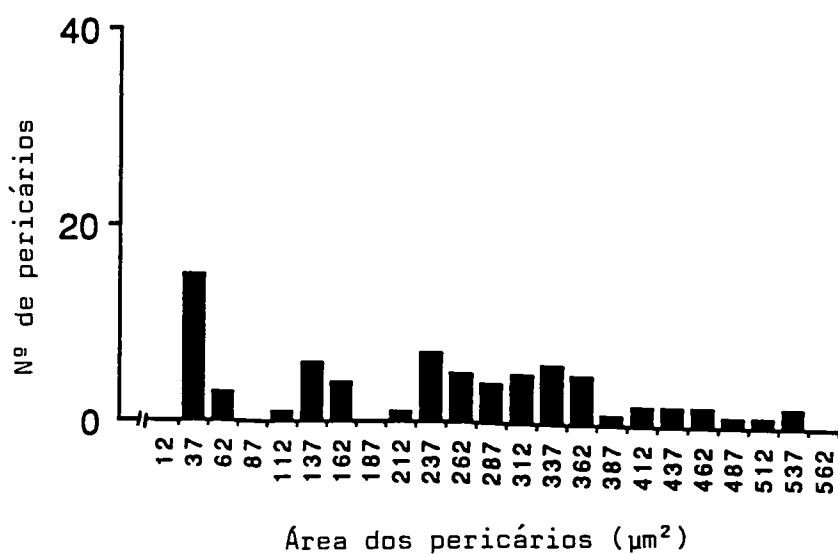


Figura 43. Área dos pericários secretores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "C"

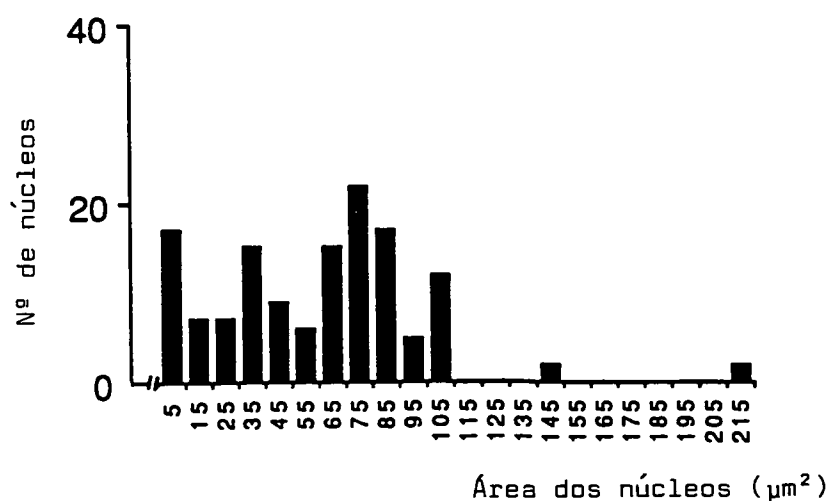


Figura 44. Área dos núcleos de neurônios secretores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "C"

peixes incluídos no grupo tratado com dexametasona são um pouco maiores que as células do grupo controle, porém não há significado estatístico para as diferenças de tamanho (tabela XIV). Os núcleos destes pericários também apresentaram aumento da área nuclear, porém sem significado estatístico (tabela XV).

Os resultados demonstraram que a atividade secretora dos neurônios liberadores da UII é pouco estimulada pela dexametasona. Seus efeitos não provocam alterações estatisticamente significativas nas áreas celulares, nem nas nucleares, ao contrário do que foi observado nos pericários e núcleos das células secretoras de UII dos peixes tratados com metopirona (figs. 37,38).

A imunocoloração e a localização das células permaneceram inalteradas, quando comparadas com o grupo testemunha.

A atividade biológica desencadeada por injeções diárias de dexametasona, em um grupo de peixes, mostrou que é capaz de desencadear reações de diferente magnitude, que se traduzem em modificações neuro-hormonais, capazes de alterar a área da superfície celular dos neurônios e de seus respectivos núcleos.

A avaliação morfométrica das células imunorreativas à UII que contactam o fluido cerebrospinal demonstrou alterações nas áreas celulares, que variavam entre 5 e $137 \mu\text{m}^2$ nas parvocélulas, e de 137 a $462 \mu\text{m}^2$, nas magnocélulas (fig. 45). As variações das medidas de superfície realizadas nos núcleos das pequenas e grandes células acompanharam essa mesma

variação, sendo que sua distribuição de frequências caracterizava populações distintas, que iam de 5 a 65 μm^2 nos núcleos das parvocélulas e de 65 a 115 μm^2 dos neurônios magnocelulares (fig. 46).

A representação estatística de um valor central para a distribuição das superfícies pericárias na população em estudo foi obtida pela média de todas as análises morfométricas realizadas nas células Dahlgren que contactam o fluido cerebrospinal, incluídas no grupo "C". Igualmente, calculou-se a média das superfícies nucleares das amostras de células imunotratadas na população de peixes que recebeu injeções de dexametasona. Ao serem comparadas as médias do grupo "C" em estudo, com as médias do grupo testemunha (grupo "A"), pela utilização do teste t de Student, concluiu-se que há diferença estatisticamente significativa entre as duas populações, tanto na variável que representa a área celular, quanto na que representa a área nuclear (tabelas XVI e XVII).

Analizando as áreas celulares e nucleares dos neurônios imunorreativos à UII que contactam o fluido cerebrospinal, pode-se afirmar que os dois grupos, grupo "A" ou controle e o grupo "C", tratado com dexametasona, formam populações distintas (figs. 41,42).

Afere-se destes resultados que a dexametasona, um hormônio adrenocorticosteróide, possui significativa ação biológica sobre as áreas celular e nuclear dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal, imunorreativos à UII.

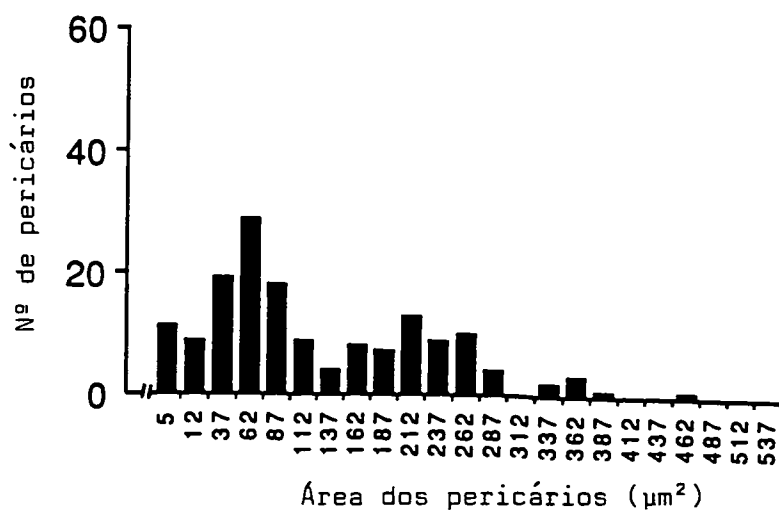


Figura 45. Área dos pericários dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "C".

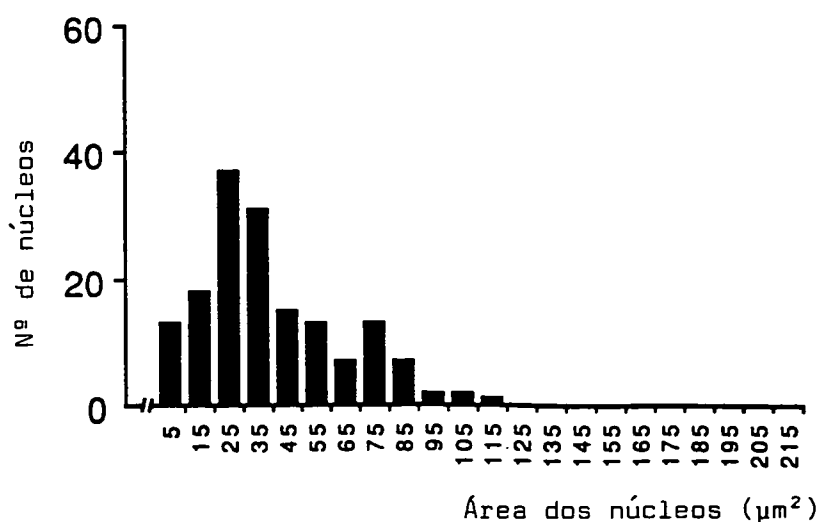


Figura 46. Área dos núcleos de neurônios que contactam o fluido cerebrospinal secretores de UII-ir dos *C. auratus* do grupo "C".

4.4 TESTE DE CO-LOCALIZAÇÃO

Na busca de neurônios que fossem simultaneamente imunorreativos à UI e UII, em um grupo de peixes tratados com solução salina 0,6%, foram realizados testes de co-localização. A imunorreação obtida nos cortes adjacentes, tratados com anti-soros para UI e para UII, observados em lâminas intercaladas e adjacentes, revelou a coexistência de UI-ir (fig. 47) e UII-ir (fig. 48) ao mesmo tempo, em muitas células. Contudo, pequeno número de pericários imunorreativos à UII mostrou imunorreação fraca ou ausente, na presença do anti-soro UI.

As células Dahlgren, imunorreativas à UII, portadoras das ramificações que atravessam o canal central, contactando o fluido cerebrospinal, armazenam e secretam somente UII-ir, apresentando imunorreações negativas à UI.

4.5 TESTE DE ESPECIFICIDADE

Com a imunocitoquímica procura-se um peptídeo existente na célula. Na busca da especificidade da reação antígeno-anti-soro UI, procurou-se neutralizar, *in vitro*, as propriedades antigênicas dos peptídios, antes de levá-los a reagir diretamente sobre o corte histológico. Assim sendo, processando-se, em um microtubo, uma reação imunológica entre o antígeno UI e o anti-soro diluído desta mesma UI, obteve-

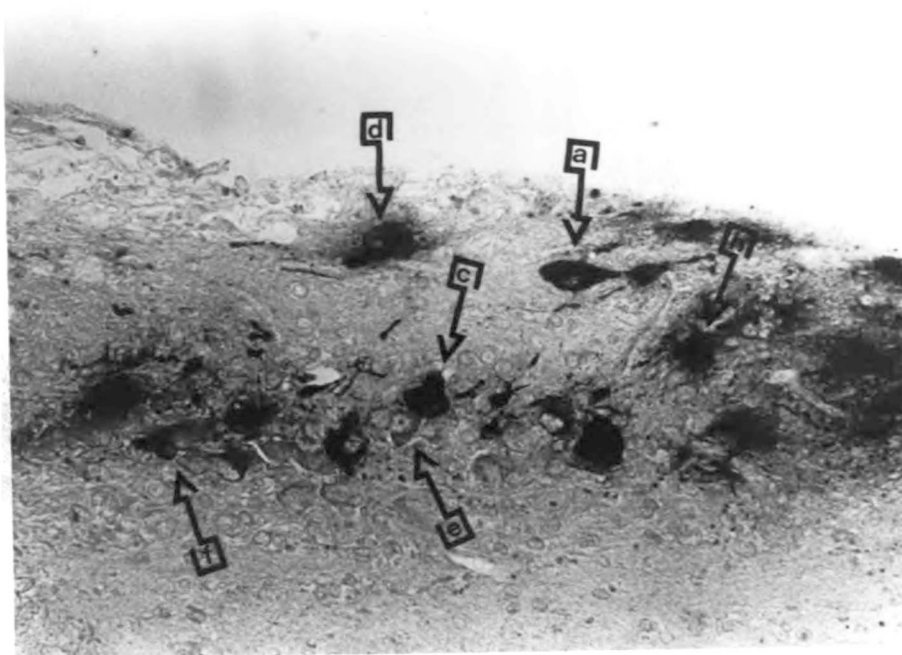


Figura 47. Neurônios secretores da região caudal da medula espinhal de *C. auratus* do grupo "A"; corte histológico sagital. Teste de co-localização com o anti-soro UI.
(a) Neurônios secretores com imunorreatividade ao anti-soro UI.
Aumento: 160X.

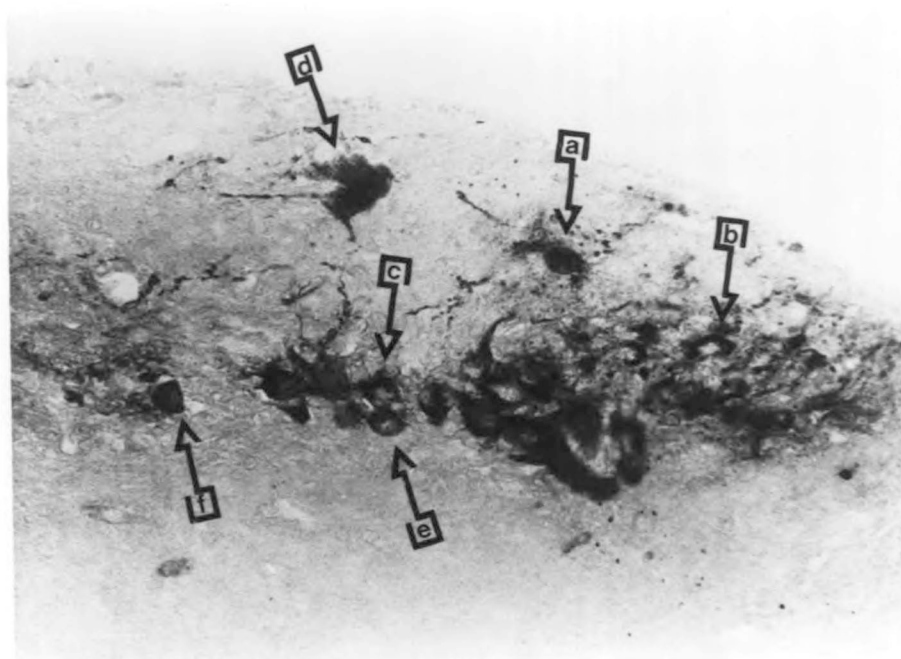


Figura 48. Células neurosecretoras da região caudal da medula espi de *C. auratus* do grupo "A"; corte histológico sagital. Teste de co-localização com anti-soro Ull.
(a) Células neurosecretoras com imunorreatividade ao anti-soro Ull.
Aumento: 160X.

se uma perfeita imunorreação, após incubação de uma noite. Quando se aproveitou o líquido existente no microtubo, no qual já ocorrera a reação antígeno-anti-soro, para provocar nova reação imunocitoquímica, verificou-se que esta não aconteceu (figs. 49, 50). Os peptídios UI misturados no microtubo já haviam reagido com o anti-soro UI em toda a sua cadeia peptídica.

Teste *in vitro* foi realizado com o hormônio liberador de corticotropina (HLC), peptídio que reagiu com o anti-soro UI. Levando o líquido do microtubo onde se processou esta reação, após incubação, para gotejamento sobre o corte histológico, obteve-se imunorreação quase total à UI. O HLC em sua seqüência de aminoácidos tem marcada analogia estrutural com a UI, razão por que a imunorreação foi quase completa no microtubo (figs. 49,51).

Os resultados para a especificidade entre o peptídio UII e o anti-soro UII mostraram que não há imunorreação quando o líquido em que houve a reação antigênica entra em contacto com a célula preparada (figs. 52,53). Em peptídios com cadeia semelhante de aminoácidos, a primeira reação antígeno-anti-soro dá-se *in vitro* no microtubo, não sobrando resíduos de aminoácidos suficientes para a nova reação em contacto com os neurônios secretores de UII.

Em outro teste de especificidade realizado com peptídios não homólogos (UII e somatostatina), obtiveram-se resultados com duas reações antigênicas: uma *in vitro* e outra obtida utilizando-se sobre as células do corte histológico



Figura 49. Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de **C. auratus** do grupo "A".
Teste de especificidade com UI (anti-soro).
(a) Neurônios secretores imunorreativos à UI.
Aumento: 160X.



Figura 50. Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de **C. auratus** do grupo "A".
Teste de especificidade com UI (peptídio) + UI (anti-soro).
Ausência total de imunorreatividade.
Aumento: 160X.



Figura 51. Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de *C. auratus* do grupo "A".
Teste de especificidade com HLC (peptídeo) + UI (anti-soro).
(a) Neurônios secretores apresentando intensa imunorreatividade.
Aumento: 160X.

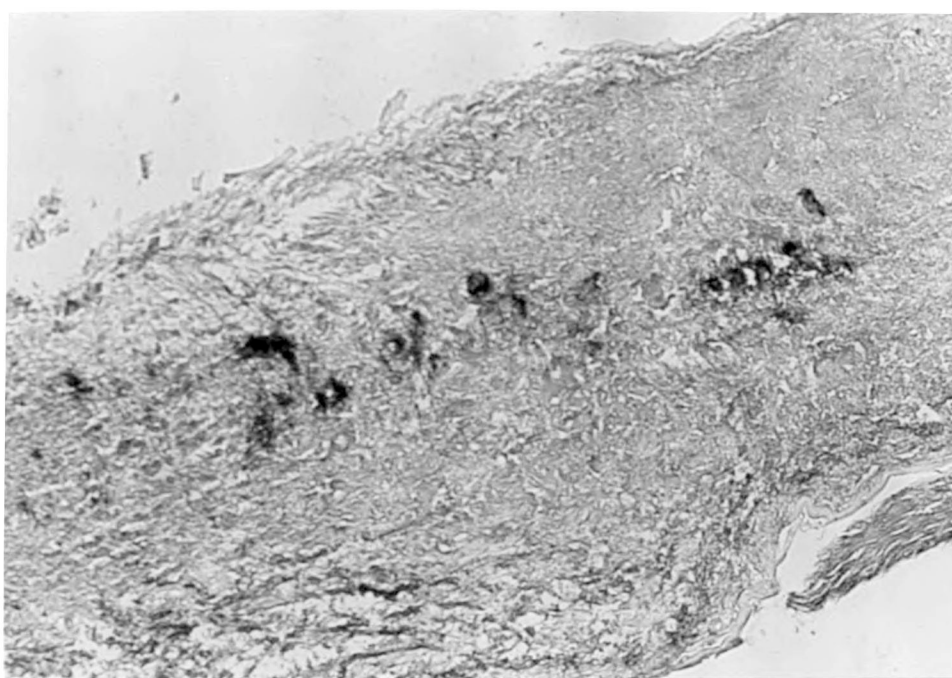


Figura 52. Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de *C. auratus* do grupo "A".
Teste de especificidade com UII (anti-soro).
(a) Neurônios secretores imunorreativos à UII.
Aumento: 160X.

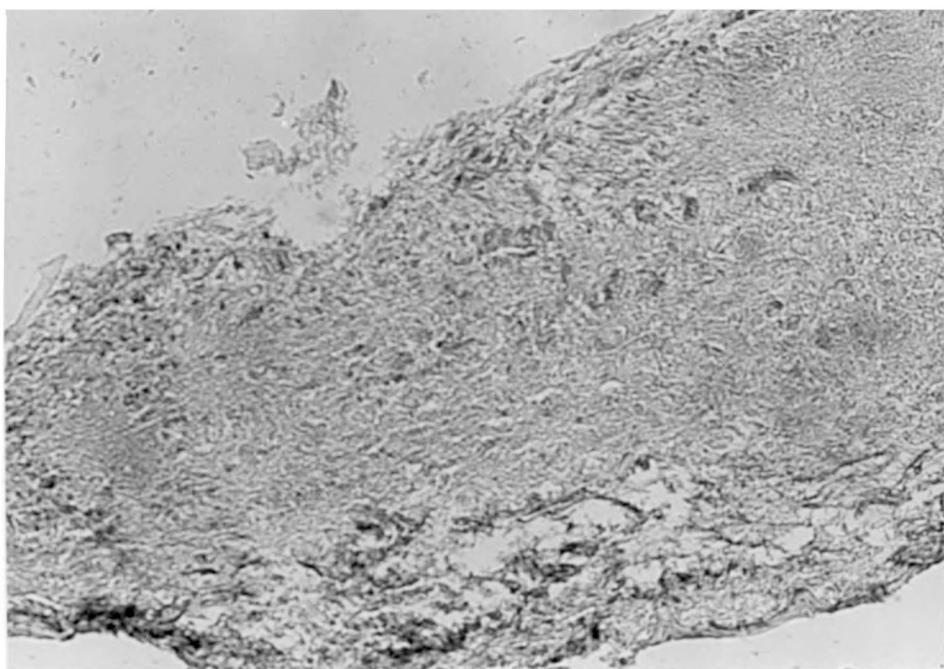


Figura 53. Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de **C. auratus** do grupo "A".
Teste de especificidade com UII (peptídio) + UII (anti - soro).
Ausência total de imunorreação.
Aumento: 160X.

o líquido onde já ocorrera, *in vitro*, uma primeira imunorreação. A presença de uma cadeia peptídica na somatostatina, em parte semelhante, porém com algumas diferenças fundamentais em relação à UII, permitiu a obtenção de dupla imunorreação (figs. 52,54).

Os resultados que demonstraram a especificidade das reações confirmam a presença de UI-ir e UII-ir nas células neurosecretoras da medula espinhal de *C. auratus*.

4.6 RADIOIMUNOENSAIO

A fim de confirmar os resultados obtidos com a morfometria das áreas pericárias e de seus respectivos núcleos, buscou-se encontrar explicação para as modificações observadas em cada grupo de peixes estudado.

A consequência da aplicação de drogas biologicamente ativas em *C. auratus* fez-se notar pelas alterações estatisticamente significativas, ou não, que ocorriam nos grupos de peixes tratados. Ao se injetar a metopirona, um potente inibidor do cortisol, obteve-se diminuição estatisticamente significativa nas áreas das células e núcleos imunorreativos à UI e à UII; e aumento não significativo nas áreas celulares e nucleares dos neurônios que contactam o fluido cerebrospinal, imunorreativos à UII.

Ao contrário, na população de peixes submetidos à ação da dexametasona, os resultados mostraram aumento significa-



Figura 54. Corte histológico sagital da região caudal da medula espinhal de **C. auratus** do grupo "A".
Teste de especificidade com somatostatina (peptídio) +
UII (anti-soro).
(a) Neurônios secretores apresentando intensa imunorreatividade.
Aumento: 160X.

tivo das áreas celulares e nucleares de todos os neurônios imunorreativos à UI observados e das áreas das células neurosecretoras de UII que contactam o fluido cerebrospinal, bem como de seus núcleos; aumento não significativo foi observado nas áreas celulares e nucleares dos neurônios imunorreativos à UII que não contactam o fluido cerebrospinal.

A dexametasona suprime a secreção de ACTH através do efeito corticosteróide do "feedback" negativo sobre o hipotálamo e a glândula hipofisária. Assim sendo, deve ocorrer um aumento do nível plasmático do cortisol, hormônio este que participa da regulação neurosecretora que comanda as reações de síntese que têm como consequência o aumento das áreas celular e nuclear.

Para a determinação do nível de cortisol no plasma sanguíneo, pela técnica de radioimunoensaio, utilizou-se cortisol como padrão e cortisol complexado com iodo radioativo ^{125}I como marcador. O anticorpo cortisol, utilizado neste radioimunoensaio, mostrou 13,5% de reatividade com 11-desoxicortisol, o maior produto biossintético do tecido adrenocortical, na presença da metopirona. A excessiva produção do 11-desoxicortisol acumulado no sangue foi detectada pelo experimento feito com radioimunoensaio para cortisol.

A detecção do nível de cortisol no plasma sanguíneo dos peixes que receberam injeções de metopirona apresentou níveis de cortisol elevados significativamente (fig. 55).

No grupo de peixes tratados com dexametasona, os níveis de cortisol são muito baixos, ou até não detectáveis (fig. 55).

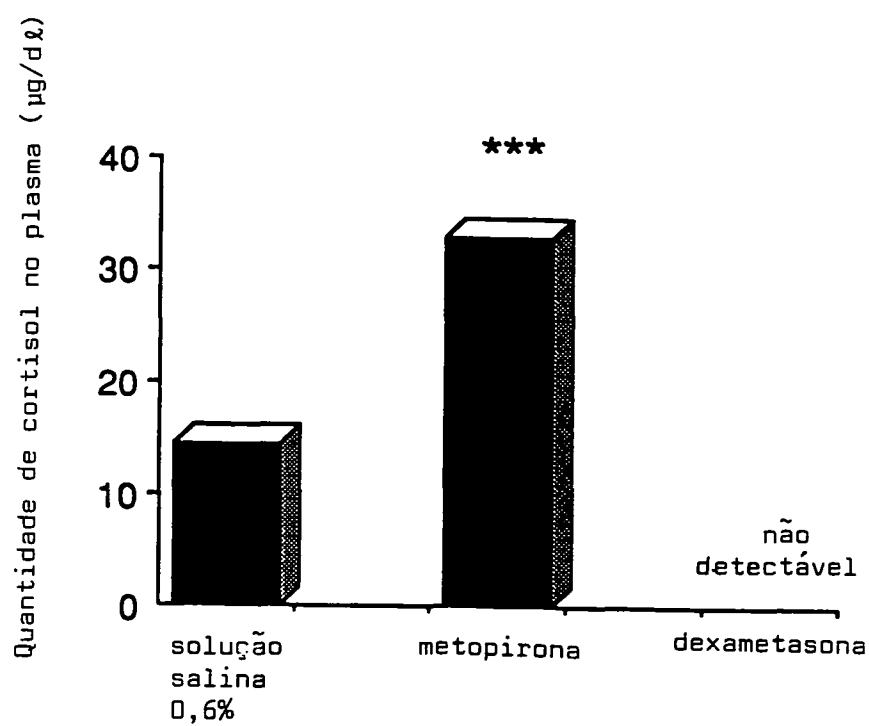


Figura 55. Nível médio de corticóide no plasma sanguíneo dos *C. auratus* tratados com solução salina 0,6% (grupo "A") metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C").

Estes dados indicam que a metopirona e a dexametasona administradas conforme protocolo deste experimento foram capazes de manipular, por sua atividade biológica, o estado adrenocortical da população de *C. auratus*, do experimento.

5 DISCUSSÃO

Entre os peixes utilizados para investigação endócrina, preferem-se aqueles de fácil obtenção e com melhor adaptação em cativeiro. O *Carassius auratus* (L.), vulgarmente conhecido como peixe dourado ("goldfish"), é um dos exemplares mais investigados quanto à regulação neuroendócrina e à neurofisiologia.

Os achados dos estudos imunocitoquímicos e neuroendócrinos realizados em *C. auratus* (FRYER, 1981, 1989; FRYER & BOUDREAULT-CHÂTEAUVERT, 1981; FRYER *et alii*, 1984, 1985a, 1985b; FRYER & LEUNG, 1982), revelaram semelhança com os resultados obtidos em pesquisas feitas no *Catostomus commersoni* (FISHER *et alii*, 1984; KOBAYASHI *et alii*, 1986a; LEDERIS *et alii*, 1982; McMASTER & LEDERIS, 1983, 1988; YULIS & LEDERIS, 1987). Porém a dificuldade da obtenção do *C. commersoni* e sua relutância em alimentar-se no cativeiro orientaram a escolha do *C. auratus* nesta investigação.

5.1 ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA NEUROSSECRETOR CAUDAL

MIMURA *et alii* (1985), estudando a medula espinhal de *Prochilodus affinis* e de *P. margravii*, comenta que a mesma é

achatada ventralmente, tendo o aspecto estrangulado anteriormente à urófise (*P. affinis*), ou uniforme (*P. margravii*). Mais adiante, afirma que a medula espinhal é branco-leitosa quando fixada e branco-azulada *in vivo*, e que a urófise está alojada na fossa urofisária.

O *Carassius auratus*, objeto de pesquisa neste experimento, apresenta a porção caudal da medula espinhal muito semelhante à das espécies estudadas pelos autores anteriormente citados, porém a coloração *in vivo* é branco-leitosa.

BERN & LEDERIS (1969, 1978), KOBAYASHI et alii (1985 a, 1986b), YAMADA et alii (1985), YULIS et alii (1986), entre outros, utilizaram a técnica imunocitoquímica peroxidase-anti-peroxidase (PAP) para observação de células neurosecretores imunorreativos do sistema neurosecretor caudal de peixes teleósteos. Neste experimento usou-se com sucesso, na busca de resultados semelhantes, a técnica complexo avidina-biotina (ABC), utilizando os anti-soros específicos urotensina I (UI) e urotensina II (UII).

Entre os autores consultados, não se encontraram referências detalhadas à morfologia das células Dahlgren, nem ao aspecto de sua "coloração" após reação imunocitoquímica, com técnicas semelhantes às descritas nesta pesquisa.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a presença do sistema neurosecretor caudal em teleósteos, constituído por neurônios secretores (células Dahlgren) da medula espinhal, e a urófise, órgão de produção, armazenamento e secreção de neuro-hormônios, pesquisados anterior-

mente por ARNT *et alii* (1990), ARSAKI (1813), BERN (1969), BERN & LEDERIS (1978), DAHLGREN (1914), FISHER *et alii* (1984), FRIEDBERG & BERN (1968), KOBAYASHI *et alii* (1986b), KRIEBEL *et alii* (1979), LEDERIS *et alii* (1974), MIMURA (1978, 1985), YAMAMOTO (1979), YULIS & LEDERIS (1986a, 1986b, 1988b), YULIS *et alii* (1986c).

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS À UROTENSINA I E À UROTENSINA II

Os 36 exemplares de *C. auratus* foram tratados com fármacos para investigação de seus efeitos biológicos sobre as células neurosecretoras imunorreativas à UI e à UII. Para isso, usaram-se injeções de solução salina 0,6% (grupo "A", controle), metopirona (grupo "B") e dexametasona (grupo "C").

As reações imunocitoquímicas para verificação dos neurônios imunorreativos à UI da região caudal da medula espinhal dos peixes tratados com solução salina 0,6% permitiram demonstrar que eles estão dispostos em dois grupos celulares parassagitais, que se estendem até a urófise, confirmando os achados de YULIS *et alii* (1986c), realizados no "white sucker" (*Catostomus commersoni*), sem tratamento prévio.

FRYER & LEDERIS (1988) realizaram estudos imunocitoquímicos e morfométricos no hipotálamo de *C. auratus* tratado com solução salina 0,6%, onde constataram a presença de magno e parvocélulas. No presente trabalho, foram identifica-

das, através de técnicas imunocitoquímicas e de análise morfológica, diferentes populações de neurônios, no sistema neurosecretor caudal.

De acordo com o tamanho e a forma, foi possível reconhecer dois tipos de células neurosecretoras de urotensina I-imunorreativa (UI-ir), parvocélulas e magnocélulas, distribuídas na porção caudal da medula espinhal e na urófise. Pôde-se observar intensa rede capilar nas regiões mais densamente povoadas com células neurosecretoras, além de rica vascularização junto à urófise, coincidindo, em todos os aspectos, com as observações de vários autores, entre eles: ARNT *et alii* (1990), em *C. auratus*; FISHER *et alii* (1984), em *C. commersoni*, HONMA & TAMURA (1967); em *Salvelinus leucamaenis*; ICHIKAWA *et alii* (1988), em *Cyprinus carpio*.

BERN *et alii* (1985), LEDERIS (1984), LEDERIS *et alii* (1974, 1985a, 1985b) encontraram no *C. commersoni*, parvo e magnocélulas exibindo processos lisos ou em forma de rosário, entre os quais existiam gotículas de aspecto coloidal, que não apresentavam imunocoloração. No presente experimento, foram observadas, além de processos lisos ou em forma de rosário, fibras imunorreativas à UI espalhadas ao longo da medula espinhal e na urófise.

Nesta pesquisa estudou-se, também, a localização dos neurônios secretores de urotensina II-imunorreativa (UII-ir). Valendo-se das mesmas técnicas imunocitoquímicas e morfológicas utilizadas para observação das células Dahlgren que secretam UI-ir, foram identificadas três populações de célu-

las neurosecretoras imunorreativas. Estes achados são muito semelhantes aos obtidos por YULIS *et alii* (1986c), no *C. commersoni*, contudo diferem das conclusões de OWADA *et alii* (1985b) que negam a presença de neurônios imunorreativos à UII, localizados anteriormente ao sistema neurosecretor caudal de nove espécies de peixes teleósteos, inclusive do *C. auratus*. A discrepância fundamental pode ser devida a procedimentos metodológicos ou características do anti-soro UII utilizado.

Na presente investigação foi observada a ocorrência de axônios oriundos de neurônios grandes e de tamanho intermediário, imunorreativos à UII, projetando-se em direção à urófise, até atingi-la. Outros axônios das células neurosecretoras pequenas, imunorreativas à UII, de trajeto oblíquo, que se aproximam do canal central sem, entretanto, atingi-lo, dirigem-se também à urófise.

Coincidindo com os resultados de outros pesquisadores, como LEDERIS & YULIS (1987), YULIS & LEDERIS (1986b, 1988b), foram encontradas neste trabalho células Dahlgren parvo e magnocelulares imunorreativas à UII, com ramificações dendríticas, que, projetando-se para dentro do canal central, terminavam em contato direto com o fluido cerebrospinal. Nos *C. auratus* estudados, as ramificações apresentaram em sua porção terminal um pequeno bulbo que amplia a superfície de contacto com o líquido cerebrospinal. Estes resultados diferem dos obtidos por YULIS & LEDERIS (1988a), no *C. commersoni* e no *Oncorhynchus kisutch*. Os autores referem-se às termina-

ções dendríticas que contactam o fluido cerebrospinal, apresentando formas em haste, parcialmente bulbar, ou em cabeleira. Essas terminações são mais proeminentes e visíveis nos peixes de água doce, segundo trabalho realizado por OWADA *et alii* (1985a).

Diferentes estudos, realizados por FRYER (1981), FRYER & BOUDREAULT-CHÂTEAUVERT (1981), FRYER *et alii* (1983, 1984), FRYER & LEUNG (1982), demonstraram que o estresse, de qualquer origem, aumenta o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) secretado pela hipófise anterior. Como a secreção do principal glicocorticóide das secreções adrenocorticais, o cortisol, é controlada pelo ACTH, a resposta ao estresse terá como consequência um aumento deste glicocorticóide.

As respostas dos hormônios adrenocorticotrópicos e glicocorticóides ao estresse são proporcionais ao estímulo (injeções de drogas, choque elétrico, hemorragia e outros), podendo ser avaliadas pelas concentrações do ACTH ou do cortisol no plasma sanguíneo, conforme resultados obtidos por BALL *et alii* (1971) no *Anguilla anguilla*, FRYER (1981), FRYER & BOUDREAULT-CHÂTEAUVERT (1981), FRYER *et alii* (1984), FRYER & MALER (1982), no *C. auratus*.

A maioria das condições que causam elevação dos níveis de secreção de ACTH provocam-na, através de sinais que se iniciam em centros hipotalâmicos e são transmitidos à hipófise anterior pelo hormônio liberador de corticotropina (HLC), segundo MOORE (1986). Por sua vez, afirma o autor, a secreção do cortisol, também conhecido como corticotropina ou adrenocorticotropina, é controlada quase que inteiramente

pelo ACTH secretado pela hipófise anterior.

Segundo experimentos de REBAR (1986), algumas drogas, injetadas no homem, influenciam a secreção do ACTH, através de uma ação direta na atividade adrenocortical, como, por exemplo, a inibição da 11- β -hidroxilase pela metopirona. A metopirona, bloqueando a 11- β -hidroxilação, oposta a síntese do cortisol e dos corticosteróides, influencia a secreção do ACTH. Em indivíduos normais, a diminuição do nível de cortisol estimula o aumento da secreção do ACTH. Como a metopirona é um bloqueador enzimático relativamente fraco, doses elevadas devem ser dadas, a intervalos freqüentes, para produzir bloqueio.

Nos mecanismos do estresse fisiológico sobre a secreção do ACTH, o cortisol desempenha um mecanismo regulador. Imediatamente após o estímulo estressante, ocorre um aumento do ACTH, seguido de grandes quantidades de glicocorticóides no sangue. O cortisol desempenha, a partir de então, um papel inibidor sobre o hipotálamo e a hipófise anterior, causando a diminuição da secreção do ACTH. Os efeitos reguladores produzidos pelo cortisol elevado estão ligados a mecanismos de realimentação negativa direta sobre o hipotálamo, diminuindo a formação do HLC, e sobre a glândula hipofisária anterior, para diminuir a formação do ACTH. Estes mecanismos de realimentação também contribuem para regular a concentração de cortisol no plasma.

Aproveitando esses princípios farmacológicos e fisiológicos, foram aplicadas injeções de metopirona, em um grupo de doze espécimens de *C. auratus*. As células Dahlgren do

sistema neurosecretor caudal dos peixes em estudo, preparadas por técnicas imunocitoquímicas, foram analisadas através de microscopia óptica, e as áreas das superfícies celulares e nucleares medidas pela morfometria, para verificação de possíveis alterações nesses neurônios, causadas pela aplicação da droga. As áreas celulares e nucleares dos neurônios imunorreativos à UI e UII apresentaram-se significativamente menores, quando comparadas às dos peixes tratados com solução salina 0,6% (grupo controle). Por outro lado, aumento não significativo das áreas celulares e nucleares dos neurônios imunorreativos à UII que contactam o fluido cerebrospinal foi observado. Um aumento na intensidade da imunorreação das células Dahlgren que secretam UI-ir também foi visualizado.

Estas observações sugerem que o metabolismo e a consequente atividade secretora dos neurônios que elaboram, armazenam e secretam UI e UII no sistema neurosecretor caudal dos teleósteos são influenciados pelos hormônios adrenocorticais e adrenocorticotrópicos (ACTH). Os primeiros estudos realizados por FRYER & LEDERIS (1985) e FRYER *et alii* (1983) em *C. auratus*, demonstraram que a UI pode afetar a liberação do ACTH da hipófise desses peixes. A possibilidade de que a UI, de origem urofiseal, possa estar envolvida na regulação funcional do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos peixes teleósteos foi sugerida, mais diretamente, pelos resultados obtidos após uma urofisectomia realizada em *C. auratus*, por WOO *et alii* (1985). Com a retirada da urófise, o conteúdo

do ACTH hipofisário e os níveis de cortisol circulantes aumentaram, bem como o conteúdo da UI no hipotálamo. Estes dados sugerem que a remoção da urófise, pela urofisectomia, pode trazer aumento compensatório da secreção de UI e, talvez também, do HLC, pelo hipotálamo. Nestes conceitos estão baseadas as observações de um aumento marcante no número de neurônios imunorreativos a UI, após urofisectomia, em experimentos realizados no hipotálamo de "sucker" (*C. commersoni*), por YULIS & LEDERIS (1986a).

A "adrenalectomia farmacológica" com metopirona foi utilizada em investigações de ARNT *et alii* (1990), FRYER & BOUDREAULT-CHÂTEAUVERT (1981), FRYER & LEDERIS (1985, 1988), FRYER *et alii* (1983).

Para FRYER & LEUNG (1982), os corticosteróides sintéticos dexametasona e β -metasona suprimem a secreção endógena do ACTH através de sua ação a nível hipotalâmico e hipofisário. Estes autores observaram que a dexametasona, um glicocorticóide que atua sobre o ACTH, inibe a secreção exógena do ACTH no *C. auratus* e bloqueia o aumento desse hormônio, induzido pelo estresse. Os pesquisadores demonstraram, ainda, que no bloqueio da liberação do ACTH, induzido pelo estresse, a dexametasona atua suprimindo o HLC, o qual é estruturalmente homólogo aos peptídeos neuro-hipofisários e ao peptídio UI.

REBAR (1986) comenta que, em indivíduos humanos normais, a dexametasona, como glicocorticóide, inibe a secreção do ACTH hipofisário através de um efeito "feedback" ne-

gativo dos corticosteróides no hipotálamo e na glândula hipofisária.

FRYER *et alii* (1985b) demonstraram que alguns peptídeos naturais do **nucleus preopticus** de **C. auratus**, como arginina vasotocina e isotocina, e o peptídeo neuro-hipofisário de mamíferos, arginina vasopressina, injetados no **C. auratus**, estimulam a secreção do cortisol nesse peixe cuja atividade secretora endógena de ACTH estava bloqueada pela dexametasona. Os autores demonstraram que os peptídeos neuro-hipofisários estimulam a secreção do cortisol no **C. auratus** e sugeriram que, em teleósteos, a arginina vasotocina e a isotocina possuem atividade sobre o HLC.

A capacidade da droga em estimular a secreção do ACTH em animais bloqueados pela β -metasona ou pela dexametasona é extensivamente usada como teste, *in vivo*, da ação do HLC em mamíferos e em teleósteos.

No presente experimento, após injetar dexametasona em um grupo de doze **C. auratus**, observou-se, à microscopia óptica, que os neurônios secretores de UI, preparados com técnicas imunocitoquímicas, mostraram diminuição na intensidade da imunorreação, quando comparados ao grupo controle. A morfometria desses neurônios e das células neurosecretores de UII que contactam o fluido cerebrospinal revelou aumento significativo de suas áreas celulares e nucleares, quando comparadas com o grupo testemunha.

Aumento não significativo foi observado nas áreas celulares e nucleares das células Dahlgren imunorreativas à UII

que não contactam o fluido cerebrospinal. Esses resultados sugerem que a inibição da secreção hipotalâmica de UI e, talvez, de UII pode ter induzido uma secreção compensatória de UI por parte do sistema neurosecretor caudal, como consequência da administração de dexametasona. Este pressuposto é reforçado pelos resultados de outros autores, que demonstraram que, após a administração de metopirona, um potente estimulador da secreção do ACTH, e do HLC do *C. auratus* (FRYER BOUDREAULT-CHÂTEAUBERT, 1981) e, talvez, da UI hipotalâmica, resultam na diminuição da secreção de UI pelo sistema neurosecretor caudal (FRYER & LEUNG, 1982).

A transferência de peixes da água doce para a água salgada, nos trabalhos de FORREST *et alii* (1973) foi acompanhada por aumento da secreção do hormônio adrenocorticoesteróide, que, provavelmente, promove a adaptação à água do mar. O papel da UI e da UII na osmorregulação é descrito em várias outras pesquisas (BALDISSEROTTO *et alii*, 1987; BERN *et alii*, 1985; LEDERIS, 1984; LEDERIS *et alii*, 1974, 1985a, 1985b).

FRYER & LEDERIS (1985, 1988) e FRYER *et alii* (1983) admitem a possibilidade de que as alterações na atividade secretora dos neurônios que sintetizam UI e UII podem refletir distúrbios induzidos na osmorregulação dos peixes teleosteos, provocados pela administração de metopirona e dexametasona.

Seguramente, mais pesquisas deverão ser desenvolvidas a fim de esclarecer a influência do estado cortical (adrenocorticotrópico-adrenocortical) nas secreções de UI e UII pe-

las células da medula espinhal, da urófise e do eixo hipotálamo-hipofisário.

5.3 TESTE DE CO-LOCALIZAÇÃO

Os resultados de vários experimentos demonstraram a possibilidade da existência de mais de um antígeno em uma mesma célula (BERN *et alii*, 1985; ICHIKAWA *et alii*, 1988; LARSON *et alii*, 1986; ONSTOT & ELDE, 1986a, 1986b; YAMADA *et alii*, 1985; YULIS & LEDERIS, 1987). Através de reações imunocitoquímicas, foi confirmado neste experimento que, em um mesmo neurônio ocorre a presença de antígenos diferentes. A comprovação deste fato foi evidenciada nas células neurosecretoras imunorreativas dos peixes do grupo controle. Experimentalmente, a co-localização admitida para os peptídios foi comprovada, utilizando-se imunorreações em cortes seriados, semifinos, adjacentes, dispostos de maneira seqüencial, conforme metodologia de VANDESANDE (1982).

5.4 TESTE DE ESPECIFICIDADE

A capacidade do sistema imunológico dos vertebrados em produzir anticorpos que reagem à ação de uma substância antigênica estranha, com uma ordem quase infinita de ligações específicas, permitiu que, através da imunocitoquímica, fossem desvendadas incógnitas da neurobiologia.

A distribuição imunocitoquímica de UI nas células do sistema neurosecretor caudal dos teleósteos foi observada por ARNT *et alii*, 1990; BERN *et alii*, 1985; FISHER *et alii*, 1984; LEDERIS, 1984; LEDERIS *et alii*, 1974, 1985a, 1985b, confirmando a presença de neurônios secretores na porção caudal da medula espinhal, descrita por DAHLGREN (1914) e SPEIDEL (1919, 1922). A evidência indireta da localização da UI nas células da medula espinhal caudal e na urófise foi obtida por ONSTOTT & ELDE (1984), usando o anti-soro HLC que fez reação cruzada com a UI.

A UI, segundo LEDERIS & YULIS (1987), tem estrutura similar biologicamente análoga ao HLC dos mamíferos. A ocorrência e a especificidade da UI e do HLC-imunorreativos foram estudadas no *C. commersoni*, por LEDERIS *et alii* (1987). Para os autores, os cortes da região caudal da medula espinhal, ao reagirem com os anti-soros específicos UI e HLC, revelaram que ambos os tipos de anti-soros são capazes de corar as mesmas estruturas do peixe pesquisado. Isto confirma que os dois peptídios têm ações antigênicas semelhantes.

Testes de especificidade similares ao acima citado foram realizados por LEDERIS *et alii* (1985b), YAMADA *et alii* (1985), YULIS *et alii* (1986c), utilizando outras técnicas, em diferentes teleósteos. A especificidade da reação imunológica pode ser obtida neutralizando-se, *in vitro*, as propriedades antigênicas dos peptídios, antes de reagirem sobre o antígeno existente no corte histológico. Isto feito em nosso experimento, verificou-se que a UI (peptídio), neutralizada *in*

vitro com o anti-soro UI, não apresentou reação, ao ser aplicada sobre os cortes histológicos, cujas células continham UI. Por outro lado, o uso do peptídio homólogo HLC, bloqueado **in vitro** com o anti-soro UI, quando gotejado sobre as células neurosecretoras portadoras do peptídio UI, revelou imunorreatividade nestas células, coincidindo com os resultados de LEDERIS *et alii* (1985b, 1987), no *C. commersoni*.

O primeiro dos princípios urofisários bem caracterizados biologicamente, e seqüenciado, foi a UII (ICHIKAWA *et alii*, 1988; McMASTER *et alii*, 1986; McMASTER & LEDERIS, 1983; MUNEKATA *et alii*, 1981).

A UII, dodecapeptídio isolado e seqüenciado da urófise de *Gillichthys mirabilis*, *Cyprinus carpio* e *C. commersoni*, é parcialmente homóloga e análoga à somatostatina-14.

Para localizar a UII no sistema neurosecretor caudal de algumas espécies de peixes ósseos, OWADA *et alii* (1985b) usaram anti-soro gerado contra a UII sintética do *Gillichthys mirabilis*.

No presente experimento, foi encontrado o peptídio UII-ir em células do sistema neurosecretor caudal do *C. auratus*. Ao buscar-se a especificidade nos neurônios secretores de UII da porção caudal da medula espinhal e da urófise, foi realizado teste **in vitro**, com um peptídio heterólogo (somatostatina).

A reação **in vitro**, entre a UII (peptídio) e a UII (anti-soro), foi completa, não sendo possível observar imunoreação nos tecidos imunotratados com esta solução. A rea-

ção *in vitro*, entre a somatostatina (peptídio) e a UII (anti-soro) não foi completa, razão por que a solução obtida *in vitro*, quando levada a reagir com o antígeno UII dos cortes histológicos, apresentou imunorreatividade. É importante destacar que a somatostatina e a UII, apesar de sua similaridade, diferem em importantes aspectos. O pequeno número de amostras estudadas neste experimento não permitiu encontrar resultados conclusivos nestes testes de especificidade. As investigações de especificidade, localização e analogia com outros peptídios, desenvolvidas por McMASTER *et alii* (1986), McMASTER & LEDERIS (1983) e YULIS & LEDERIS (1988a), admitem a presença de dois sistemas imunorreativos, a UII-ir e a somatostatina-imunorreativa, aparentemente interligados.

A utilização da imunocitoquímica em pesquisas, como instrumento para estudar a localização de um peptídio e esclarecer sua presença ou ausência, conduziu a caminhos que levaram à descoberta de um número sem precedentes de ligações, inter-relações, funções e secreções de células e seus anexos e tecidos em diferentes órgãos ou sistemas, especialmente no sistema nervoso. O advento dos anticorpos monoclonais expandiu as possibilidades de produzir preparações imunocitoquímicas. Em todas as técnicas, a otimização de cada etapa e a escolha dos agentes, corantes ou drogas, são importantes para tornar o melhor possível o resultado obtido com a metodologia empregada.

5.5 RADIOIMUNOENSAIO

Após as injeções de metopirona, observou-se, nesta investigação, que os níveis de cortisol no plasma sanguíneo, medidos por radioimunoensaio com ^{125}I , elevaram-se significativamente, quando comparados com os níveis de cortisol plasmático, do grupo controle. A metopirona, sendo um inibidor da 11- β -hidroxilase, impede a síntese do cortisol e da corticosterona, resultando em uma acumulação de 11-desoxicortisol no plasma sanguíneo.

Estes resultados são semelhantes aos achados de FRYER *et alii* (1984), que, em investigações *in vivo* no *C. auratus*, usando implantes de cortisol no **nucleus preopticus**, bloquearam o estresse induzido, elevando o nível de cortisol no plasma sanguíneo. Nestes mesmos experimentos, os resultados demonstraram que o estresse, ou a administração de metopirona, resultava em uma ativação dos neurônios do **nucleus preopticus**.

Para FRYER *et alii* (1985b), os peptídios neuro-hipofisários de teleosteos, a arginina vasotocina e a isotocina produzem aumentos do cortisol plasmático, mais rápido que o peptídio de mamíferos, a arginina vasopressina.

Vários pesquisadores utilizaram a dexametasona, com a finalidade de alterar a secreção do ACTH, em diferentes animais (ARNT *et alii*, 1990; CARNES *et alii*, 1987; FRYER *et alii*, 1983). A dexametasona causou baixas significativas nos níveis de ACTH periférico medidos no plasma sanguíneo de rato, após quatro dias de tratamento (CARNES *et alii*, 1987). Neste

experimento, realizado no *C. auratus*, foi medido o nível de cortisol plasmático através do radioimunoensaio com ^{125}I , após injeções diárias de dexametasona. O nível do cortisol no plasma sanguíneo dos peixes tratados com esta droga apresentou-se muito baixo e não foi detectado em alguns exemplares.

A ativação do eixo hipofisário inter-renal dos teleosteos ocorre em resposta a uma vasta gama de agentes estressantes (PETER & FRYER, s.d.). Agentes estressantes não específicos, choque elétrico, choque térmico ou abruptas variações na salinidade resultaram em alterações neurosecretores do sistema neuro-hipofisário da enguia (*Anguilla anguilla*) (FORREST et alii, 1973). Estímulos elétricos na porção ventral do hipotálamo de teleosteos, realizados por PETER & FRYER, s.d.), mostraram um aumento do cortisol no plasma sanguíneo.

Os pesquisadores têm procurado definir o papel do sistema neurosecretor caudal e dos produtos secretados no sistema endócrino dos peixes, relacionando-os com a função fisiológica de cada um dos peptídios que integram o sistema. Até hoje, porém, pouco foi esclarecido, o que justifica que as pesquisas se multipliquem, para que se possa entender tão importantes mecanismos reguladores neuroendócrinos e neurofisiológicos.

CONCLUSÕES

1. Em relação ao tamanho das células Dahlgren:
 - a) Neurônios imunorreativos à urotensina I:
Duas populações { Pericários parvocelulares
 { Pericários magnocelulares
 - b) Neurônios imunorreativos à urotensina II:
Três populações { Pericários pequenos
 { Pericários médios
 { Pericários grandes
 - c) Neurônios imunorreativos à urotensina II que contactam o fluido cerebrospinal:
Duas populações { Pericários parvocelulares
 { Pericários magnocelulares
2. A maioria dos pericários neurosecretores da medula espinhal caudal do *Carassius auratus* são imunorreativos à urotensina I e à urotensina II. É possível que todas as células Dahlgren sintetizem os peptídeos urotensina I e urotensina II. As diferenças de imunoreatividade podem refletir diferentes estados de atividade celular.
3. Os resultados obtidos demonstram que os hormônios adrenocorticosteróides influenciam a atividade secretora do sistema neurosecretor caudal de *Carassius auratus*

6 APÊNDICE

1 **Fixador Bouin**

- 15 partes de ácido pícrico saturado;
- 5 partes de formaldeído;
- 1 parte de ácido acético.

2 **Gelatina**

- 0,5 g de gelatina;
- 50 mg de sulfato de cromo e potássio;
- 100 ml de água destilada.

Aquecer à temperatura de 55°C; filtrar em filtro Fisher, número 5.

3 **Solução salina tamponada com fosfato (PBS)**

- 1 l de água destilada;
- 1,15 g de fosfato monobásico de sódio;
- 0,26 g de fosfato dibásico de sódio;
- 8 g de cloreto de sódio;
- 0,2 g de cloreto de potássio.

4 **Tampão Tris (TRIS) 50 mM**

- 2 l de água destilada;
- 15,16 g de Trizma 7,4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AHERNE, W.A. & DUNNILL, M.S. **Morphometry**. London, Edward Arnold, 1987. 205 p.
- 2 ARNT, L.R.G.; FRYER, J.N.; LEDERIS, K. Effect of corticoid status on urotensin I- and urotensin II-immunoreactive neurons in the goldfish spinal cord. No prelo, *Cell and Tissue Research*, 1990.
- 3 ARSAKY, A. De piscium cerebro et medulla spinali. **Dissertatio inauguralis**, Halae, 1813. n.p.
- 4 BAKER, B.I. The evolution of ACTH, MSH, and LPH structure, function, and development. In: BARRINGTON, E.J.W., ed. **Hormones and Evolution**. New York, Academic Press, 1979. p.643-722.
- 5 BAKER, B.I.; BIRD, D.J.; BUCKINGHAM, J.C. Salmonid melanin-concentrating hormone inhibits corticotropin release. *J.Endocrinol.*, 106:R5-8, 1985.
- 6 BAKER, B.I. & RANCE, T.R. Effect of background colour on plasma cortisol levels in teleosts. *J.Endocrinol.*, 81:166-7, 1978.
- 7 BALDISSETOTTO, B.; GRAU, E.G.; MIMURA, O.M.; SALOMÃO, L.C.; NISHIOKA, R.S. Urophyseal control of plasma ionic and osmotic concentrations in the tilapia, **Oreochromis mossambicus**, transferred from freshwater to brackish water. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 14., Juiz de Fora, 1987. **Resumos**. Universidade Federal de Juiz de Fora, 1987. p.119.
- 8 BALDISSETOTTO, B.; NIMURA, O.M.; MARTINS, A.F.; RAKOSKI, R.J.; FERNANDES, C.S. Ação do sistema neuro-secretor caudal no transporte de água no intestino e vesícula biliar de **Hoplias malabaricus**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 17., Londrina, 1990. **Resumos**. Universidade Estadual de Londrina, 1990. p.297.
- 9 BALL, J.N.; CHESTER JONES, I.; FORSTER, M.E.; HAWKINS, E.F.; HARGREAVES, G.; MILNE, K.P. Measurement of plasma cortisol levels in the eel **Anguilla anguilla** in relation to osmotic adjustments. *J.Endocrinol.*, 50:73-96, 1971.

- 10 BENNETT, M.V.L. & FOX, S. Eletrophysiology of caudal neurosecretory cells in the skate and fluke. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 2:77-95, 1962.
- 11 BERN, H.A. Urophysis and caudal neurosecretory sistem. In: HOAR, W.S. & RANDALL, D.J., eds. **Fish Physiology**. New York, Academic Press, 1969. v.2, p.399-418.
- 12 BERN, H.A.; GUNTHER, R.; JOHNSON, D.W.; NISHIOKA, R.S. Occurrence of urotensin II (bladder-contracting activity) in the caudal spinal cord of anamniote vertebrates. **Acta Zool.**, 54:15-9, 1973.
- 13 BERN, H.A. & LEDERIS, K. A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. **J. Endocrinol.**, 45: xi-xii, 1969. Resumo.
- 14 _____. The caudal neurosecretory system of fishes in 1976. In: BARGMANN, W.; OKSCHE, A.; POLENOV, A.; SCHARRER, B., eds. **Neurosecretion and neuroendocrine activity: evolution, structure and function**. Berlin, Springer-Verlag, 1978. p.341-9.
- 15 BERN, H.A.; NISHIOKA, R.S.; CHESTER, J.; CHAN, D.K.O.; RANKIN, J.C.; PONNIAH, S. The urophysis of teleost fish. **J. Endocrinol.**, 37:xl-xli, 1967. Resumo.
- 16 BERN, H.A.; PEARSON, D.; LARSON, B.A.; NISHIOKA, R.S. Neurohormones from fish tails - the caudal neurosecretory system. In: GREEP, R.O., ed. **Recent progress in hormone research**. Orlando, Academic Press, 1985. v.41, p.533-51.
- 17 BURTON, M. & BURTON, R. Goldfish. In: _____. **Encyclopedia of fish**. New York, BPC Publishers, 1984. p.90-1.
- 18 CAMARGO, M.L.Z. **Guia de técnicas citológicas e histológicas**. Curitiba, 1979. 20 p. Datilografado.
- 19 CARNES, M.; BARKSDALE, C.M.; KALIN, N.H.; BROWNFIELD, M.S.; LENT, S.J. Effects of dexamethasone on central and peripheral ACTH systems in the rat. **Neuroendocrinology**, 45:160-4, 1987.
- 20 CASSELMAN, W.G.B. **Histochemical technique**. London, Methuen, 1959. 205 p.
- 21 CLEMENTE, E. Crise da pesquisa na Universidade. **Zero Hora**, Porto Alegre, 12 ago.1984. p.3, c.1.
- 22 COHEN, S.L. & KRIEBEL, R.M. Brainstem location of serotonin neurons projecting to the caudal neurosecretory complex. **Brain Res. Bull.**, 22:481-7, 1989.
- 23 COONS, A.A.; CREECH, H.J.; JONES, R.N.; BERLINER, E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. **J. Immunol.**, 45: 159-70, 1942.

- 24 CUELLO, A.C.; MILSTEIN, C.; GALFRÉ, G. Preparation and application of monoclonal antibodies for immunohistochemistry and immunocytochemistry. In: CUELLO, A.C., ed. **Immunohistochemistry**, Chichester, John Wiley, 1982. p.215-56. (IBRO Handbook Series: Methods in the Neurosciences. v.3).
- 25 DAHLGREN, U. The electric motor nerve centers in the skates (Rajidae). **Science**, 40:862-3, 1914.
- 26 DI FIORE, M.S.H.; MANCINI, R.E.; DE ROBERTIS, E.D.P. **Novo atlas de histologia** - microscopia óptica, histológica e microscopia eletrônica. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. 335 p.
- 27 DIXON, W.J. & MASSEY Jr., F.J. **Introduction to statistical analysis**. 2.ed. New York, McGraw-Hill, 1957. 488 p.
- 28 ENAMI, M. Studies in neurosecretion. II. Caudal neurosecretory system in the eel (*Anguilla japonica*). **Gunma J.Med.Sci.**, 4:23-36, 1955.
- 29 _____. In: GORBMAN, A., ed. **Comparative endocrinology**. New York, Wiley, 1959. p.697-724.
- 30 EVANS, A. Peixes vermelhos. In: _____. **ABC do aquário**. Lisboa, Presença, 1984. p.97-108. (Coleção Cultura e Tempos Livres).
- 31 FALKMER, S.; EL-SALHY, M.; TITLBACH, M. Evolution of the neuroendocrine system in vertebrates. In: FALKMER, S.; HÄKANSON, R.; SUNDLER, F., eds. **Evolution and tumour pathology of the neuroendocrine system**. Amsterdam, Elsevier, 1984. p.59-84.
- 32 FAVARO, G. Contributi allo studio morfologico dell'ipofisi caudale (rigonfiamento caudale della midolla spinale) dei teleostei. **Atti Accad.Naz.Lincei, Cl. Sci.Fis.,Mat.Nat., Mem**, 1:30-72, 1925.
- 33 FISHER, A.W.F.; WONG, K.; GILL, V.; LEDERIS, K. Immunocytochemical localization of urotensin I neurons in the caudal neurosecretory system of the white sucker (*Catostomus commersoni*). **Cell Tissue Res.**, 235:19-23, 1984.
- 34 FORREST, J.N.; MacKAY, W.C.; GALLAGHER, B.; EPSTEIN, F.H. Plasma cortisol response to saltwater adaptation in the American eel, *Anguilla rostrata*. **Am.J.Physiol.**, 224:714-20, 1973.
- 35 FRIDBERG, G. Studies on the caudal neurosecretory system in teleosts. **Acta Zool.**, Stockholm, 43:1-77, 1962.
- 36 _____. **Morphological studies on the caudal neurosecretory system in teleosts and elasmobranchs**. Stockholm, Åke Nyblom, 1963. p.1-20.
- 37 FRIDBERG, G. & BERN, H.A. The urophysis and the caudal neurosecretory system of fishes. **Biol.Rev.Cambridge Philosophic Soc.**, 43:175-99, 1968.

- 38 FRIDBERG, G.; NISHIOKA, R.S.; BERN, H.A.; FLEMING, W.R.
Regeneration of the caudal neurosecretory system in
the cichlid teleost *Tilapia mossambica*. *J.Exp.Zool.*,
162:311-35, 1966.
- 39 FRYER, J.N. Hypothalamic lesions stimulating growth
hormone cell activity in the goldfish. *Cell Tissue
Res.*, 214:387-95, 1981.
- 40 _____. Neuropeptides regulating the activity of gold-
fish corticotropes and melanotropes. *Fish Physiol.
and Biochem.*, 7:21-7, 1989.
- 41 FRYER, J.N. & BOUDREAULT-CHÂTEAUVERT, C. Cytological
evidence for activation of neuroendocrine cells in
the parvocellular preoptic nucleus of the goldfish
hypothalamus following pharmacological adrenalectomy.
Cell Tissue Res., 218:129-40, 1981.
- 42 FRYER, J.N.; BOUDREAULT-CHÂTEAUVERT, C.; KIRBY, R.P.
Pituitary afferents originating in the paraventricu-
lar organ (PVO) of the goldfish hypothalamus. *J.Comp.
Neurol.*, 242:475-84, 1985a.
- 43 FRYER, J.N. & LEDERIS, K. Urotensin I and corticotropin
secretion: comparative actions in fishes and mammals.
In: KOBAYASHI, H., ed. *Neurosecretion and the biolo-
gy of neuropeptides*. Tokyo, Japan Sci.Soc., 1985.
p.464-70.
- 44 _____. Comparison of actions of posterior pituitary
hormones in corticotropin secretion in mammals and
fishes. In: YOSHIDA, S. & SHARE, L., eds. *Recent pro-
gress in posterior pituitary hormones*. Amsterdam,
Elsevier Science, 1988. p.337-44.
- 45 FRYER, J.; LEDERIS, K.; RIVIER, J. Urotensin I, a CRF-
like neuropeptide, stimulates ACTH release from the
teleost pituitary. *Endocrinology*, 113:2308-10, 1983.
- 46 _____. Cortisol inhibits the ACTH-releasing activity of
urotensin I, CRF and sauvagine observed with superfused
goldfish pituitary cells. *Peptides*, 5:925-30, 1984.
- 47 _____. ACTH-releasing activity of urotensin I and ovine
CRF: interactions with arginine vasotocin, isotocin
and arginine vasopressin. *Regul. Pept.*, 11:11-5,
1985b.
- 48 FRYER, J.N. & LEUNG, E. Neurohypophysial hormonal con-
trol of cortisol secretion in the teleost *Carassius
auratus*. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 48:425-31, 1982.
- 49 FRYER, J. & MALER, L. Enhanced uptake of HRP by hypo-
physiotropic neurons following stress and adrenalect-
omy. *Brain Res.*, 242:179-83, 1982.
- 50 FRYER, J.N.; NISHIOKA, R.S.; BERN, H.A. Somatostatin
inhibition of teleost growth hormone secretion. *Gen.
Comp.Endocrinol.*, 39:244-6, 1979.

- 51 FRYER, J.N.; TAM, W.H.; VALENTINE, B.; TIKKALA; R.E. Prolactin cell cytology, plasma electrolytes, and wholebody sodium efflux in acid-stressed brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat.Sci.*, 45: 1212-21, 1988.
- 52 GEFFEN, L. In: CUELLO, A.C., ed. *Immunohistochemistry*. Chichester, John Wiley, 1982. p.xi-xiii. (IBRO Handbook Series: Methods in the Neurosciences. v.3).
- 53 GOMORI, G. **Microscopic histochemistry**; principles and practice. Chicago, The University of Chicago, 1952. 273 p.
- 54 GONZALEZ, G.C. & LEDERIS, K. Sauvagine-like and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the brain of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Cell Tissue Res.*, 253:29-37, 1988.
- 55 GORBMAN, A. Roots of fish endocrinology, a perspective. *Fish.Physiol.Biochem.*, 7:3-10, 1989.
- 56 GRAU, E.G. & HELMS, L.M.H. The tilapia prolactin cell: a model for stimulus-secretion coupling. *Fish Physiol. Biochem.*, 7:11-9, 1989.
- 57 GURR, E. **Methods of analytical histology and histochemistry**. Baltimore, The Williams and Wilkins, 1959. 327 p.
- 58 GURR, E. **Staining animal tissues practical and theoretical**. London, Leonard Hill, 1962. 631 p.
- 59 GUYTON, A.C. Sistema nervoso. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro, Interamericana, 1984. p.484-515.
- 60 _____. Endocrinologia e reprodução. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro, Interamericana, 1984. p.792-805.
- 61 HAMANA, K. Über die neurophysis spinalis caudalis bei fischen. *J.Kyoto Prefect.Univ.Med.*, 71:478-90, 1962.
- 62 HOLMGREN, U. On the caudal neurosecretory system of the eel, *Anguilla rostrata*. *Anat.Rec.*, 135:51-9, 1959.
- 63 HOLTZMAN, E. & NOVIKOFF, A.B. **Células e estrutura celular**. 3.ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1985. 630 p.
- 64 HONMA, Y. & TAMURA, E. Studies on japanese chars of the genus *Salvelinus*. IV. The caudal neurosecretory system of the Nikkô-iwana, *Salvelinus leucomaenis pluvis* (Hilgendorf). *Gen.Comp.Endocrinol.*, 9:1-9, 1967.
- 65 HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER; H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem.Cytochem.*, 29: 557-80, 1981.

- 66 HUNNAM, P.; MILDE, A.; STEBBING, P. **El acuario vivo:** agua dulce y salgada. Madrid, Raices, 1981. 240 p.
- 67 ICHIKAWA, T.; ISHIDA, I.; OHSAKO, S.; DEGUCHI, T. **In situ** hybridization demonstrating coexpression of urotensins I, II- α , and II- γ in the caudal neurosecretory neurons of the carp, *Cyprinus carpio*. **Gen.Comp.Endocrinol.**, 71:493-501, 1988.
- 68 ICHIKAWA, T.; LEDERIS, K.; KOBAYASHI, H. Primary structures of multiple forms of urotensin II in the urophysis of the carp, *Cyprinus carpio*. **Gen.Comp.Endocrinol.**, 55:133-41, 1984.
- 69 ISHIKAWA, T.; McMASTER, D.; LEDERIS, K.; KOBAYASHI, H. Isolation and amino acid sequence of urotensin I, a vasoactive and ACTH-releasing neuropeptide, from the carp (*Cyprinus carpio*) urophysis. **Peptides**, 3:859-67, 1982.
- 70 ICN BIOMEDICALS, INC. Immuchem cortisol coated tube 1251 radioimmunoassay direct method of quantitating cortisol from serum/plasma samples-for **in vitro** diagnostic use only. Carson, 1989. 14 p. Catálogo.
- 71 ISHIBASHI, T. Electrical activity of the caudal neurosecretory cells in the eel *Anguilla japonica* with special reference to synaptic transmission. **Gen.Comp.Endocrinol.**, 2:415-24, 1962.
- 72 ITOH, H. & LEDERIS, K. Relationship of urotensin I induced vasodilatory action in rat thoracic aorta to Ca^{2+} regulation. **Can.J.Physiol.Pharmacol.**, 65:298-302, 1987.
- 73 JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. Métodos de estudo. In: _____. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983. p.1-47.
- 74 KOBAYASHI, Y.; LEDERIS, K.; RIVIER, J.; KO, D.; McMASTER, D.; POULIN, P. Radioimmunoassays for fish tail neuropeptides: II. Development of a specific and sensitive assay for and the occurrence of immunoreactive urotensin II in the central nervous system and blood of *Catostomus commersoni*. **J.Pharmacol.Methods**, 15: 321-33, 1986a.
- 75 KOBAYASHI, H.; MATSUI, T.; HIRANO, T.; IWATA, T.; ISHII, S. Vasodepressor substance in the fish urophysis. **Annot.Zool.Jpn.**, 41:154-8, 1968.
- 76 KOBAYASHI, H.; OWADA, K.; YAMADA, C.; OKAWARA, Y. The caudal neurosecretory system in fishes. In: PANG, P.K.T. & SCHEREIBMAN, M.P., eds. **Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications**. New York, Academic Press, 1986b. v.1, p.147-74.

- 77 KOBAYASHI, Y.; WOO, N.Y.S.; ISHIMURA, K.; POULIN, P.; HONTELA, A.; LEDERIS, K. Immunoreactive urotensin I, a corticotropin-releasing factor-like peptide, in fish brain. In: YOSHIMURA, F. & GORBMAN, A., eds. **Pars distalis of the pituitary gland-structure, function and regulation**. Amsterdam, Elsevier Science, 1986c. p.267-9.
- 78 KRIEBEL, R.M.; BURKE, J.D.; MEETZ, G.D. Morphologic features of the caudal neurosecretory system in the blueback herring, *Pomolobus aestivalis*. **Anat.Rec.**, 195:553-71, 1979.
- 79 KRIEBEL, R.M.; PARSONS, R.L.; MILLER, K.E. Innervation of caudal neurosecretory cells. In: KOBAYASHI, H.; BERN, H.A.; URANO, A., eds. **Neurosecretion and the biology of neuropeptides**. Tokyo, Jpn.Sci.Soc.Press, 1985. p.205-11.
- 80 LAGLER, K.F.; BARDACH, J.E.; MILLER, R.R. **Ichthyology: the study of fishes**. New York, John Wiley, 1962. 545 p.
- 81 LARSON, B.A.; BERN, H.A.; LIN, R.J.; NISHIOKA, R.S. A double sequential immunofluorescence method demonstrating the co-localization of urotensin I and II in the caudal neurosecretory system of the teleost, *Gillichthys mirabilis*. **Cell Tissue Res.**, 247:233-9, 1987.
- 82 LARSON, B.A.; NISHIOKA, R.S.; PEARSON, D.; BERN, H.A. Urotensins I and II: presence in the same or different neurons of a fish caudal neurosecretory system. **Amer. Zool.**, 24:54A, 1984.
- 83 LEDERIS, K. Teleostean urophysis: stimulation of contractions of bladder of the trout (*Salmo gairdnerii*). **Science**, 163:1327-8, 1969.
- 84 _____. Active substances in the caudal neurosecretory system of bony fishes. In: BENSON, G. & PHILLIPS, J., eds. **Hormones and the environment**. s.l., Mem.Soc. Endocrinol., 1970. v.18, p.465-84.
- 85 _____. The fish urotensins: hypophyseal and peripheral actions in fishes and mammals. In: MARTINI, L. & GANONG, W.F. **Frontiers in neuroendocrinology**. New York, Raven, 1984. v.8, p.247-63.
- 86 _____. Non-mammalian corticotropin release-stimulating peptides. **Annals NY Acad.Sci.**, 512:129-38, 1987.
- 87 LEDERIS, K.; BERN, H.A.; MEDAKOVIC, M.; CHAN, D.K.O.; NISHIOKA, R.S.; LETTER, A.; SWANSON, D.; GUNTHER, R.; TESANOVIC, M.; HORNE, B. Recent functional studies on the caudal neurosecretory system of teleost fishes. In: KNOWLES, F. & VOLLRATH, L., eds. **Neurosecretion: the final neuroendocrine pathway**. Berlin, Springer-Verlag, 1974. p.94-103.

- 88 LEDERIS, K.; FRYER, J.; RIVIER, J.; MACCANNEL, K.L.; KOBAYASHI, Y.; WOO, N.; WONG, K.L. Neurohormones from fish tails. II. Actions of urotensin I in mammals and fishes. In: GREEP, R.O., ed. **Recent progress in hormone research**. Orlando, Academic Press, 1985a. p.553-76.
- 89 LEDERIS, K.; FRYER, J.N.; YULIS, C.R. The fish neuropeptide urotensin I: its physiology and pharmacology. **Peptides**, 6:353-61, 1985b.
- 90 LEDERIS, K.; KO, D.; RIVIER, J.; MELCHIORRI, P.; NEGRI, L. Specificity and sensitivity of antisera produced against non-conjugated urotensin I and related peptides. **Proc.West.Pharmacol.Soc.**, 30:187-9, 1987.
- 91 LEDERIS, K.; LETTER, A.; McMASTER, D.; ICHIKAWA, T.; MACCANNELL, K.L.; KOBAYASHI, Y.; RIVIER, J.; RIVIER, C.; VALE, W.; FRYER, J. Isolation, analysis of structure, synthesis and biological actions of urotensin I neuropeptides. **Can.J.Biochem.Cell Biol.**, 61:602-14, 1983.
- 92 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**, 218:164-6, 1982.
- 93 LEDERIS, K. & YULIS, C.R. The distribution of urotensins in the central nervous system of teleosts, with special reference to a separate, CSF-contacting urotensin II; specific neuronal system in the spinal cord and brain of some fishes. **Wiss.Z.Karl-Marx-Univ.Leipzig, Math.-Naturwiss.R.**, 36:207-13, 1987.
- 94 LEHNINGER, A.L. Hormônios. In: _____. **Princípios de bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 1986. p.513-34.
- 95 LEVIN, J. **Estatística aplicada a ciências humanas**. São Paulo, Harper & Row do Brasil, 1977. 310 p.
- 96 MACMILLAN, F.M. & CUELLO, A.C. Monoclonal antibodies in neurohistochemistry: the state of the art. In: PANULA, P.; PÄIVÄRINTA, H.; SOINILA, S. **Neurohistochemistry: modern methods and applications**. New York, Alan R. Liss, 1986. p.49-74.
- 97 MAETZ, J.; BOUGUET, J.; LAHLOUH, B. Action de l'urohypophyse sur les échanges de sodium (études à l'aide du ^{24}Na) et sur l'excrétion urinaire du téléostéen *Carassius auratus*. **J.Physiol.**, Paris, 55:159-60, 1963.
- 98 MARDONES, J. & ALDUNATE, J. **Valoración biológica**. Chile, Stanley, 1958. 80 p.
- 99 MARRACK, J. Nature of antibodies. **Nature**, London, 133: 292-3, 1934.

- 100 McMASTER, D.; KOBAYASHI, Y., RIVIER, J.; LEDERIS, K. Characterization of the biologically and antigenically important regions of urotensin II. **Proc.Wet.Pharmacol. Soc.**, 29:205-8, 1986.
- 101 McMASTER, D. & LEDERIS, K. Isolation and amino acid sequence of two urotensin II peptides from *Catostomus urophysis*. **Peptides**, 4:367-74, 1983.
- 102 _____. Urotensin I- and CRF-like peptides in *Catostomus commersoni* brain and pituitary - HPLC and RIA characterization. **Peptides**, 9:1043-8, 1988.
- 103 McMASTER, D.; RIVIER, J.; LEDERIS, K. Isolation, amino acid sequence and synthesis of urotensin I from *Hippoglossoides elassodon*. In: SHIBA, T. & SAKAKIBARA, S., eds. **Peptide chemistry**. Osaka, Protein Research Foundation, 1987. p.145-8.
- 104 McMASTER, D.; RORSTAD, O.P.; SUZUKI, Y.; LEDERIS, K. Isolation of highly purified iodinated peptides by high pressure liquid chromatography. **Proc.West. Pharmacol.Soc.**, 27:237-41, 1984.
- 105 MEUNIER, M. & LABRIE, F. Multiple hormonal control of pars intermedia cell activity. **Can.J.Biochem.Cell Biol.**, 61:516-31, 1983.
- 106 MIDDLEBROOK, P. & FRYER, J.N. Facilitation and inhibition of plasma cortisol following electrical stimulation of the goldfish forebrain. **Brain Research**, 297:201-5, 1984.
- 107 MIMURA, O.M. Ocorrência do sistema neurosecretor caudal em *Lepidosiren paradoxa* (peixe dipnóico) em fase estival. **Bol.Fisiol.Anim.**, Univ.S.Paulo, 2:43-8, 1978.
- 108 MIMURA, O.M. & SALOMÃO, M.G. Sistema neuro-secretor caudal de *Prochilodus affinis* e *Prochilodus marginatus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 12., Campinas, 1985. **Resumos**. Universidade Estadual de Campinas, 1985. p.206.
- 109 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**, 10: 383-9, 1989.
- 110 MOORE, R.Y. Neuroendocrine mechanisms: cell and systems. In: YEN, S.S.C. & JAFFE, R.B. **Reproductive endocrinology, physiology, pathophysiology and clinical management**. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1986. p.3-29.
- 111 MORITA, H.; ISHIBASHI, T.; YAMASHITA, S. Synaptic transmission in neurosecretory cells. **Nature**, London, 191:183, 1961.

- 112 MUNEKATA, E.; OHTAKI, T.; ICHIKAWA, T.; McMASTER, D.; LEDERIS, K. Isolation, characterization and synthesis of urotensin II peptides. In: RICH, D.H. & GROSS, E., eds. **Proceedings of the 7th American Peptides Symposium**. Rockford, I.L.; Pierce Chemical, 1981. p.69-72.
- 113 OKAWARA, Y.; MORLEY, S.D.; BURZIO, L.O.; ZWIERS, H.; LEDERIS, K.; RICHTER, D. Cloning and sequence analysis of cDNA for corticotropin-releasing factor precursor from the teleost fish *Catostomus commersoni*. **Proc. Natl.Acad.Sci, USA**, 85:8439-43, 1988.
- 114 OLIVEREAU, M. & OLIVEREAU, J. Quantitative changes of CRF-like immunoreactivity in eels treated with reserpine and cortisol. **Peptides**, 9:1261-7, 1989.
- 115 ONSTOTT, D. & ELDE, R. Immunohistochemical localization of urotensin I/corticotropin-releasing factor immunoreactivity in neurosecretory neurons in the caudal spinal cord of fish. **Neuroendocrinology**, 39:503-9, 1984.
- 116 _____. Coexistence of urotensin I/corticotropin-releasing factor and urotensin II immunoreactivities in cells of the caudal neurosecretory system of a teleost and an elasmobranch fish. **Gen.Comp.Endocrinol.**, 63: 295-300, 1986a.
- 117 _____. Immunohistochemical localization of urotensin I/corticotropin-releasing factor, urotensin II, and serotonin immunoreactivities in the caudal spinal cord of nonteleost fishes. **J. Comp. Neurol.**, 249:205-25, 1986b.
- 118 ORR, R.T. Peixes e vertebrados semelhantes a peixes. In: _____. **Biologia dos vertebrados**. São Paulo, Roca, 1986. p.27-72.
- 119 OWADA, K.; KAWATA, M.; AKAJI, K.; TAKAGI, A.; MORIGA, M.; KOBAYASHI, H. Urotensin II-immunoreactive neurons in the caudal neurosecretory system of freshwater and seawater fish. **Cell Tissue Res.**, 239:349-54, 1985a.
- 120 OWADA, K.; YAMADA, C.; KOBAYASHI, H. Immunoreactivity to antisera of urotensin II and corticotropin-releasing factor in the caudal neurosecretory system of the elasmobranchs and the dorsal cells of the lamprey. **Cell Tissue Res.**, 242:527-30, 1985b.
- 121 PEARSON, D.; SHIVELY, J.E.; CLARK, B.R.; GESCHWIND, I.I.; BARKLEY, M.; NISHIOKA, R.S.; BERN, H.A. Urotensin II: A somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. **Proc.Natl.Acad.Sci., USA**, 77: 5021-4, 1980.
- 122 PESCA, A. **Estatística fundamental**. 3.ed. Porto Alegre, Sulina, 1976. 131 p.

- 123 PETER, R.E. & FRYER, J.N. Endocrine functions of the hypothalamus of actinopterygians. s.n.t.
- 124 PEYROT, A. Il sistema neurosecernente caudale degli ittiopsidi: osservazioni sulla lampreda di ruscello (*Lampetra zanandrei* Valdikov). **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.**, 40:207-11, 1964.
- 125 POOL, C.W.; BUIJS, R.M.; SWAAB, D.F.; BOER, G.J.; VAN LEEUWEN, F.W. On the way to specific immunocytochemical localization. In: CUELLO, A.C., ed. **Immunohistochemistry**. Chichester, John Wiley, 1982. p.1-46. (IBRO Handbook Series: Methods in the neurosciences. v.3).
- 126 PRESCOTT, D.M. **Cells-principles of molecular structure and function**. Boston, Jones and Bartlett, 1988. 621 p.
- 127 REBAR, R.W. Practical evaluation of hormonal status. In: YEN, S.S.C. & JAFFE, R.B. **Reproductive endocrinology, physiology, pathophysiology and clinical management**. 2.ed. Philadelphia, W.B.Saunders, 1986. p.683-733.
- 128 RENTA, T.; D'ESTE, L.; NEGRI, L.; LOMANTO, D. Sauvagine-like immunoreactivity in the bony fish urophysis and caudal neurosecretory system. **Basic Appl.Histochem.**, 26:89-98, 1982.
- 129 RODRIGUES, P.C. **Bioestatística**. Niterói, Universidade Federal Fluminense, 1986. 227 p.
- 130 RUBAL, E.E.M.; BARACAT, I.; VAL-SELLA, M.V. Morfologia funcional da adenohipófise do cascudo, *Plecostomus albopunctatus* (Val., 1840). **Bol.Fisiol.Animal**, Univ. S.Paulo, 8:119-30, 1984.
- 131 RUBAL, E.E.M. & VAL-SELLA, M.V. Morfologia e morfometria da hipófise de *Plecostomus albopunctatus* (Val. 1840) no estágio de repouso do ciclo gonadal. **Bol.Fisiol. Animal**, Univ.S.Paulo, 5:89-97, 1980.
- 132 ROSS, M.H. & REITH, E.J. **Histology: a text and atlas**. 2.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1989. 783 p.
- 133 ROY, B.B. Action of zinc on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of the fish, guinea-pig and dog and on different experimental preparations. **Proc.Natl.Acad. Sci.IndiaB.**, 28:13-28, 1962.
- 134 SAKAKURA, M.; YOSHIOKA, M.; KOBAYASHI, M.; TAKEBE, K. Degree of inhibition of ACTH release by glucocorticoids in adrenalectomized rats. **Neuroendocrinology**, 32:38-41, 1981.
- 135 SAKANAKA, M.; McMASTER, D.; CHOHAN, K.; SHIBASAKI, T.; STELL, W.K.; LEDERIS, K. Urotensin I-like immunoreactivity in amacrine cells of the goldfish retina. **Neuroscience Letters**, 76:96-100, 1987a.

- 136 SAKANAKA, M.; SHIBASAKI, T.; LEDERIS, K. Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine method. **J.Comp.Neurol.**, 260:256-98, 1987b.
- 137 _____. Corticotropin-releasing factor-containing afferents to the inferior colliculus of the rat brain. **Brain Res.**, 414:68-76, 1987c.
- 138 SANO, Y. Das caudale neurosekretorische system bei fischen. **Ergeb.Biol.**, 24:191-212, 1961.
- 139 _____. The caudal neurosecretory system. In: KATSUKI, S., ed. **Central regulation of internal secretion**. Tokyo, Igaku Shoin, 1965. p.469-522.
- 140 SANO, Y.; IIDA, T.; TAKEMOTO, S. Weitere elektronenmikroskopische untersuchungen am kaudalen neurosekretorischen system von fischen. **Z.Zellforsch.Mikrosk. Anat.**, 75:328-38, 1966.
- 141 SANO, Y. & KAWAMOTO, M. Entwicklungsgeschichtliche beobachtungen an der neurophysis spinalis caudalis von *Lebistes reticulatus* Peters. **Z.Zellforsch.Mikrosk. Anat.**, 51:56-64, 1959.
- 142 SAWCHENKO, P.E. Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus. **Brain Res.**, 437:253-63, 1987.
- 143 SHIOSAKA, S. & TOHYAMA, M. Immunohistochemical techniques. In: EMSON, P.C.; ROSSOR, M.N.; TOHYAMA, M., eds. **Progress in brain research**. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1986. v.66, p.3-32.
- 144 SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1975. 350 p.
- 145 SMELIK, P.G. The regulation of ACTH secretion. **Acta Physiol.Pharmacol.Neerl.**, 15:123-35, 1969.
- 146 SPEIDEL, C.C. Gland-cells of internal secretion in the spinal cord of the skates. **Pap.Dep.Mar.Biol.**, Carnegie Inst. Washington, 13:1-31, 1919.
- 147 _____. Further comparative studies in other fishes of cells that are homologous to the large irregular glandular cells in the spinal cord of the skates. **J. Comp.Neurol.**, 34:303-17, 1922.
- 148 STACEY, N.E.; PETER, R.E.; COOK, A.F.; TRUSCOTT, B.; WALSH, J.M.; IDLER, D.R. Changes in plasma concentrations of gonadotropin, 17 β -estradiol, testosterone, and 17 α -hydroxy-20 β dihydroprogesterone during spontaneous and brain lesion induced ovulation in goldfish. **Can.J.Zool.**, 61:2646-52, 1983.

- 149 STERBA, G. Distribution of nerve cells with secretory-like granules in Petromyzontes. **Nature**, London, 193: 400-1, 1962.
- 150 STORER, T. & USINGER, R.L. **Zoologia geral**. 5.ed. São Paulo, Editora Nacional, 1979. 757 p.
- 151 SUESS, U.; LAWRENCE, J.; KO, D.; LEDERIS, K. Radioimmunoassay for fish tail neuropeptides: I. Development of assay and measurement of immunoreactive urotensin I in *Catostomus commersoni* brain, pituitary, and plasma. **J.of Pharmacol.Methods**, 15:335-46, 1986.
- 152 TAM, W.H.; FRYER, J.N.; ALI, I.; DALLAIRE, M.R.; VALENTINE, B. Growth inhibition, gluconeogenesis, and morphometric studies of the pituitary and interrenal cells of acid-stressed brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Can.J.Fish Aquat.Sci.**, 45:1197-211, 1988.
- 153 TAM, W.H.; FRYER, J.N.; VALENTINE, B.; ROY, R.J.J. Reduction in oocyte production and gonadotrope activity, and plasma levels of estrogens and vitellogenin in brook trout exposed to low environmental pH. s.d. Trabalho datilografado.
- 154 TOSELLI, C. Peixe japoneses (*Carassius auratus*). **Vida no Aquário**, 7:91-5, 1988.
- 155 TRAN, T.N.; FRYER, J.N.; BENNETT, H.P.J.; TONON, M.C.; VAUDRY, H. TRH simulates the release of POMC-derived peptides from goldfish melanotopes. **Peptides**, 10: 835-41, 1989.
- 156 TRAN, T.N.; FRYER, J.N.; LEDERIS, K.; VAUDRY, H. CRF, urotensin I and sauvagine stimulate the release of POMC-derived peptides from goldfish neurointermediate lobe cells. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 78:351-60, 1990.
- 157 VAL-SELLA, M.V. & FAVA-DE-MORAES, F. Morphology of the hypophysis of the freshwater teleost *Ramdia hilarii* (Val., 1840). **Anat.Anz.**, 145:146-54, 1979a.
- 158 _____. Cytology and cytochemistry of the hypophysis of the freshwater teleost *Ramdia hilarii* (Val., 1840). **Gegenbaurs morph.Jahrb.**, Leipzig, 125:161-73, 1979b.
- 159 VAL-SELLA, M.V.; GIUFFRIDA, R.; SAWAYA, P. Morphology of the carp hypophysis (*Cyprinus carpio* L.). **Anat. Anz.**, 142:403-9, 1977.
- 160 VANDESANDE, F. Immunohistochemical double staining techniques. In: CUELLO, A.C., ed. **Immunohistochemistry**. Chichester, John Wiley, 1982. p.257-73. (IBRO Handbook Series: Methods in the Neurosciences. v.3).
- 161 VERNE, J. A l'étude des cellules névrogliales. **Arch. Anat.Microsc.Morphol.Exp.**, 16:149-92, 1914.

- 162 VIGH, B. & VIGH-TEICHMANN, I. Comparative ultrastructure of the cerebrospinal fluid contacting neurons. **Int.Rev.Cytol.**, 35:189-251, 1973.
- 163 VIGH, B.; VIGH-TEICHMANN, I.; AROS, B. Special dendritic and axonal endings formed by the cerebrospinal fluid-contacting neurons of the spinal cord. **Cell Tissue Res.**, 183:541-52, 1977.
- 164 WEIHEL, E.R. & BOLENDER, R.P. Stereological techniques for electron microscopic-morphometry. In: _____. **Principles and techniques of electron microscopic: biological applications.** s.l., Hayat, 1970. v.3, p.239-95.
- 165 WEISS, L. **Cell and tissue biology: a textbook of histology.** 6.ed. Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1983. 1158 p.
- 166 WELD, M.M. & FRYER, J.N. Stimulation by angiotensins I and II of ACTH release from goldfish pituitary cell columns. **Gen.Comp.Endocrinol.**, 68:19-27, 1987.
- 167 _____. Angiotensin II stimulation of teleost adrenocorticotrophic hormone release: interactions with urotensin I and corticotropin-releasing factor. **Gen.Comp.Endocrinol.**, 69:335-40, 1988.
- 168 WELD, M.M.; FRYER, J.N.; RIVIER, J.; LEDERIS, K. Inhibition of CRF- and urotensin I-stimulated ACTH release from goldfish pituitary cell columns by the CRF analogue α -helical CRF-(9-41). **Regulatory Peptides**, 19:273-80, 1987.
- 169 WHEELER, A. **The world encyclopedia of fishes.** London, Macdonald, 1985. 368 p.
- 170 WHITNALL, M.H. Distributions of pro-vasopressin expressing and pro-vasopressin deficient CRH neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of colchicine-treated normal and adrenalectomized rats. **J.Comp.Neurol**, 275:13-28, 1988.
- 171 WOO, N.Y.S.; HONTELA, A.; FRYER, J.N.; KOBAYASHI, Y.; LEDERIS, K. Activation of the hypothalamo-hypophysial-interrenal system by urophysectomy in goldfish. **Am.J.Physiol.**, 248:R197-R201, 1985.
- 172 YAMADA, C.; MIKAMI, S.; KURAISHI, Y.; KOBAYASHI, H. Immunoreactive methionine-enkephalin in the caudal neurosecretory system of the carp, *Cyprinus carpio*. **Cell Tissue Res.**, 253:485-7, 1988.
- 173 YAMADA, C.; OWADA, K.; KOBAYASHI, H. Colocalization of corticotropin-releasing factor/urotensin I and urotensin II in the caudal neurosecretory neurons in the carp, *Cyprinus carpio*. **Zool.Science**, 2:813-6, 1985.
- 174 YAMAMOTO, K. **The caudal neurosecretory system of fishes.** Japan, Gunma Univ., 1979. p.1-118.

- 175 YEN, S.S.C. Neuroendocrine control of hypophyseal function, physiological and clinical implications. In: YEN, S.S.C. & JAFFE, R.B. **Reproductive endocrinology, physiology, pathophysiology and clinical management**. 2.ed. Philadelphia, W.B.Saunders, 1986. p.33-67.
- 176 YULIS, C.R. & LEDERIS, K. The distribution of "extraurophyseal" urotensin I- immunoreactivity in the central nervous system of **Catostomus commersoni** after urophysectomy. **Neuroscience Letters**, 70:75-80, 1986a.
- 177 _____. Extraurophyseal distribution of urotensin II immunoreactive neuronal perikarya and their processes. **Proc.Natl.Acad.Sci, USA**, 83:7079-83, 1986b.
- 178 _____. Co-localization of the immunoreactivities of corticotropin-releasing factor and arginine vasotocin in the brain and pituitary system of the teleost **Catostomus commersoni**. **Cell Tissue Res.**, 247:267-73, 1987.
- 179 _____. Relationship between urotensin II- and somatostatin-immunoreactive spinal cord neurons of **Catostomus commersoni** and **Oncorhynchus kisutch** (Teleostei). **Cell Tissue Res.**, 254:539-42, 1988a.
- 180 _____. Occurrence of an anterior spinal, cerebrospinal fluid-contacting, urotensin II neuronal system in various fish species. **Gen.Comp.Endocrinol.**, 70:301-11, 1988b.
- 181 YULIS, C.R.; LEDERIS, K.; WONG, K.; FISHER, A.W.F. Localization of urotensin I- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the central nervous system of **Catostomus commersoni**. **Peptides**, 7:79-86, 1986 .
- 182 ZELNICK, P.R. & LEDERIS, K. Chromatographic separation of urotensins. **Gen.Comp.Endocrinol.**, 20:392-400, 1973.
- 183 ZOLI, M.; FUXE, K.; AGNATI, L.F.; HÄRFSTRAND, A.; TERENIUS, L.; TONI, R.; GOLDSTEIN, M. Computer-assisted morphometry of transmitter-identified neurons: new openings for the understanding of peptide-monoamine interactions in the mediobasal hypothalamus. In: PANULA, P.; PÄIVÄRINTA, H.; SOINILA, S., eds. **Neurohistochemistry modern methods and applications**. New York, Alan R.Liss, 1986. p.137-72.

