



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Será que o plexo coróide pode cheirar?

Gabriela Pires Tavares

Dissertação para obtenção de grau de mestre
Ciências Biomédicas
(2º ciclo)

Orientadora: Prof^a. Doutora Isabel Gonçalves
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Cecília Santos

Covilhã, Junho de 2012

O conteúdo desta tese é da responsabilidade do autor

Agradecimentos

As palavras não chegam nem representam com verdade aquilo que sinto pelos que me ajudaram na concretização deste trabalho. No entanto deixo aqui algumas palavras de apreço.

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, a prof. Doutora Isabel Gonçalves, por todo o apoio, incentivo, conhecimento e orientação, sem ela este trabalho não teria atingido o nível que atingiu.

À minha co-orientadora, a prof Doutora Cecília Santos pela possibilidade que me deu em participar neste projecto e pelo investimento e confiança que depositou em mim.

Quero agradecer também à Telma, Helena e Joana por todo apoio que me prestaram em termos laboratoriais, por todo o conhecimento teórico e prático que me ensinaram e à Filipa, por ter sido a minha companheira de trabalho.

Não posso deixar de agradecer à Eduarda, à Catarina, à Ângela e à Susana por todo o carinho, ajuda, paciência, apoio e bons conselhos que partilharam comigo. Um muito obrigado! Quero ainda dar um obrigado especial à Inês por toda a disponibilidade e por tudo o que me ensinaste.

Como não podia deixar de ser, tenho que agradecer à Marina pela sua amizade e companheirismo.

Ao meu namorado, Fernando por me ter apoiado e por toda a paciência, carinho e dedicação que teve comigo.

E finalmente, mas não menos importante aos meus pais e ao meu mano, que são a minha família e o meu pilar onde fui buscar energias quando mais precisei.

Resumo

O plexo coróide (CP) é uma estrutura ramificada e altamente vascularizada que se encontra alojada nos ventrículos cerebrais, formando uma interface única entre o sangue e o líquido cefalorraquidiano, CSF. A principal função deste tecido é a formação do CSF, através do qual, o CP fornece nutrientes e um conjunto vasto de neuropéptidos que nutrem e protegem todo o sistema nervoso central (SNC).

O CP é por isso um tecido importantíssimo para manter o equilíbrio de todo o SNC, pela monitorização e manutenção do ambiente bioquímico extracelular cerebral.

Um estudo de “microarrays” de cDNA, realizado previamente no laboratório do CICS, em CPs de ratos *Wistar Han*, machos e fêmeas, permitiu constatar que existem uma série de vias de sinalização reguladas pelas hormonas sexuais, entre as quais, a via de transdução olfactiva.

Neste contexto e uma vez que as proteínas que constituem a via de transdução olfactiva foram já identificadas noutros tecidos, mostrando-se esta, activa e funcional, realizou-se este estudo com o objectivo de comprovar a expressão das mesmas proteínas no CP de rato e prever a funcionalidade da transdução olfactiva neste tecido.

A análise da transcrição do RNAm foi desenvolvida por RT-PCR e PCR em tempo real e a expressão das proteínas foi comprovado por Western blot, imunohistoquímica e imunofluorescência.

Todos os principais constituintes da via olfactiva foram identificados no CP: os receptores olfactivos (OR 63, OR 19, OR 600, OR 620/624 e OR 1496), a adenil ciclase tipo III (ACIII) e a subunidade α da proteína G específica do olfacto (G α olf).

Os resultados obtidos neste trabalho experimental sugerem que a cascata de sinalização da transdução olfactiva pode estar activa no CP, uma vez que as várias proteínas que a constituem se encontram expressas neste tecido. Esta via pode regular a monitorização do CSF, através de moléculas químicas solúveis neste fluido, induzindo respostas celulares de acordo com as necessidades fisiológicas do SNC.

Palavras-chave

Plexo coróide, líquido cefalorraquidiano, transdução olfactiva, receptores olfactivos, G α olf, ACIII.

Abstract

The choroid plexuses (CPs) are highly vascularized branched structures that protrude into the ventricles of the brain, and form a unique interface between the blood and the cerebrospinal fluid (CSF). The best recognized function of this tissue is cerebrospinal fluid (CSF) production, from which, CP nourish and protect all central nervous system (CNS), providing nutrients and a set of neuropeptides as cytokines and metabolizing enzymes, growth factors and hormones.

Therefore CP plays an important role monitoring and buffering extracellular brain fluid, which keeps in balance of all CNS.

A CP microarray study was performed, in our investigation center, in order to understand CP transcriptome and particularly, the effect of sex hormones in the total transcriptome.

The analysis of microarray results allowed the identification of several up and down regulated pathways and revealed that one of the principal ones was the olfactory transduction.

Olfactory-like chemosensory signalling occurs outside the olfactory epithelium, in other tissues where it also monitors the composition of body fluids. This work aims at analyzing if the olfactory machinery is expressed in the CP and forecast its functionality in this tissue.

The RNA analysis was performed by real-time PCR and conventional PCR, and protein analysis by western blot, immunohistochemistry and immunofluorescence. We found that major components of olfaction, including olfactory receptors (OR 63, OR 19, OR 600, OR 620/624 e OR 1496), olfactory-related adenylate cyclase (ACIII) and olfactory G protein (G α olf), are expressed in the CP. These results suggest that olfactory-like chemosensory pathway might be active in CP and could function as a detector of soluble chemical molecules in CSF therefore inducing cellular responses according to CNS physiological needs.

Key words

Choroid plexus, cerebrospinal fluid, olfaction transduction, olfactory receptors, G α olf, ACIII.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 17 |
| 1.1.1 Morfologia do plexo coróide, a sua estrutura básica | 19 |
| 1.1.2 Funções biológicas | 20 |
| 1.1.2.1 Secreção de CSF | 20 |
| 1.1.2.2 CP e o seu papel na síntese proteica, protecção e defesa do SNC | 22 |
| 1.1.2.4 O papel do CP no desenvolvimento do sistema nervoso central | 24 |
| 1.1.2.5 O plexo coróide durante o envelhecimento | 24 |
| 1.2 O sistema olfactivo | 25 |
| O sistema olfactivo detecta substâncias químicas presentes no ambiente e, do um ponto de vista evolutivo, é um dos sentidos mais antigos (Purves et al., 2005). | 25 |
| 1.2.1 Composição celular do epitélio olfactivo | 25 |
| 1.2.2 Características gerais da transdução olfactiva | 28 |
| 1.2.3 Componentes essenciais da via da transdução olfactiva | 29 |
| 1.2.3.1 Receptores olfactivos | 29 |
| 1.2.3.2 G_{olf} e ACIII | 30 |
| 1.2.3.3 Canais nucleotídicos cíclicos (CNC) | 31 |
| 1.2.4 Funções biológicas dos OR's nos tecidos olfactivos | 32 |
| 1.2.5 Transdução olfactiva noutros sistemas | 32 |
| 1.2.6.1 Rim | 33 |
| 1.2.6.2. Placenta | 33 |
| 1.2.6.3. Espermatozóides | 34 |
| 1.2.6.4. Plexo coróide | 35 |
| 2. Objectivo | 36 |
| 3. Materiais e métodos | 38 |
| 3.1 Animais | 39 |
| 3.2 Extracção de RNA total | 40 |
| 3.2.1 A partir de plexo coróide de rato | 40 |
| 3.2.2 A partir de epitélio olfactivo de rato | 41 |
| 3.3 Síntese de cDNA por RT-PCR | 41 |
| 3.3.1 A partir de RNA de plexo coróide e de epitélio olfactivo de rato | 41 |
| 3.4 Amplificação enzimática de DNA (PCR) | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.4.1 Detecção de ACIII e Gaolf | 43 |
| 3.5 PCR em tempo real com sondas Taqman | 43 |
| 3.4.1 Detecção do OR 63 e OR 19 | 44 |
| 3.5 Imunohistoquímica em lâminas histológicas de plexo coróide e de epitélio olfactivo | 45 |
| 3.6.1 Detecção de ACIII, Gaolf, OR 63, OR 19, OR 600 e OR 620/624. | 46 |
| 3.7 Imunofluorescência | 47 |
| 3.7.1 Imunofluorescência em cultura primária de células epiteliais de plexo coróide de rato (CPEC) para detecção da ACIII, Gaolf, OR 63, OR 19, OR OR 600, OR 620/624 e OR 1496 | 48 |
| 3.8 Extracção e quantificação de proteína total | 49 |
| 3.8.1 A partir de plexo coróide de rato | 49 |
| 3.8.2 A partir de epitélio olfactivo de rato..... | 49 |
| 3.9 Western blot..... | 50 |
| 3.9.1 Análise das proteínas ACIII e Gaolf em extracto de proteína total de CP e de EO | 51 |
| 4. Resultados | 52 |
| 4.1 Análise da expressão do gene da Gaolf e ACIII por electroforese em gel de agarose a 1,5% | 53 |
| 4.2 Análise da expressão dos genes do OR 19 e OR 63 no CP por PCR em tempo real | 54 |
| 4.2.1 Controlo negativo | 54 |
| 4.2.2 OR 63 e OR19 no CP de rato..... | 55 |
| 4.3 Análise da expressão das proteínas ACIII, Gaolf, OR 63, OR 19, OR600, OR620/624 no CP de rato por imunohistoquímica | 56 |
| 4.3.1 Controlo negativo | 56 |
| 4.3.2 ACIII em CP de rato | 57 |
| 4.3.2 Gaolf no CP de rato..... | 58 |
| 4.3.3 OR 63 no CP de rato | 59 |
| 4.3.4 OR 600 no CP de rato..... | 61 |
| 4.3.4 OR 620/624 em CP de rato | 62 |
| 5. Discussão | 66 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação morfológica e histológica do plexo coróide do ventrículo lateral cerebral.. . | 18 |
| Figura 2 - Estrutura celular do plexo coróide. | 19 |
| Figura 3- Representação esquemática da localização dos transportadores de iões na membrana celular plexo coróide..... | 21 |
| Figura 4 - Representação esquemática do papel desempenhado pelas diferentes proteínas existentes no plexo coróide..... | 23 |
| Figura 5- Localização do epitélio olfactivo na cavidade nasal | 26 |
| Figura 6 - Representação dos diferentes tipos celulares que constituem o epitélio olfactivo | 27 |
| Figura 7 - Transdução de sinal da detecção dos odores nas membranas ciliares dos OSN | 29 |
| Figura 8 - Representação esquemática dos domínios que constituem a proteína G..... | 30 |
| Figura 9 - Ilustração do local de incisão para extracção de epitélio olfactivo | 39 |
| Figura 10 - Ilustração das moléculas fluorescentes mais utilizadas na técnica de PCR real time. | 43 |
| Figura 11 - Curva exponencial de uma reacção de PCR em tempo real | 44 |
| Figura 12- Electroforese de 1,5% em gel de agarose, coloração com Green Save | 53 |
| Figura 13- Curva de amplificação do controlo negativo da reacção de PCR em tempo real | 54 |
| Figura 14- Curvas de amplificação da reacção de PCR em tempo real dos genes do OR 63 OR 19, em CP e em EO de rato. | 55 |
| Figura 15- Cortes histológicos de CP e EO | 56 |
| Figura 16- Expressão proteica da adenil ciclase III (ACIII) em CP e EO de rato | 57 |
| Figura 17- Expressão proteica da subunidade α da proteína G (Gaolf) em CP e EO de rato..... | 58 |
| Figura 18 - Expressão proteica do OR63 (MOR 267-1) em CP e EO de rato..... | 59 |
| Figura 19- Expressão proteica do OR19 (MOR 140-1) em CP e EO de rato..... | 60 |
| Figura 20 - Expressão proteica do OR 600 (Mor 39-1) em CP e EO de rato..... | 61 |
| Figura 21 - Expressão proteica do OR 620/624 (Mor 4-1 /Mor 4-2P) em CP e EO de rato. | 62 |
| Figura 22- Imunofluorescência das culturas primárias das células epiteliais de CP de rato com os anticorpos ACIII (A), Gaolf (B), OR 63 (C), OR 19 (D), OR 600 (E) e OR 620/624 (F). | 64 |
| Figura 23- Western Blot de extractos de proteína total de CP e de OE de rato | 65 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Alguns exemplos de neuropéptidos produzidos pelo Plexo coróide. | 22 |
| Tabela 2- Sequências dos primers ACIII e Gαolf e tamanhos dos fragmentos obtidos nas reacções de PCR | 42 |
| Tabela 3- Anticorpos primários utilizados para a detecção das proteínas ACIII, Gαolf e os OR's em CP e EO de rato, por imunohistoquímica | 46 |

Lista de Acrónimos

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Albumina sérica bovina

CP - Plexo coroide

cAMP - AMP cíclico

CNC - Canal nucleotídico cíclico

CSF - Líquido cefalorraquidiano

FBS - Soro fetal de bovino

GDP - Guanosina difosfato

GH - Hormona de crescimento

GTP - Guanosina trifosfato

IGFII- Factor de crescimento derivado da insulina II

IHQ - Imunohistoquímica

IL-1B - Interleucina 1B

IL6 - Interleucina 6

MHC - “Major Histocompatibility Complex”

EO - Epitélio olfativo

OR - Receptor olfativo

OSN - Neurónio olfativo sensorial

PCR - “Polymerase chain reaction”

SNC- Sistema nervoso central

T3 - Triiodotironina

T4 - Tiroxina

TNF α - Factor de necrose tumoral α

TTR - Transtirretina

1. Introdução

1.1 Plexo Coróide

O encéfalo humano possui quatro cavidades ventriculares, os dois ventrículos laterais que ocupam uma localização central em cada um dos hemisférios cerebrais, o terceiro e quarto ventrículos, com uma localização inferior à dos ventrículos laterais.

Estas cavidades, revestidas por epêndima, comunicam entre si e possuem a importante função de alojar e armazenar o líquido cefalorraquidiano (CSF) (Redzic and Segal 2004).

O plexo coróide (CP) localiza-se no interior de cada um dos ventrículos cerebrais, projectando-se como uma franja vascularizada, que comunica com o epêndima da cavidade ventricular (Redzic and Segal 2004; Emerich, Skinner et al. 2005).

Este tecido é fortemente irrigado, o que lhe proporciona uma cor rosada. Possui ainda um aspecto rendilhado devido às suas inúmeras vilosidades, o que lhe permite ser facilmente distinguido dos capilares sanguíneos cerebrais (Redzic and Segal 2004; Emerich, Skinner et al. 2005).

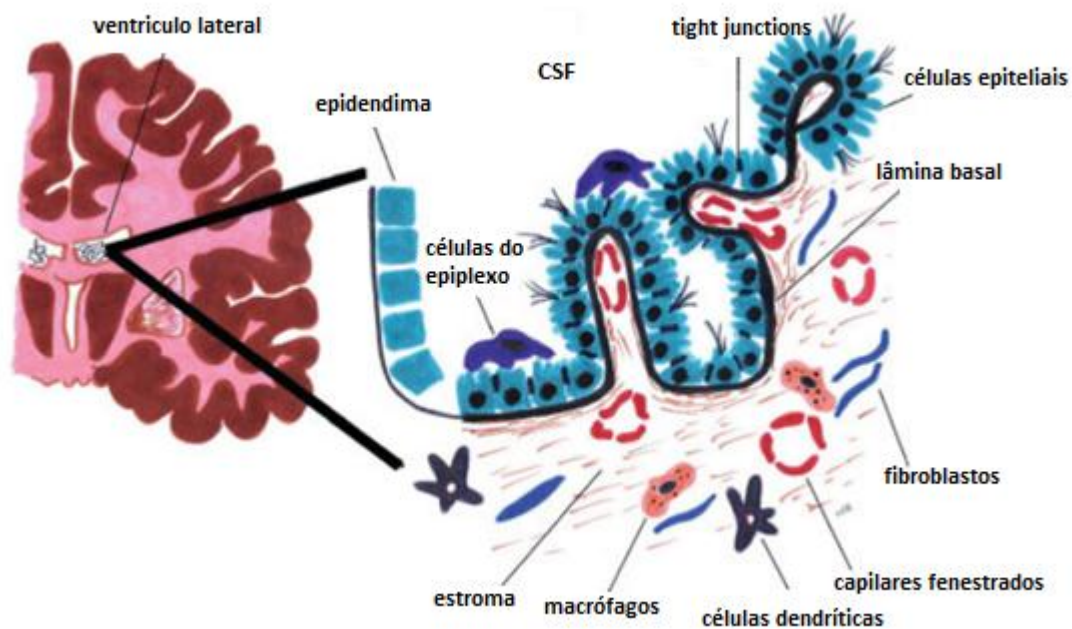


Figura 1 - Representação morfológica e histológica do plexo coróide do ventrículo lateral cerebral. Adaptado de Emerich et al.,2005.

1.1.1 Morfologia do plexo coróide, a sua estrutura básica

Cada CP consiste numa estrutura em pregas de tecido conjuntivo frouxo, contendo um sistema ramificado de vasos sanguíneos, coberto por um epitélio simples ou cúbico, sustentado pela lâmina própria (Wheater's, 2007).

As células epiteliais do CP possuem microvilosidades e pequenos tufos de cílios na sua face apical da e invaginações na face basolateral (figuras 1 e 2). A face apical fica em contacto directo com o CSF, que preenche o interior dos ventrículos, enquanto a face basolateral contacta com os capilares sanguíneos fenestrados. As células epiteliais do CP são unidas por “tight-junctions” criando uma barreira física à passagem de iões e moléculas do sangue para o CSF (Gherzi-Egea and Strazielle 2001; Emerich, Skinner et al. 2005). O CP é uma estrutura única do encéfalo que forma uma interface entre estes dois fluidos circulantes, o sangue periférico e o CSF (Gherzi-Egea and Strazielle 2001).

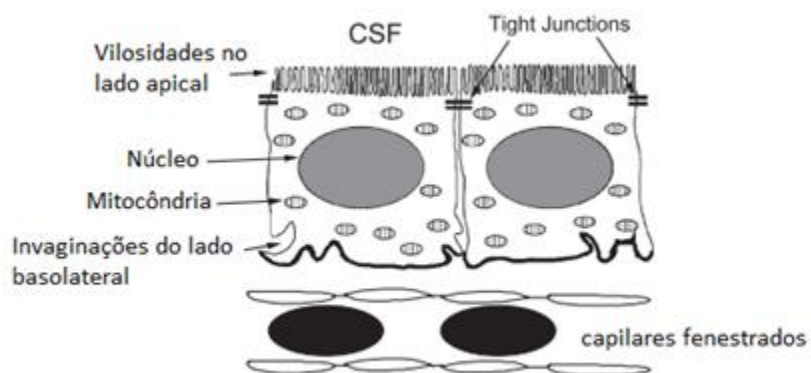


Figura 2 - Estrutura celular do plexo coróide. Adaptado de Smith et al., 2004.

As células epiteliais de CP possuem ainda um citoplasma abundante e núcleos esféricos com numerosas mitocôndrias, fundamentais para manter o metabolismo respiratório a um nível elevado, permitindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) suficiente para garantir a secreção normal de CSF (Smith, Johanson et al. 2004; Emerich, Skinner et al. 2005).

Estas células e a lâmina própria são sustentadas por uma densa rede vascular, que fornece ao CP uma irrigação 4 a 7 vezes superior à dos restantes tecidos cerebrais (Emerich, Skinner et al. 2005).

1.1.2 Funções biológicas

1.1.2.1 Secreção de CSF

O CP é um tecido secretor, responsável pela produção do líquido cefalorraquidiano (CSF). A aparência deste fluido é cristalina e incolor, onde qualquer grau de coloração é habitualmente de origem patogénica (Conn, 2003). O CSF possui ainda, um pH próximo de 8 e baixa concentração de glucose, potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), bicarbonato e aminoácidos em relação ao plasma. Os níveis de folato são 2 a 3 vezes superiores no CSF do que no plasma e a quantidade de transtirretina (TTR) corresponde a 25% do volume total deste fluido (Emerich, Skinner et al. 2005). Os principais componentes iónicos que constituem o CSF são Na^+ , Cl^- e HCO_3^- (Conn, 2003).

O CP é responsável pela nutrição de todo o sistema nervoso central (SNC), através da renovação do CSF, fornecendo micronutrientes, neurotrofinas, neuropéptidos e factores de crescimento. É também responsável pela protecção do mesmo, regulando o ambiente bioquímico extracelular e prevenindo a acumulação de produtos tóxicos do metabolismo cerebral (Redzic and Segal 2004; Emerich, Skinner et al. 2005); Estima-se que, sejam produzidos ao longo do dia aproximadamente 600 mL de CSF, no ser humano adulto, o suficiente para repor 3 a 4 vezes o volume total deste fluido (Emerich, Skinner et al. 2005). A formação do CSF não resulta apenas de uma filtração passiva de fluidos através das células epiteliais do CP, mas sim da sua secreção activa através destas (Conn, 2003).

O CP é dotado de uma distribuição única dos seus transportadores e canais iónicos entre a membrana apical e a membrana basolateral das células epiteliais, como se pode observar na figura 3.

A bomba sódio-potássio ATPase, localizada apenas na face apical das células e desempenha um papel pivotal na produção de CSF, através da hidrólise do ATP, que fornece a energia necessária para criar o gradiente de iões Na^+ que directa ou indirectamente dirige vários processos de transporte (Conn, 2003; Redzic and Segal, 2004).

O transporte activo primário de Na^+ das células epiteliais do CP para o CSF, no interior dos ventrículos, mantém o Na^+ intracelular a uma concentração baixa (20-30mM) relativamente à sua concentração extracelular que é cerca de 140mM (Conn, 2003).

Desta forma, gera-se um gradiente transmembranar aos iões Na^+ na face basolateral das células, que actua como força motriz para o transporte secundário destes iões para o espaço intracelular, com troca de iões H^+ . A actividade coordenada da captação de iões Na^+ pela face basolateral e a saída destes pela face apical (através da bomba de co-transporte $NaK2Cl$) assegura o fluxo contínuo e unidireccional destes iões (Conn, 2003; Redzic and Segal, 2004).

Os iões potássio, K^+ , movem-se de acordo com o gradiente electroquímico e a água acompanha o fluxo de saída destes iões através da membrana apical.

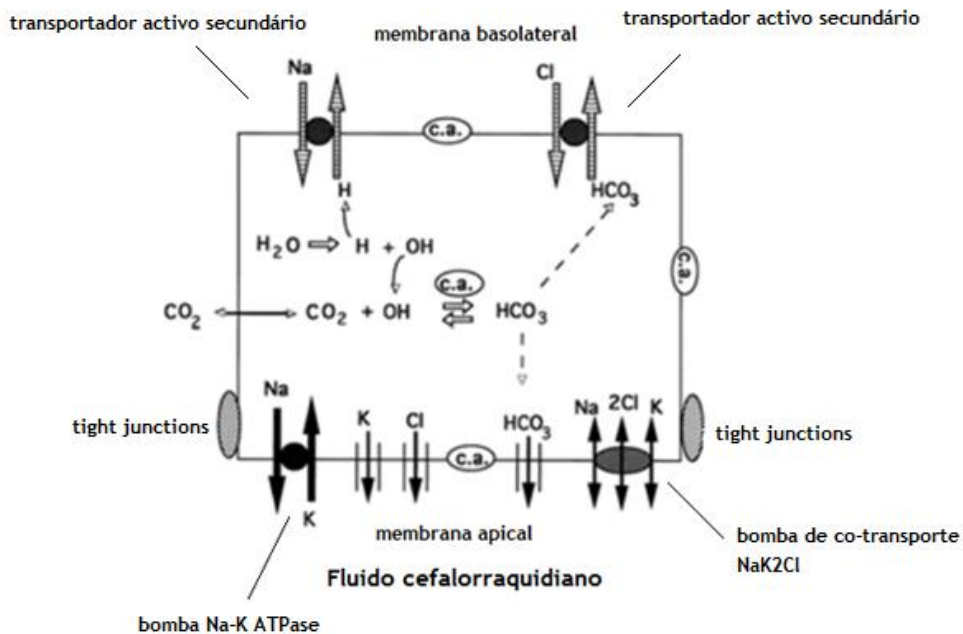


Figura 3- Representação esquemática da localização dos transportadores de íons na membrana celular plexo coróide. Adaptado de Conn, 2003.

Em relação aos íons Cl^- , estes movem-se para o interior das células epiteliais através do transporte activo secundário com a troca de moléculas HCO_3^- para o sangue. Estas últimas são amplamente geradas no interior das células a partir da hidratação do CO_2 , reacção catalisada pela anidrase carbónica (Conn, 2003; Redzic and Segal, 2004).

O Cl^- e HCO_3^- que se acumulam nas células epiteliais do CP, movem-se para o CSF ventricular através de canais iónicos e/ou através do transporte mediado por proteínas, como a NaK_2Cl , que facilita a sua saída. O movimento de moléculas de água para a formação de CSF, está intimamente ligado ao transporte de íons para as cavidades ventriculares e é facilitado por canais de aquaporina 1 (Brown et al, 2004).

Os vários transportadores representados na figura 3 participam na formação do CSF e simultaneamente ajudam a regular o volume das células epiteliais do CP e a homeostasia iónica do CSF (Conn, 2003).

1.1.2.2 CP e o seu papel na síntese proteica, protecção e defesa do SNC

Para além da função de secreção do CSF, o CP é um tecido alvo da acção de neuropéptidos, sendo ainda um produtor dos mesmos. Na tabela 1 encontra-se alguns dos neuropéptidos produzidos pelo CP.

Tabela 1 - Alguns exemplos de neuropéptidos produzidos pelo Plexo coróide. Chodobski and Szmydynger-Chodobska, 2001

| Citocinas | Hormonas | Factores de crescimento |
|---|-------------------------------|---|
| Interleucina 1 e 1β | Angiotensina II | Factor de crescimento derivado da insulina |
| Interleucina 6 | Péptido natriuretico arterial | Factor neurotrófico derivado das células do cérebro |
| TNF α | Vasopressina | Factor de crescimento transformador β |
| | Hormona de crescimento | Factor de crescimento vascular endotelial |
| | Insulina | |
| | Leptina | |
| | Prolactina | |

A TTR, também conhecida como pré-albumina é uma das proteínas produzida pelo CP, responsável pelo transporte das hormonas tiroideias, T3 e T4, através do SNC. É ainda responsável pela formação de complexos estáveis com a proteína β -amiloide, sequestrando-a e prevenindo a formação de agregados insolúveis sobre o cérebro. A proteína β -amiloide é um marcador molecular que caracteriza a doença de Alzheimer, (Costa et al, 2008).

Para além da produção dos neuropéptidos, o CP expressa ainda os receptores específicos destes, sugerindo que, desenvolva acções autocrinas e parácrinas sobre as suas células epiteliais. Por outro lado, o CP pode ainda promover efeitos do tipo endócrino, uma vez que os neuropéptidos libertados para o CSF podem causar efeitos sobre células alvo no encéfalo (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Emerich, Skinner et al. 2005).

O metabolismo das drogas refere-se, à modificação bioquímica ou degradação, geralmente através de sistemas enzimáticos especializados. Um vasto conjunto de enzimas deste tipo de metabolismo (de fase I, II e III), é também produzido pelo CP, sendo responsáveis pela desintoxicação do SNC e protecção de agressões neurotóxicas agudas (Gherzi-Egea and Strazielle 2001; Emerich, Skinner et al. 2005). O metabolismo das drogas geralmente converte compostos químicos lipofílicos em produtos mais prontamente excretados. Durante as reacções de fase I, são catalisadas desalquilações ou deshalogenações a compostos potencialmente perigosos para o sistema nervoso, como os xenobióticos,

podendo ainda ocorrer a adição de grupos hidroxilo aos seus substratos. Na fase II são adicionados grupos hidrofílicos a estes xenobióticos, para que sejam mais facilmente excretados durante a fase III pelos transportadores orgânicos de iões e proteínas resistentes a drogas.

As enzimas de fase I incluem o citocromo P-450, enzimas de oxidação como a monoamina oxidase, envolvida em vias metabólicas endógenas e redutases, como a NADPH-citocromo P-450 redutase, responsável pela redução de compostos nitroderivados.

As reacções de oxidação-redução, que ocorrem durante fase I, podem levar à formação de metabolitos reactivos, como epóxidos e radicais livres de oxigénio que são inactivados, por enzimas como a epóxido hidrólase e pelas enzimas de fase II como as glutathionas peroxidase, redutase e transferase e o superperóxido dismutase, que desempenham um papel antioxidante na protecção do encéfalo (Gheris-Egea and Strazielle 2001).

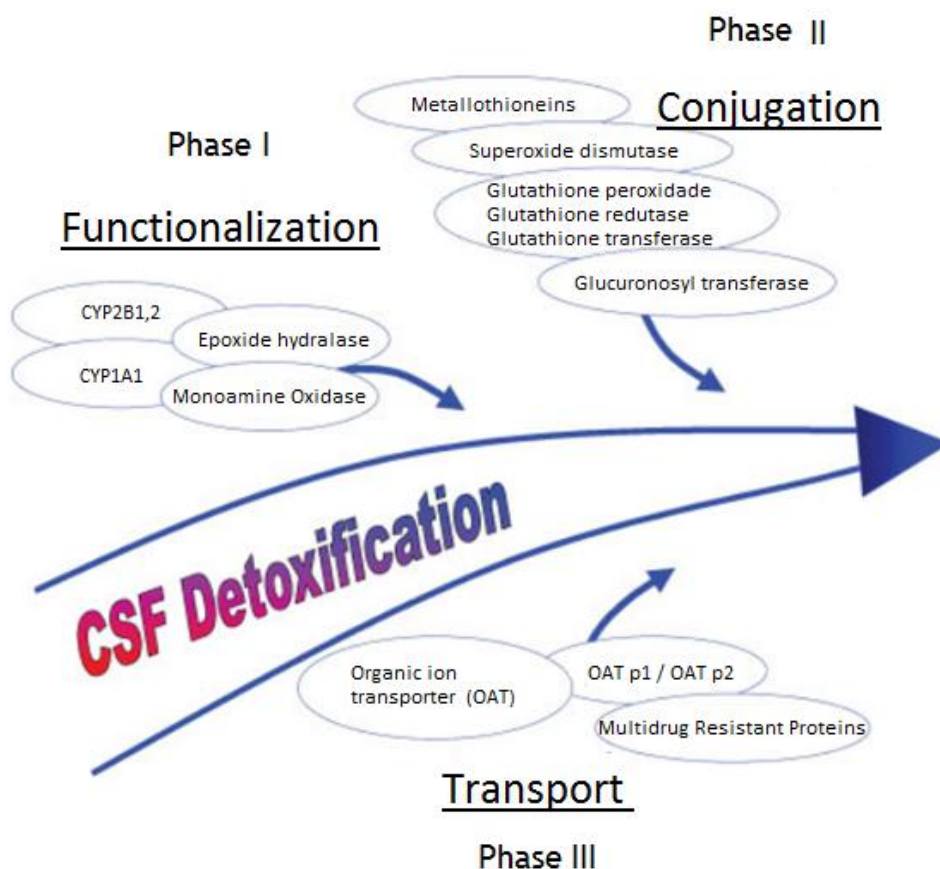


Figura 4 - Representação esquemática do papel desempenhado pelas diferentes proteínas existentes no plexo coroide. Adaptado de Emerich et al., 2005.

O CP realiza ainda funções neuroimunes, uma vez que possui células linfóides induzíveis que, após a administração sistêmica de lipossacarídeos ou de interleucina 6 (IL6), levam rapidamente à indução de interleucina 1 B (IL-1B) e factor de necrose tumoral α (TNF α). Esta activação inicia um processo que se propaga por todo o cérebro, sugerindo que o CP estabeleça uma ponte entre o sistema imune e o encéfalo, promovendo a indução local e coordenada de citocinas pro-inflamatórias.

O CP expressa ainda moléculas MHC classe I e II (“Major Histocompatibility Complex I e II”) e é responsável pela apresentação antigénica estimulando a proliferação dos linfócitos T.

Esta capacidade implica que o CP, seja em parte, considerado como um sistema de sobrevivência intrínseco, que promove a protecção do SNC (Emerich, Skinner et al. 2005).

1.1.2.4 O papel do CP no desenvolvimento do sistema nervoso central

O CP é um tecido que se desenvolve rapidamente durante a embriogénese e por volta da sétima semana de gestação já executa as suas funções primárias, controlando o ambiente bioquímico extracelular do SNC. Este é responsável pela secreção de factores de crescimento que modelam e organizam o crescimento do SNC, como o factor de crescimento derivado da insulina II (IGFII), que se encontra em elevada concentração no CP do embrião.

Miyan e seus colaboradores (2002, 2003) destacam ainda que o CP desempenha um papel importante ao promover a distribuição de factores de crescimento solúveis no CSF para todo o SNC durante o desenvolvimento embrionário (Emerich, Skinner et al. 2005)

1.1.2.5 O plexo coróide durante o envelhecimento

O envelhecimento provoca alterações físicas no CP que condicionam a sua função, observando-se, uma diminuição de 10 a 12%, no peso das células epiteliais coróideas.

Ao nível celular observa-se também uma alteração da forma redonda do núcleo para uma forma irregular, achatada com espessamento da membrana basal. O estroma que envolve as células epiteliais sofre também um espessamento, devido à deposição de fibras de colagénio, corpos de hialina e calcificações e os vasos sanguíneos que sustentam as células epiteliais e a lâmina própria, sofrem também um espessamento e fragmentação.

Ao nível metabólico, a síntese de enzimas essenciais para manter o metabolismo da respiração anaeróbia e fosforilação oxidativa diminui drasticamente, onde por exemplo as enzimas lactato desidrogenase e a succinato desidrogenase sofrem uma diminuição de 9% e 26% respectivamente.

A redução do número de co-transportadores $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ e $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ é também uma consequência do envelhecimento do CP. Por outro lado, o número de células epiteliais deficientes em citocromo c

oxidase aumenta, provocando alterações na cadeia respiratória mitocondrial, o que, por sua vez, diminui a produção de ATP.

Todas estas modificações anatómicas e enzimáticas têm como consequência a diminuição da produção e da renovação de CSF. A distribuição de substâncias nutritivas para o encéfalo e a remoção dos compostos tóxicos do metabolismo cerebral, pode assim, tornar-se inadequada, comprometendo a correcta actividade do SNC (Emerich, Skinner et al. 2005).

1.2 O sistema olfactivo

O sistema olfactivo detecta substâncias químicas presentes no ambiente e, do um ponto de vista evolutivo, é um dos sentidos mais antigos (Purves et al., 2005).

O olfacto encontra-se relacionado com processos de reconhecimento, comunicação, aprendizagem, protecção e defesa do ser vivo, uma vez que funciona como um sistema de alerta acerca do meio envolvente (Marieb and Hoeh, 2008).

Para o homem, os odores fornecem informações sobre alimentos, sobre si próprios ou sobre outras pessoas, sobre animais ou plantas e sobre muitos outros aspectos do meio ambiente. A informação olfactiva pode influenciar o comportamento alimentar, as interacções sociais e para muitos animais, a reprodução (Purves et al., 2005).

1.2.1 Composição celular do epitélio olfactivo

O epitélio olfactivo (EO) situa-se sobre o tecto da cavidade nasal (figura 5) é caracterizado como um epitélio pseudoestratificado colunar e apresenta uma cor amarelada (Marieb and Hoehn, 2008).

A maioria dos autores identifica apenas 3 principais tipos celulares presentes no epitélio olfactivo, sendo eles: os neurónios sensoriais olfactivos (OSN), as células de suporte e as células basais (figura 6).

No entanto sabe-se que os OSN sofrem regeneração ao longo da vida adulta o que leva os investigadores a concluir que estes neurónios se diferenciam a partir de células estaminais (Menini, 2010).

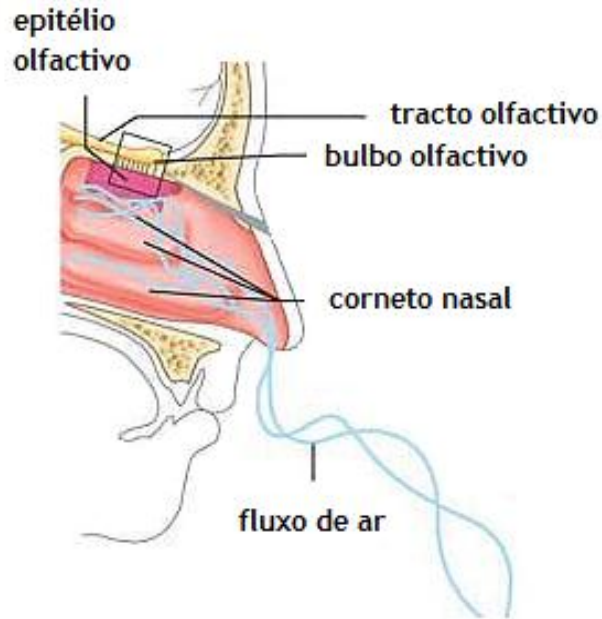


Figura 5- Localização do epitélio olfactivo na cavidade nasal. Adaptado de Marieb and Hoehn (2008).

Os OSN são neurónios bipolares, que projectam uma única dendrite para o lúmen do epitélio olfactivo, onde os odores inalados a partir do ar inspirado são captados por cílios.

Os cílios olfactivos sensoriais são ricos em receptores de odores e em componentes de sinalização celular responsáveis pelos eventos iniciais da transdução olfactiva.

Na outra extremidade do neurónio, um único axónio não ramificado projecta-se através da lâmina basal e da placa cribiforme, do osso etmóide do nariz, até ao cérebro, mais especificamente até ao bulbo olfactivo. A extremidade axonal que atinge o bulbo olfactivo estabelece sinapses com as dendrites das células mitrais que se encontram no interior do glómérulo (Ronnett and Moon 2002).

Os OSN envelhecem e morrem ao longo da vida a uma taxa regular sendo renovados através da diferenciação das células basais globoides e das células estaminais (Ronnett and Moon, 2002; Menini, 2010). Assim que atingem a sua maturidade os OSN movem-se apicalmente no EO, o que permite determinar a idade neuronal dos OSN através da sua posição no epitélio (Ronnett and Moon 2002).

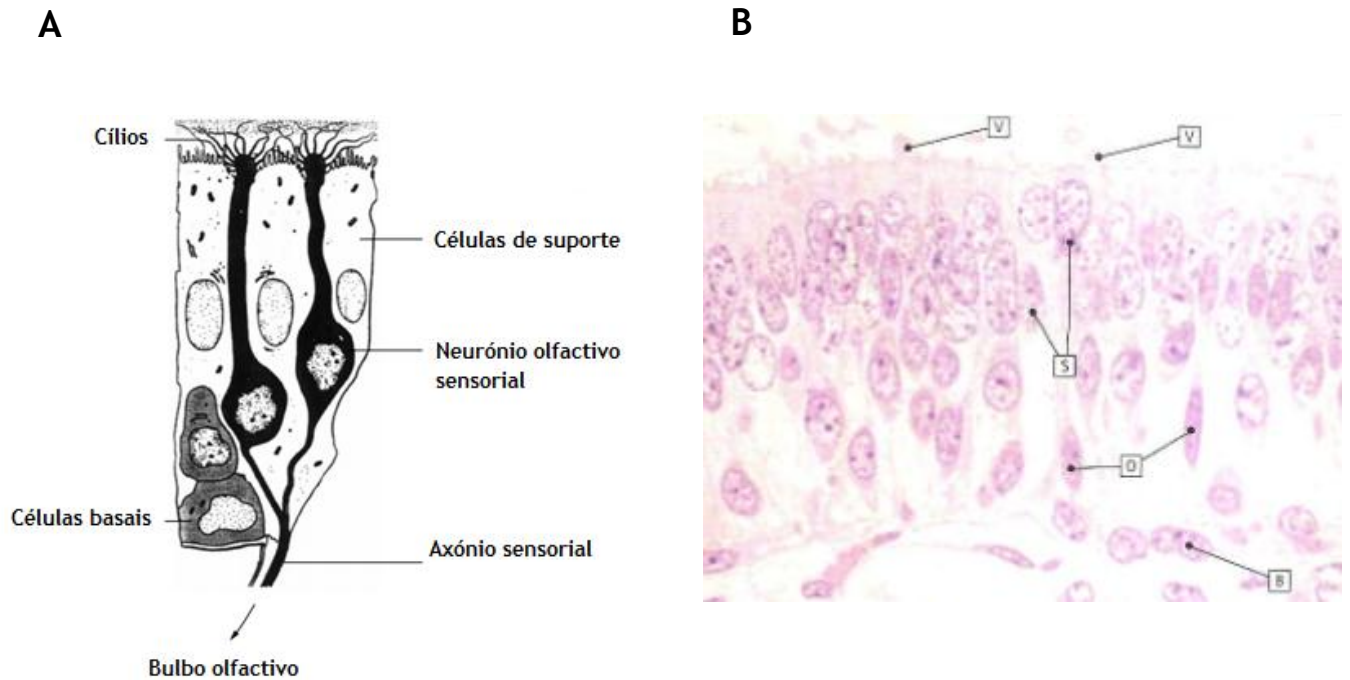


Figura 6 - Representação dos diferentes tipos celulares que constituem o epitélio olfativo. (A) - imagem esquemática adaptada de Dryer and Berghard. (B) - imagem histológicas do epitélio olfativo adaptada de Stevens and Lowe (1997) (V): vesículas; (S): células de suporte; (O): neurónios olfactivos; (B): células basais.

As células de suporte partilham características comuns com a glia porque, suportam e isolam electricamente os OSN e secretam moléculas e enzimas desintoxicantes para o muco nasal. Estas células possuem ainda uma elevada concentração de enzimas tipo citocromo P450, que poderão estar envolvidas na modificação conformacionais dos odores, de forma a torná-los menos permeáveis ou mesmo inactivando-os, evitando assim a transdução do sinal.

Estudos recentes indicam que as células de suporte são ainda responsáveis pela produção de factores de crescimento importantes para o desenvolvimento dos OSN.

Em relação às células basais, estas envolvem os OSN e dividem-se em 2 classes gerais: as células basais globoides e as células basais horizontais. As células globoides são células que apresentam uma forma arredondada enquanto as células horizontais são morfologicamente achatadas.

Comparados com outros tipos de neurónios, os OSN possuem um tempo de vida curto, de alguns meses, porque formam uma interface entre o meio externo e o meio interno, encontrando-se por isso, muitas vezes em contacto com agentes tóxicos e infecciosos. Dado que se dá a renovação dos OSN ao longo de toda a vida, o papel das células basais globoides no fornecimento de novos OSN é crucial para manter intacto o sentido do olfacto e a transdução olfactiva (Ronnelt and Moon 2002).

Outros autores identificaram ainda a presença de células estaminais no compartimento basal do EO, que afirmam ser o primeiro estágio de diferenciação da linhagem neuronal (Menini, 2010).

1.2.2 Características gerais da transdução olfactiva

O sistema olfactivo encontra-se estruturalmente bem adaptado para desempenhar correctamente a sua função (Ronnnett and Moon 2002 ; Menini, 2010).

Os primeiros eventos da detecção de odores ocorrem ao nível da membrana ciliar dos OSN, que se mantêm em contacto directo com odores inalados. A detecção ocorre quando o odor interage com os receptores olfactivos (OR) expressos pelos OSN, gerando um sinal que é transmitido centralmente.

O OR activa por sua vez a subunidade α , da proteína G, a G α olf, à qual se encontra acoplado.

Esta subunidade proteica activa a adenil ciclase tipo III (AC III), predominantemente expressa nos OSN, que catalisa a produção de cAMP a partir de ATP (Ronnnett and Moon 2002; DeMaria and Ngai 2010; Menini, 2010).

Estudos electrofisiológicos e bioquímicos confirmam que o cAMP é o mensageiro chave na fase inicial da detecção do odor (Ronnnett and Moon 2002).

O aumento do cAMP intracelular promove a abertura dos canais nucleotídicos cíclicos (CNC), localizados também na membrana ciliar, provocando a despolarização dos OSN pelo influxo de Ca^{2+} e Na^+ (Ronnnett and Moon 2002; DeMaria and Ngai 2010; Menini, 2010). A despolarização inicial é posteriormente amplificada pela activação dos canais de cloro, os quais são activados pelo aumento do Ca^{2+} intracelular (Menini, 2010).

A despolarização propaga-se por todo o OSN levando à abertura dos canais iónicos sensíveis à voltagem presentes no neurónio. O “disparo” dos potenciais de acção e a libertação dos neurotransmissores ocorre no terminal sináptico, no glomérulo, no bulbo olfactivo (DeMaria and Ngai 2010).

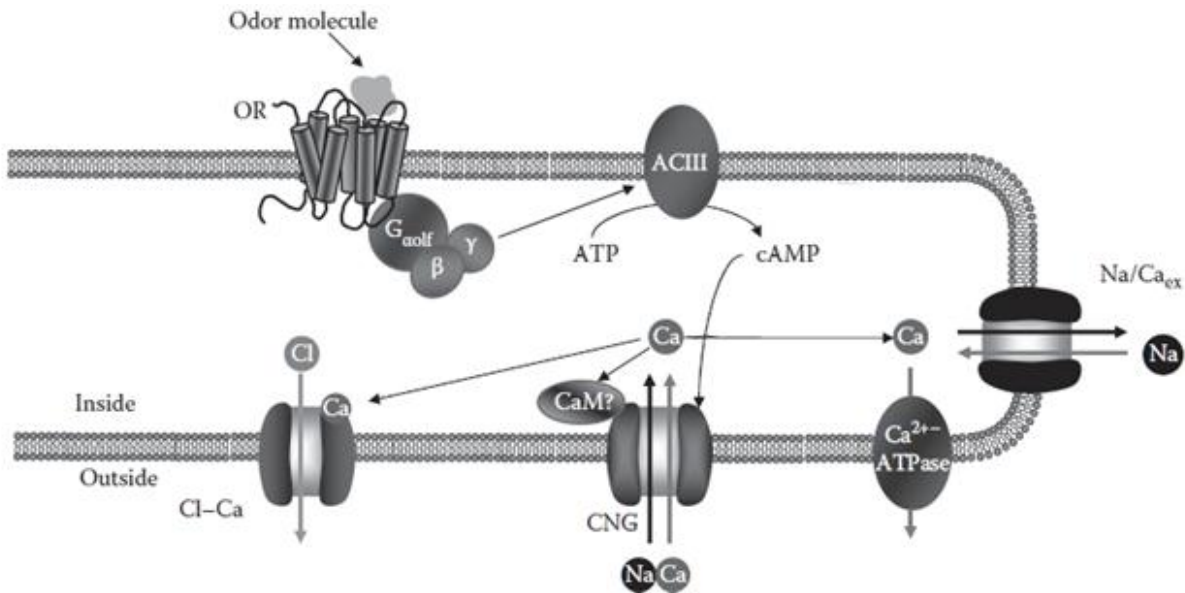


Figura 7 - Transdução de sinal da detecção dos odores nas membranas ciliares dos OSN. Adaptado Menini, 2010.

1.2.3 Componentes essenciais da via da transdução olfactiva

1.2.3.1 Receptores olfactivos

Estudos na área da biologia molecular permitiram identificar, em 1991, uma grande variedade de famílias génicas de receptores olfactivos, estreitamente relacionados entre si.

Os receptores olfactivos são expressos nos cílios dos OSN e encontram-se acoplados à proteína G (Ronnelt and Moon 2002; DeMaria and Ngai 2010) Menini, 2010).

Estruturalmente, os receptores olfactivos são proteínas com 7 domínios transmembranares, hidrofóbicos, que diferem em algumas sequências de aminoácidos, especialmente nas que formam os domínios transmembranares III, IV e V, sugerindo que estes sejam os responsáveis pela discriminação dos diferentes odores (DeMaria and Ngai 2010; Menini, 2010).

A capacidade do sistema olfactivo distinguir uma elevada variedade de moléculas depende largamente do facto de existirem aproximadamente 1000 genes de OR's, que correspondem a 1% do genoma total dos mamíferos (Pluznick, Zou et al. 2009).

Comparando com outras espécies, o genoma humano apresenta uma grande frequência de pseudogenes de OR's (Ronnelt and Moon 2002).

Os genes que codificam os OR podem ser classificados em duas classes distintas tendo em conta a sua sequência de aminoácidos e a sua distribuição filogenética. A classe I dos OR foi inicialmente

identificada em peixes, sapos e mais tarde em golfinhos, espécie que apenas possui OR's de classe I. Animais semiaquáticos, como os sapos possuem tanto genes de OR de classe I como de classe II. Inicialmente pensava-se que os mamíferos não codificassem OR de classe I, sugerindo que os OR's de classe I sejam especializados no reconhecimento de odores solúveis na água.

Os OR de classe II, por sua vez são responsáveis pela detecção dos odores transportados pelo ar.

Estudos recentes identificaram na espécie humana e ainda em outras espécies de mamíferos a presença de OR de classe I (Ronnett and Moon 2002; Menini, 2010).

Na espécie humana, todos os OR's de classe I pertencem a uma única família génica, onde apenas metade destes OR's parecem ser funcionais, por outro lado, os OR's que pertencem à classe II localizam-se em mais do que um cromossoma (Ronnett and Moon 2002).

1.2.3.2 G_{olf} e ACIII

A proteína de ligação à Guanina, proteína G, possui um importante papel na transdução de sinal de diferentes vias de sinalização (Wackym, Cioffi et al. 2005). Esta proteína é constituída por 3 subunidades (α , β e γ), formando um complexo proteico que se localiza sobre a membrana celular (Hurowitz et al., 2000; Menini, 2010).

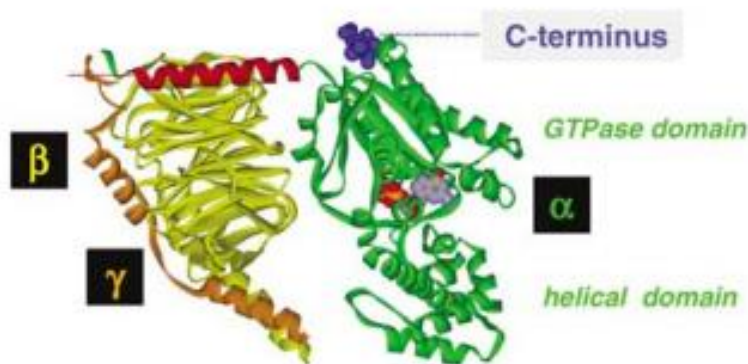


Figura 8 - Representação esquemática dos domínios que constituem a proteína G. Adaptado de Milligan and Kostenis, 2006.

O OR está acoplado à proteína G que interage com moléculas efectoras, como a adenil ciclase III e a fosfolipase C, que induzem fenómenos de transdução de sinal como a síntese de cAMP, a mobilização do Ca^{2+} intracelular e a indução de potenciais de membrana (Hurowitz, Melnyk et al. 2000).

As subunidades β e γ formam um heterodímero que se dissocia apenas em condições de desnaturação, representando assim, um monómero funcional.

Por outro lado, a subunidade α da proteína G interage tanto com o receptor como com as moléculas efectoras da cascata de sinalização, sendo por isso considerada o componente funcional do complexo proteico da proteína G (Wackym, Cioffi et al. 2005).

A subunidade α da proteína G possui um peso molecular de 45 kDa enquanto as subunidades β e γ possuem pesos moleculares respectivamente de 35 e 8-10 kDa (Milligan and Kostenis 2006).

As proteínas G são categorizadas em 4 subfamílias de acordo com a homologia de sequências, estrutura génica e a regulação de moléculas efectoras específicas, isto é função da sua subunidade α (Hurowitz, Melnyk et al. 2000). Existem, portanto as proteínas Gas, Gai/o, G α q, e a proteína G α 12 (Wackym, Cioffi et al. 2005), onde a Gas é responsável pela activação da adenil ciclase, a Gai/o responsável pela inibição da adenil ciclase, a G α q é responsável pela da activação da fosfolipase C e a G α 12 responsável pela activação da fosfolipase D (Milligan and Kostenis 2006).

A G α olf é uma isoforma da subunidade α da proteína G, específica do EO, que se localiza na membrana ciliar e partilha 88% da homologia dos aminoácidos com a Gas, sendo por isso considerada um membro da família da Gas (Wackym, Cioffi et al. 2005).

Em homologia com o mecanismo de acção de outras proteínas G, após a ligação do odor ao receptor, a G α olf catalisa a reacção, por acção GTPase onde converte a guanidina 5' difosfato (GDP) a guanidina 5' trifosfato (GTP), dissociando-se das subunidades β e γ da proteína G para activar a ACIII (Menini, 2010). A adenil ciclase (AC) é uma proteína que produz cAMP, talvez a molécula mais largamente utilizada nas vias de transdução de sinal. Existem 9 tipos de AC do tipo transmembranar (ACtm) e já foi descrito um segundo tipo de AC, cuja actividade é regulada unicamente por aniões bicarbonato, com distribuição no citoplasma e nalguns organelos celulares (sAC) (Tresguerres et al., 2011). A ACtm possui 12 domínios transmembranares e ambas as extremidades C e N terminal, encontram-se viradas para o citoplasma da célula. O domínio catalítico da AC encontra-se localizado entre os domínios transmembranares 6 e 7 e é responsável pela conversão do ATP em cAMP (Menini, 2010).

No epitélio olfactivo é expresso o tipo III da AC que se encontra predominantemente nos OSN, apresentando um peso molecular de 200 kDa (Wei, Zhao et al. 1998).

1.2.3.3 Canais nucleotídicos cíclicos (CNC)

Nos cílios, a informação acerca das moléculas de odor é transmitida sob a forma de informação química que ao nível do canal nucleotídico cíclico (CNC) é convertida num sinal eléctrico, pela activação do fluxo iónico através da membrana plasmática (Menini, 2010).

Esta proteína membranar consiste em 4 subunidades: duas subunidades CNGA2, uma CNGA4 e uma CNGB1. Cada subunidade possui 6 domínios transmembranares (S1-S6) e uma região que forma o poro, entre os domínios S5 e S6.

O local de ligação do CNC encontra-se voltado para o citoplasma, perto do C-terminal de cada subunidade, onde o cAMP se liga alostericamente, conduzindo à sua activação (Menini, 2010).

A interacção entre o cAMP e o CNC permite a entrada de Ca^{2+} e Na^+ para o OSN provocando a sua despolarização, que é posteriormente amplificada com a abertura dos canais de Cl^- , induzida pelo aumento do Ca^{2+} intracelular (Purves et al., 2005; DeMaria and Ngai 2010).

Os OSN mantêm o Cl^- intracelular na mesma gama de concentração do Cl^- extracelular, presente no muco que envolve os cílios olfactivos, nestas condições fisiológicas, a abertura dos canais de Cl^- provoca a saída deste ião para o espaço extracelular, provocando um ganho de corrente que contribui para a total despolarização do neurónio (Menini, 2010).

1.2.4 Funções biológicas dos OR's nos tecidos olfactivos

Como anteriormente referido os OR desempenham um importante papel na detecção dos odores inalados a partir do meio envolvente. Apesar de todo o trabalho realizado nas últimas duas décadas, encontrar os ligandos específicos para esses receptores, esta é uma tarefa que se tem revelado surpreendentemente difícil. Sabe-se que variações na estrutura do ligando, como o tamanho da sua cadeia carbonada e o grupo funcional que o constitui, podem activar subconjuntos de OR distintos e conduzir a diferentes percepções do cheiro. No entanto, são necessários mais testes fisiológicos funcionais para se perceber como é que esta família de receptores é capaz de discriminar no meio de toda a variedade de químicos ambientais, qual o odor a que se ligou especificamente (DeMaria and Ngai 2010). Para além da função de detecção de odores, os OR possuem ainda o importante papel no direccionamento dos axónios dos OSN para o seu correcto glómulo, no bulbo olfactivo (Itakura, Ohno et al. 2006; DeMaria and Ngai 2010).

1.2.5 Transdução olfactiva noutros sistemas

Sabe-se que os receptores olfactivos não desempenham apenas a sua função quimiossensorial no epitélio olfactivo, encontrando-se também expressos em vários órgãos como coração em desenvolvimento, rim, placenta, espermatozóides, baço, língua e encéfalo (Itakura, Ohno et al. 2006; Pluznick, Zou et al. 2009).

1.2.6.1 Rim

O rim parece ser um órgão ideal para estudar a capacidade da maquinaria quimiossensorial olfactiva, já que este órgão tem que monitorizar de forma rigorosa a composição química do fluido tubular.

Por exemplo, pode ser benéfico para os rins ajustar as taxas de filtração, reabsorção e secreção em resposta a alterações dos níveis metabólicos. Assim como em resposta a níveis elevados de xenobioticos, promovendo a remoção destas substâncias, e de ácidos dicarboxílicos, de forma a evitar a formação de pedras nos rins. Não é de estranhar que o rim possua sensores químicos como os receptores olfactivos, de forma a regular a excreção destas substâncias. (Pluznick et al., 2008).

Pluznick et al. (2008) demonstraram a presença das proteínas que compõem a maquinaria olfactiva, no rim e provaram ainda que ratos deficientes numa das proteínas chave da transdução do sinal olfactivo são incapazes de regular convenientemente a taxa de filtração glomerular e os níveis plasmáticos de renina. Estes autores demonstraram que a ACIII e a Gαolf são expressas no rim, tanto ao nível do RNA como ao nível da expressão proteica, e que estas proteínas se localizam em segmentos comuns dos nefrónios (túbulo distal, na primeira porção do túbulo colector e nas células da macula densa). Em particular, a ACIII revelou uma distribuição citoplasmática e ao longo da superfície apical das células epiteliais dos túbulos renais.

Neste estudo, a presença dos OR's no rim ficou também comprovada, por RT-PCR e PCR de uma linha celular da mácula densa (Pluznick, Zou et al. 2009).

1.2.6.2.Placenta

A placenta é o primeiro órgão dos mamíferos a ser formado durante a embriogénese, criando uma interface entre o ambiente fetal e materno, sobre a qual se dão trocas de gases, nutrientes e de resíduos do metabolismo. Estas moléculas poderão actuar como ligandos específicos para os receptores olfactivos. A expressão generalizada dos membros da família dos OR's na placenta e noutros órgãos sugere que os OR's podem desempenhar outras funções para além do reconhecimento de odores.

É sabido que as proteínas dos OR's podem interagir, através dos seus domínios extracelulares com ligandos existentes nas células alvo, actuando como mediadores do reconhecimento celular, fulcral para a organogénese (Itakura, Ohno et al. 2006).

Várias linhas de investigação sugerem que moléculas de adesão celular como as integrinas e as caderinas, expressas pelo trofoblasto possuem um papel importante para limitar a invasão do embrião sobre as células maternas da decídua. Assim sendo, os OR's localizados nas células gigantes do trofoblasto podem reconhecer sinais específicos emitidos pelas células da decídua, induzindo a paragem da invasão das células do trofoblasto. Por outro lado os OR's podem funcionar ainda como receptores de superfície celular, permitindo a várias classes de pequenas moléculas atravessar a

placenta. Recentemente tornou-se evidente que a placenta não funciona apenas como um elemento passivo que permite as trocas entre o feto e a mãe, mas sim, como um órgão que produz um largo número de hormonas e factores de crescimento como a GH e a IGF assim como os seus receptores.

Estas hormonas e factores de crescimento são também produzidos pelo trofoblasto. Assim sendo, os OR's podem reconhecer essas pequenas moléculas na placenta como sinais ambientais do feto ou da mãe de forma a regular a síntese destas hormonas e factores de crescimento, de acordo com as necessidades momentâneas (Itakura, Ohno et al. 2006).

1.2.6.3. Espermatozóides

O espermatozóide é a célula reprodutora masculina responsável pela transmissão da informação genética relativa ao progenitor masculino. Esta célula é composta por uma cabeça, segmento intermédio e cauda e é capaz de se movimentar em direcção ao oócito que pretende fecundar.

A presença dos OR's nos espermatozóides há muito que é conhecida, apesar disso vários estudos têm sido desenvolvidos com o objectivo de relacionar o olfacto e os eventos da reprodução.

Spehr et al., 2003 estudou o papel desempenhado pelo receptor hOR17-4 na quimiotaxia (movimento directo através de substâncias químicas libertadas para o ambiente) do espermatozóide em direcção ao oócito. Para espécies cuja fertilização é externa, como os peixes e ouriços-do-mar, é fundamental que os espermatozóides consigam movimentar-se em direcção ao oócito, para que a sua fertilização aconteça com sucesso. Esta tarefa é conseguida através de uma combinação de transdução de sinais executados pelo espermatozóide maduro. Assim sendo, por um lado, deve existir uma sinalização que indique aos espermatozóides a direcção que estes devem tomar até ao oócito, por outro lado o próprio oócito secreta ligandos específicos, que podem ser detectados pelos receptores olfactivos presentes nos espermatozóides. Em espécies onde a fertilização é interna, como no caso dos mamíferos, o fenómeno de quimiotaxia entre oócito/espermatozóide é menos evidente (Vosshall 2004).

O OR hOR17-4 foi clonado em sistemas heterólogos e foram examinadas a suas preferências para os ligandos, tendo-se demonstrado que este responde fortemente a odores florais como o bourgoneal, a fragância dos lírios, e que é inactivado na presença do undecanal (Vosshall 2004).

Um estudo em espermatozóides humanos comprova a activação/desactivação do OR hOR17-4 na presença dos odores acima descritos e quimiotaxia em direcção ao bourgoneal. O receptor presente nos espermatozóides encontra-se igualmente expresso no epitélio olfactivo e testes funcionais mostram que desencadeia as mesmas respostas no nariz e no espermatozóide. Apesar de não se conseguir provar que o hOR17-4 medeia sozinho, as respostas olfactivas no espermatozóide os resultados obtidos até agora têm imensa importância (Vosshall 2004).

1.2.6.4. Plexo coróide

Um estudo de “microarrays”, realizado previamente no nosso laboratório, com o objectivo de analisar o efeito das hormonas sexuais no transcrito do CP de ratos, mostrou que existem uma série de vias de sinalização reguladas pelas hormonas, entre as quais a via de transdução olfactiva. Embora se saiba que a sinalização quimiossensorial tipo olfactiva ocorre noutros tecidos, estes foram os primeiros resultados indicativos da ocorrência deste tipo de transdução de sinal no CP.

2. Objetivo

Os componentes proteicos que constituem a via da transdução olfactiva foram já identificados em outros sistemas que não o olfactivo, embora o significado funcional não esteja ainda totalmente esclarecido.

Sabe-se ainda, de um estudo “microarrays” de cDNA, realizado previamente no nosso laboratório em CPs de de ratos *Wistar Han*, machos e fêmeas, que a via da transdução olfactiva é expressas no CP de ambos os géneros, e parece ser regulada pelas hormonas sexuais.

Neste contexto, o presente trabalho tem como principal objectivo comprovar a expressão das proteínas principais que constituem a via da transdução olfactiva no plexo coróide de rato, nomeadamente: ACIII, Gαolf e ORs 19, 63, 600, 620/624 e 1496.

A análise da expressão génica foi feita, ao nível de RNAm, por RT-PCR, PCR convencional e PCR em tempo real e ao nível da proteína por Western-blot em extractos de proteína total de CP de rato, por imunohistoquímica em cortes histológicos de CP de rato e por imunocitofluorescência em culturas primárias de células de CP de rato.

3. Materiais e métodos

3.1 Animais

Neste estudo utilizaram-se ratos adultos *Wistar Han*, machos e fêmeas, cujos pesos variavam entre 200 a 300 gramas. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente com ciclos de 12 horas de luz e escuro, em condições de alimentação com comida e água *ad libitum*. A sua manipulação foi executada segundo as normas recomendadas pela União Europeia (Directiva/63/EU).

Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (2:1), 100ul/100g do peso do animal e em seguida foram sacrificados com a guilhotina, aproveitando-se apenas a sua cabeça.

Recolheram-se os plexos coróides dos ventrículos laterais e o epitélio olfactivo, foi recolhido através do palato do animal, com uma incisão entre a primeira e a segunda crista do palato, como mostra a figura 9. Os tecidos recolhidos serviram para diferentes abordagens: uma parte foi fixada em paraformaldeído a 4% (PFA) (Panreac), para posterior preparação de lâminas histológicas, outra parte foi congelada em azoto líquido e posteriormente conservada a -80°C para posterior isolamento de RNA total e de proteínas.

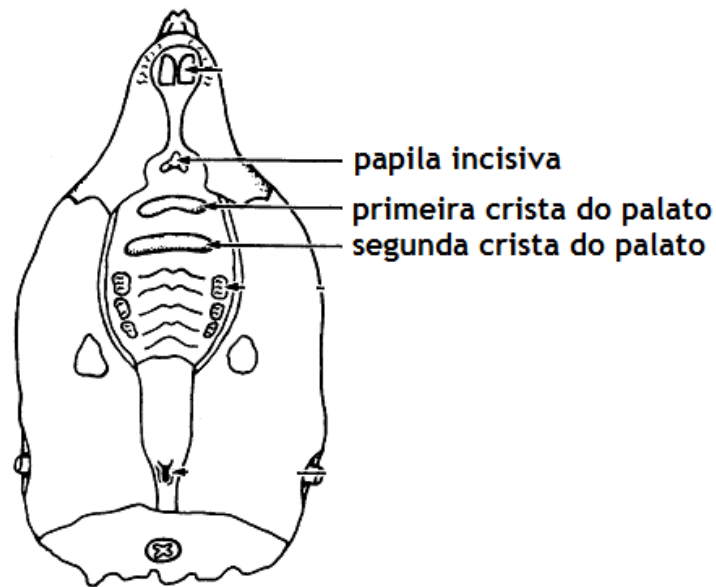


Figura 9 - Ilustração do local de incisão para extração de epitélio olfativo. Adaptado de Uraih and Maronpot, 1990.

3.2 Extracção de RNA total

A molécula de RNA é extremamente lábil pelo que as manipulações de extracção de RNA foram efectuadas a 4°C, por forma a manter a estabilidade das moléculas.

Dos reagentes utilizados para a extracção de RNA, o Trizol, ou reagente TRI (Sigma-Aldrich, Inc), consiste numa solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que permite a lise celular, libertando para a solução o RNA sem que a sua integridade seja comprometida.

O volume de Trizol a usar é calculado em função da massa de tecido ou número de células que se pretende manipular. O clorofórmio (Merck) permite a remoção dos restos de fenol e a separação da solução em duas fases, a orgânica, de cor rosa, que contém as proteínas desnaturadas e a fase aquosa, transparente, onde se encontra o RNA. Por fim o isopropanol (Fisher) permite a precipitação do RNA, de forma a que este possa ser recuperado.

As lavagens do RNA devem ser feitas em etanol frio 75% DEPC (dietilpirocarbonato - agente alquilante e inibidor de RNAase), e a sua reidratação em água DEPC.

No final do procedimento deve analisar-se a integridade do RNA numa electroforese em gel de agarose a 1% onde um RNA integro deve apresentar 2 bandas distintas: 18S e 28S, onde a primeira deve ter aproximadamente o dobro da intensidade da segunda.

A quantificação é feita posteriormente num espectrofotometro, medindo-se a absorvância a 260nm. O rácio ideal das absorvâncias 260nm/280nm, que a amostra de RNA deve apresentar deve encontrar-se entre 1,8 e 2,1. Rácios inferiores a 1,8 indicam contaminação com proteínas ou com fenol.

3.2.1 A partir de plexo coróide de rato

Realizou-se a lise dos dois plexos coróides laterais de rato com TRI (Sigma-Aldrich, Inc), de acordo com as instruções do fabricante. De seguida, com o auxílio de um minipilão, o tecido foi triturado até ficar bem homogeneizado e incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente.

Foram adicionados 60 µl de clorofórmio por cada mL de TRI utilizado, homogeneizou-se a mistura por inversão 2 a 3 vezes e procedeu-se a uma centrifugação a 12000g durante 15 minutos, 4 °C (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen), da qual se obteve uma solução com 3 fases distintas, a fase aquosa, de cor transparente, a interfase e a fase orgânica cor-de-rosa. Recolheu-se a fase aquosa para um novo microtubo de 1,5mL, à qual se adicionou 150 µL de isopropanol por cada mL de TRI utilizado. Homogeneizou-se a mistura e deixou-se incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Após uma centrifugação a 12000 g, durante 10 minutos a 4°C (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen), removeu-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento de RNA com 500 µL de etanol 75% DEPC frio.

Após nova centrifugação a 7500g, durante 5 minutos a 4°C (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen), voltou-se a descartar o sobrenadante e o sedimento de RNA foi seco ao ar durante 4 a 5 minutos.

O sedimento contendo RNA foi reidratado com 10 μ L de água DEPC e aquecido durante 2 minutos a 50°C, para ajudar a sua solubilização (SBH130D, Stuart).

O RNA foi analisado através de uma electroforese em gel de agarose a 1%, quantificado no Espectrofotometro (NanoPhotometer™, Implen) e armazenado a -80°C.

3.2.2 A partir de epitélio olfactivo de rato

A extracção do RNA do epitélio olfactivo seguiu o mesmo protocolo, com algumas alterações que tiveram em conta as características do tecido, que consiste num epitélio com camada mucosa e matriz extracelular extensa. Assim sendo, após congelamento em azoto líquido, o tecido foi triturado mecanicamente com um pilão e almofariz e colocado num microtubo de 1,5 mL.

Após a adição do TRI e homogeneização com a ajuda de um minipilão, fez-se um passo adicional, que consistiu numa centrifugação a 12000g durante 10 minutos a 4°C, com o objectivo de quebrar toda a matriz extracelular do tecido. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi removido e transferido para um novo microtubo de 1,5mL, seguindo-se o protocolo anteriormente descrito.

3.3 Síntese de cDNA por RT-PCR

A síntese de cDNA consiste numa reacção enzimática que permite, a partir do RNA total de um determinado tecido, obter uma cadeia dupla de DNA complementar à sequência de RNA.

A síntese de cDNA é conseguida pelo uso da transcriptase reversa, uma enzima de origem viral, que a partir de um oligonucleotídeo iniciador, sintetiza uma cadeia de DNA a partir da molécula de RNA, originando no final de reacção uma molécula em cadeia dupla que pode ser amplificada por PCR convencional. O protocolo de síntese de cDNA inicia-se com a desnaturação do RNA, a 65°C, seguindo-se a hibridação dos iniciadores (hexonucleotídeos de sequência aleatória -“ random primers”) ao RNA, a 37°C, terminando com a polimerização a 70°C.

3.3.1 A partir de RNA de plexo coróide e de epitélio olfactivo de rato

Para a síntese das cDNA foram preparadas duas misturas com todos os componentes (mix 1 e mix 2), cujo volume é referente ao número de amostras utilizadas mais uma (n+1).

A mix 1 era composta por “random primers” (0.09 unidades/ μ l, a uma OD de 260, em 3 mM Tris-HCl, pH 7.0 e 0.2 mM EDTA, Invitrogen) e desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's) (concentração final 0,4mM, Fermentas). A mix 2 consistia em tampão First Strand 5x (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ (Finnzymes) e DTT (concentração final 0,008 mM).

Para cada síntese, foram utilizados, 4 µL da mix 1, um volume de RNA total correspondente a 300ng e água estéril até um volume final de 9µL.

Os microtubos foram colocados no termociclador (T Professional Basic Gradient , Biometra) durante 5 minutos a 65°C e em seguida no gelo.

Adicionaram-se 6 µL da mix 2 e incubaram-se durante 2 minutos a 37.

Adicionou-se por fim 1 µL de M-MLV RT (200U/µL, Invitrogen) e colocaram-se 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C e finalmente 15 minutos a 70°C.

3.4 Amplificação enzimática de DNA (PCR)

Para estudar no CP a expressão dos genes ACIII e Gaolf, ao nível do RNA, usou-se a técnica de PCR, com “primers” específicos e descritos por Pluznick et al.,2008, e Itakura et al., 2006, cuja sequência se encontra representada na tabela 2.

Como controlo positivo da reacção de PCR usou-se cDNA de epitélio olfactivo (OE) de rato, tecido onde se sabe serem expressos os genes em estudo.

Após a optimização da reacção de PCR, elegeu-se uma temperatura de “aneeling” de 55°C e uma concentração final de 3mM de MgCl₂. O resultado das reacções de PCR foi analisado por electroforese em gel de agarose a 1,5%. Os produtos de PCR foram purificados, por utilização do Kit Wizard® SV Gel end PCR Clean-Up System (Promega) seguindo-se as recomendações do fabricante, e posteriormente sequenciados pelo método de Sanger (Stabvida, Portugal).

Tabela 2- Sequências dos primers ACIII e Gaolf e tamanhos dos fragmentos obtidos nas reacções de PCR

| Designação | Primer | Sequência | Tamanho |
|------------|--------|----------------------|---------|
| ACIII | “FW” | CTGGCAGTATGATGTATGG | 197 bp |
| | “RV” | AGGCAATGATGAGGTAGG | |
| Gaolf | “FW” | GAAGCAGTTGCAGAAAGAGC | 285 bp |
| | “RV” | TGGGAATATTCAAAGTCAGT | |

3.4.1 Detecção de ACIII e Gaolf

A reacção de PCR foi realizada com 2 μ L de cDNA sintetizado a partir de CP ou de epitélio olfactivo de rato. Num volume total de 25 μ L juntou-se: tampão da Taq 1X (Invitrogen), dNTs a 0,4 mM (Fermentas), $MgCl_2$ a 3mM (Finnzymes), 0,4 pmol de cada “primer” (Fw e RV) da ACIII e Gaolf (tabela1) e 0.4U Taq DNA polimerase (Invitrogen) e perpez-se o volume final com água estéril.

As reacções foram efectuadas no termociclador (T Professional Basic Gradient, Biometra) com o seguinte programa: 5 minutos a 95 °C seguindo-se 35 ciclos, de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C e um passo de extensão final de 72°C durante 5 minutos.

3.5 PCR em tempo real com sondas Taqman

O PCR em tempo real permite detectar e quantificar, em tempo real, os produtos amplificados no decorrer da reacção.

Para a detecção usa-se uma molécula química que emite um sinal de fluorescência cuja intensidade é proporcional à quantidade de DNA gerado ao longo da reacção de PCR.

Os compostos mais comuns são o SYBR Green (agente intercalante nas moléculas de DNA em cadeia dupla neoformadas) e as sondas TaqMan (que emitem fluorescência após hibridação e degradação).

O SYBR Green intercala-se na cadeia dupla do DNA e emite fluorescência de cor verde quando excitado pela luz do sistema óptico do termociclador. As sondas Taqman são oligómeros, específicos para a sequência a amplificar. Estas sondas estão marcadas numa das extremidades com um fluoróforo e na outra com um “quencher”, que absorve a energia luminosa emitida pelo fluoróforo e a dissipa, não permitindo a emissão de fluorescência enquanto a sonda estiver intacta. A actividade exonucleotídica 5'→3' da Taq DNA polimerase degrada a sonda Taqman, separando o quencher do fluoróforo, o que permite a emissão de fluorescência que pode ser detectada pelo software do aparelho.



Figura 10 - Ilustração das moléculas fluorescentes mais utilizadas na técnica de PCR real time, adaptado da Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 2004.

O gráfico da figura 10 ilustra a curva exponencial, típica de uma reacção de PCR, onde se salientam a fase exponencial e a fase “plateau”. Durante a fase exponencial, a quantidade de produto de PCR aumenta exponencialmente até que um dos reagentes fazendo com que a reacção abrande e entre na fase de “plateau”.

Inicialmente, a fluorescência emitida permanece em níveis de fundo contudo, à medida que os produtos de PCR vão sendo amplificados atinge-se um limiar que permite a detecção do sinal fluorescente. O número do ciclo, em que é iniciada a fase exponencial é denominado como ciclo de “threshold”, CT.

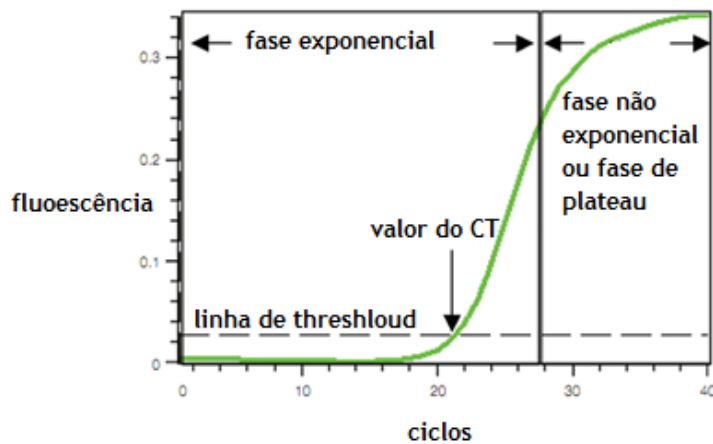


Figura 11 - Curva exponencial de uma reacção de PCR em tempo real (fluorescência vs. Número de ciclos) adaptado de Bio-Rad Laboratories, Inc , Real-Time PCR Applications Guide, 2006.

O valor CT de uma reacção é proporcional à quantidade de DNA existente no início da reacção: quanto maior a concentração de moléculas de DNA molde, menor o valor de CT. Esta relação constitui a base para o aspecto quantitativo do PCR em tempo real.

3.4.1 Detecção do OR 63 e OR 19

Utilizou-se o PCR em tempo real, com sondas Taqman comercializadas, para analisar a presença de mRNA de dois ORs no CP de rato: OR 63 e OR19. Numa mistura reaccional de 20 μ L foram adicionados 10 μ L de uma master mix constituída por tampão 10x, taq (Invitrogen), dNTPs (10mM, marca) e $MgCl_2$, 1 μ L de Primer's + sonda TaqMam (Applied)], 2 μ L de cDNA de CP e 7 μ L de água estéril.

A reacção de PCR iniciou-se com 3' de desnaturação a 95°C, seguindo-se 40 ciclos de 15'' a 95°C, 30'' a 60°C, e 45'' a 72°C.

3.5 Imunohistoquímica em lâminas histológicas de plexo coróide e de epitélio olfactivo

A imunohistoquímica (IMQ) é uma técnica que permite avaliar a expressão de proteínas em cortes histológicos, assim como a sua localização e distribuição celular. Esta técnica baseia-se na interacção antigénio-anticorpo, para a detecção da proteína em estudo, podendo o método de detecção ser directo ou indirecto. Na detecção indirecta o anticorpo primário liga-se especificamente à proteína de interesse e o anticorpo secundário, que possui afinidade para o primário, encontra-se ligado com a biotina. A biotina é uma molécula da classe das vitaminas, para a qual o complexo ExtrAvidin-Peroxidase possui elevada afinidade. A reacção catalisada pela peroxidase utiliza o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) como substrato e o DAB (Diaminobenzidina) como dador de electrões. A formação do complexo substrato-enzima leva à oxidação do DAB, o qual precipita, originando uma tonalidade castanha sobre a proteína de interesse. Na detecção pelo método directo é o anticorpo primário que se encontra ligado à biotina, não sendo necessária a utilização do anticorpo secundário.

A preparação adequada do tecido (extracção, fixação, desidratação, parafinação e corte) é crucial para o bom rendimento desta técnica.

Muitos tecidos necessitam que se realize um passo de recuperação antigénica, porque durante a fixação podem ocorrer ligações cruzadas entre proteínas, mascarando os epitopos antigénicos e impedindo que estes sejam detectados pelo anticorpo primário, o que diminui drasticamente a eficiência desta técnica. A recuperação antigénica pode ser induzida por dois métodos, o método enzimático ou o método térmico. Ambos actuam de forma a quebrar pontes de metileno, expondo os epitopos antigénicos ao anticorpo primário, para que se possa dar interacção entre eles.

Todas as incubações a que as lâminas histológicas estão sujeitas, devem ser realizadas num câmara húmida de forma a evitar que o tecido seque. As lavagens do tecido são feitas com PBS com Tween 20, um detergente que ajuda a lavar e a remover o excesso de anticorpo primário, evitando que se forme uma coloração de fundo muito forte.

Por norma realiza-se um pré-tratamento sobre o tecido, com H_2O_2 , que suprime a actividade das peroxidases endógenas, e ainda um bloqueio do tecido com BSA (albumina sérica bovina) e FBS (soro fetal de bovino), com o objectivo de inibir as imunoglobulinas endógenas, para que estas não interajam inespecificamente com o anticorpo secundário.

A tabela 3 mostra os anticorpos utilizados para a marcação das proteínas em estudo neste trabalho e as diluições utilizadas.

Tabela 3- Anticorpos primários utilizados para a detecção das proteínas ACIII, Gaolf e os OR's em CP e EO de rato, por imunohistoquímica

| Proteína | Anticorpo primário | Diluição da IHQ | Diluição da ICF |
|--------------------------------|---|-----------------|-----------------|
| ACIII | anti-adnil ciclase III (C-20: sc-588, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) | 1:50 | 1:50 |
| | anti-gnal (ab 74049, Abcam) | 1:1000 | - |
| Gaolf | anti-golf (K-19: sc-385 , Santa Cruz Biotechnology, Inc.) | - | 1:50 |
| | anti-olfactory receptor 63 (ab 101618, Abcam) | 1:1000 | 1:50 |
| OR 63(MOR 267-1) | anti-olfactory receptor 19 (ab 101619, Abcam) | 1:500 | 1:50 |
| OR 600(MOR 39-1) | anti-Olfr600 (OSR00208W, Osenses) | 1:750 | 1:50 |
| OR 620/624 (MOR 4-1 /MOR 4-2P) | anti-Olfr620/624 (OSR00198W, Osenses) | 1:750 | 1:50 |

3.6.1 Detecção de ACIII, Gaolf, OR 63, OR 19, OR 600 e OR 620/624.

Os cortes histológicos foram desparafinados em xileno (5 minutos à temperatura ambiente) e em seguida hidratados através de sucessivas passagens por etanol em concentração decrescente (etanol 100% (v/v), 95% (v/v) e 80% (v/v)) e finalmente por água.

Em seguida fez-se a recuperação antigénica do tecido, através do método térmico, com tampão citrato de sódio 10mM pH 6, a 90°C, durante 20 minutos.

Fez-se então o primeiro bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 a 3 %, 10 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se o bloqueio com BSA 1% e FBS 5%, diluídos em PBS 1X, 30 minutos à temperatura ambiente.

Para a marcação das proteínas ACIII, Gaolf, OR 63, OR 19, OR 600 e OR 620/624 utilizaram-se os anticorpos primários indicados na tabela 3, segundo as diluições indicadas, em PBS 1X com BSA 1% e FBS 5%. A incubação foi feita durante a noite a 4°C.

Após a lavagem com PBS-T 0.1% seguiu-se a incubação, uma hora à temperatura ambiente, com anticorpo secundário biotilado, anti-rabbit IgG (Sigma Life Science) diluído em PBS 1X com BSA 1% e FBS 5%, 1:20.

Seguiram-se as lavagens com PBS-T 0.1%, tendo-se incubado com ExtrAvidin-Peroxidase (0.5 mg/ml, Sigma Life Science), 1:20 em PBS 1X com BSA 1% e FBS 5%, 30 minutos à temperatura ambiente e posteriormente com DAB 50X (Dako REAL, Dako) dissolvido em tampão de diluição de DAB (HRP substrate buffer, ChemMate, DakoCytomation), 1 a 2 minutos.

Os cortes histológicos foram lavados com água corrente, seguindo-se a coloração nuclear com hematoxilina de Mayer.

Em todas as imunohistoquímicas foi utilizado um controlo negativo que consistiu numa lâmina do mesmo tecido, onde se realizou todo o procedimento com omissão do anticorpo primário.

Para finalizar, os cortes histológicos foram desidratados, com concentrações crescentes de etanol (etanol 70% (v/v), 95% (v/v) e 100% (v/v)), parafinados em Xilol e montados usando o meio de montagem Entellan (Merck).

As lâminas foram observadas ao microscópio (Axio Imager A1) nas ampliações de 10X e 40X.

3.7 Imunofluorescência

À semelhança da técnica de imunohistoquímica, a imunofluorescência (ICF) permite avaliar o nível de expressão de componentes celulares como proteínas e conhecer a sua localização e distribuição celular. Esta técnica pode ser realizada em células de culturas primárias ou linhas imortalizadas e utiliza moléculas fluorescentes que permitem fazer a marcação dos componentes celulares em estudo.

Tal como descrito na técnica de IMQ, o princípio base da IMF assenta sobre a interação entre um antígeno com um anticorpo, que em caso de deteção directa, o anticorpo primário encontra-se ligado à molécula fluorescente, marcando directamente o epitopo antigénico em estudo. Por outro lado, se o método de deteção for indirecto, é o anticorpo secundário que se encontra ligado à molécula fluorescente, que através da sua interacção com o anticorpo primário, marca o epitopo antigénico em análise.

As células resultantes de culturas primárias ou de linhas imortalizadas são fixadas às lamelas com PFA 4% e permeabilizadas com uma solução de Triton X-100 dissolvido em PBS1X.

A permeabilização das células permite o acesso aos antígenos intracelulares e intraorganelares, uma vez que destrói as ligações cruzadas entre proteínas formadas durante a fixação das células com PFA. Para o bloqueio das células, contra as imunoglobulinas endógenas utiliza-se uma solução de FBS com Tween-20 diluído em PBS.

Os anticorpos utilizados para a marcação das proteínas em estudo neste trabalho e as respectivas diluições encontram-se representados na tabela 3.

3.7.1 Imunofluorescência em cultura primária de células epiteliais de plexo coróide de rato (CPEC) para detecção da ACIII, Gaolf, OR 63, OR 19, OR OR 600, OR 620/624 e OR 1496

Foram estabelecidas culturas primária de plexo coróide de rato segundo o protocolo descrito em Quintela et al,2009 e colocadas a crescer sobre lamelas circulares.

As células foram fixadas às lamelas com PFA 4%, 10 minutos à temperatura ambiente, e em seguida lavadas com PBS, para remover o excesso de PFA.

Seguiu-se a permeabilização das mesmas com 1% de Triton X-100 dissolvido em PBS 1X durante 5 minutos à temperatura ambiente, e nova lavagem com PBS 1X para remover o excesso.

O bloqueio das células foi realizado à temperatura ambiente, uma hora com uma solução de 20% de FCS e 0,1% de Tween-20 dissolvidos em PBS 1x.

Lavaram-se as células com PBS-T 0,1% e incubaram-se as mesmas durante 1 hora à temperatura ambiente com os anticorpos primários descritos na tabela 4 segundo uma diluição de 1:50 em PBS-T 0,1% com 1% de FBS.

Estes anticorpos primários apresentam especificidade respectivamente para as proteínas ACIII, Gaolf, OR 63, OR 19, OR 600, OR 620/624 e OR 1496.

Após a incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas com PBS-T 0,1%, seguindo-se a incubação com o anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (H+L, Molecular Probs), segundo uma diluição de 1:1000 em PBS-T 0,1% com 1% de FBS, 1 hora à temperatura ambiente.

Findo este período, lavaram-se as células com PBS-T 0,1% e procedeu-se à marcação dos núcleos celulares com DAPI, diluído 1:1000 em PBS-T 0,1 %, 10 minutos à temperatura ambiente.

Para terminar o procedimento, as células foram novamente lavadas com PBS-T 0,1% e montadas em lâminas histológicas com meio de montagem para fluorescência (Dako).

As lâminas foram analisadas no microscópio confocal LSM 710 (Axio Imager).

3.8 Extracção e quantificação de proteína total

Para se extrair a proteína total dos tecidos utiliza-se meio de lise completo, que pode variar de acordo com a característica das proteínas que se pretendem extrair.

O meio de lise utilizado neste trabalho laboratorial era constituído por : 1% de NP40, 0,5% de Desoxicolato de sódio, 0,1% de Dodecilsulfacto de sódio (SDS), 1% de PMSF, 3% de aprotinina e 1% de Leupeptina.

A quantificação de proteína total extraída dos tecidos plexo coróideu e epitélio olfactivo, foi determinada pelo método de Bradford (1976), onde se traça uma recta de calibração lendo a absorvância a 595 nm, a diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA).

O ensaio de Bradford baseia-se na mudança de cor do corante Azul Brilhante de CoomassieG 250 que, em condições ácidas, liga-se principalmente aos resíduos básicos e aromáticos das proteínas convertendo-se para a sua forma aniónica, azul.

A 595nm este corante possui uma absorvância máxima, proporcional à quantidade de proteína presente na amostra.

3.8.1 A partir de plexo coróide de rato

Os CPs obtidos a partir de ratos *Wistar-Han* foram lisados com 200 µL de meio de lise completo (1% de NP40, 0,5% de Desoxicolato de sódio, 0,1% de Dodecilsulfacto de sódio (SDS), 1% de PMSF, 3% de aprotinina e 1% de Leupeptina) e mecanicamente homogeneizados com um minipilão.

Efectuou-se em seguida uma centrifugação de 5 minutos a 1400g (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen), a 4°C e recolheu-se o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL. O extracto de proteína total de CP foi quantificado e guardado a -20°C.

A quantificação de extracto de proteína total de CP foi realizada pelo método de Bradford, por leitura das absorvâncias no leitor de microplacas (2020, Anthos).

3.8.2 A partir de epitélio olfactivo de rato

A metodologia utilizada para a extracção e quantificação de proteína total de EO é a mesma que a descrita para o plexo coróide, tendo-se alterado apenas com um passo prévio de congelação em azoto líquido e trituração mecânica com pilão e almofariz, com o objectivo de destruir a sua extensa matriz extracelular.

3.9 Western blot

A análise de Western blot também conhecido por imunoblotting permite fazer a detecção e quantificação relativa de uma proteína específica a partir de extractos de proteína total.

O princípio base desta técnica depende da reacção de um anticorpo com o epitopo antigénico da proteína que se pretende estudar, a qual se encontra imobilizada sobre uma membrana.

No caso de um SDS-PAGE, a técnica inicia-se com uma electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante, separando as proteínas segundo o seu peso molecular, seguida de uma electrotransferência para uma membrana de nylon ou de nitocelulose.

A amostra é solubilizada num tampão de deposição contendo agentes redutores e desnaturada a 95°C durante 5-10 minutos.

O tampão contém SDS, um detergente aniónico, que confere carga negativa às proteínas, β -mercaptoetanol responsável por quebrar as ligações dissulfureto das proteínas, tris-HCl, glicerol, que confere densidade à amostra e azul de bromofenol, para facilitar a visualização da migração durante a electroforese.

Paralelamente às amostras corre-se um marcador de pesos moleculares com proteínas de peso molecular conhecido (Kaleidoscope Prestained Standards, BioRad).

Após a electroforese o gel é colocado junto à membrana sintética que possui uma forte afinidade para as proteínas e estes entre folhas de papel absorvente, formando uma sanduiche. Este conjunto é colocado dentro de uma tina com tampão de electrotransferência, CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico), que flui através do gel e da membrana, devido à aplicação de uma corrente eléctrica, levando as proteínas a transferirem-se.

Uma vez transferidas as proteínas para a membrana, esta é bloqueada com uma solução de leite magro a 5%, de forma a impedir ligações inespecíficas dos anticorpos à membrana.

Após o bloqueio, a membrana é incubada com o anticorpo primário, específico para a proteína em estudo, e em seguida com o anticorpo secundário, conjugado com a fosfatase alcalina, que por sua vez possui especificidade para o anticorpo primário.

No final da incubação com cada anticorpo, procede-se à lavagem da membrana com TBS-T, de forma a remover os anticorpos excedentes, evitando que estes permaneçam ligados inespecificamente à membrana. Para finalizar, a membrana é incubada com ECF, o substrato da fosfatase alcalina, que quando excitado por uma fonte de luz adequada, emite fluorescência, permitindo a detecção de uma banda. A revelação da membrana é por isso efectuada por um aparelho de fluorescência onde a intensidade da banda é directamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra.

Caso se pretenda fazer a quantificação de proteína, a imagem é analisada por densitometria onde se compara a intensidade da banda da proteína em estudo com a de uma proteína endógena, como a β -actina.

3.9.1 Análise das proteínas ACIII e Gαolf em extracto de proteína total de CP e de EO

O procedimento iniciou-se com a deposição de um volume de amostra equivalente a 50 µg de proteína total num microtubo de 1,5mL, ao qual se juntou água a perfazer um volume de 20 µL.

Adicionou-se 5 µL de tampão de deposição (2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 25% glicerol, 0,01% azul bromofenol em Tris-HCl a 62,5 mM, pH 6,8) e os extractos proteicos foram desnaturados a 95°C, 5 minutos e posteriormente separados, numa electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, a 10%, a 90 V.

Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF 0,45µm de poro (Amersham), previamente activadas em metanol 100% e equilibradas em água miliQ.

A electrotransferência foi efectuada a 750 mA, 45 minutos no caso da Gαolf e 1 hora e 30 minutos no caso da ACIII, tendo-se bloqueado as membranas com uma solução de leite magro a 5% em TBS-T 0,1%, 1 hora à temperatura ambiente.

Seguiu-se a incubação das membranas com o anticorpo primario anti-adnil ciclase III (C-20: sc-588, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) para a detecção da ACIII e anti-gαolf (K-19: sc-385, Santa Cruz Biotechnology Inc), para a detecção da Gαolf.

Efectuaram-se 3 lavagens de 15 min com TBS-T, seguindo-se a incubação com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado à fosfatase alcalina (GE Healthcare), 1:20000, em TBS-T, 1 hora à temperatura ambiente, com agitação constante e suave.

Procederam-se novamente a lavagens com TBS-T, 15 minutos e para a detecção, a membrana foi incubada com ECF (ECF Western Blotting Reagent Packs, GE Healthcare) 5 minutos.

A detecção das bandas foi efectuada no Molecular Imager FX (FX Pro Plus, Bio-Rad).

4. Resultados

A análise da expressão de algumas das proteínas da via de transdução olfactiva, no plexo coróide (CP) de rato, foi realizada ao nível de RNAm e ao nível de proteína, usando-se o epitélio olfactivo (EO) de rato como controlo positivo, que se sabe ser um tecido onde todas estas proteínas são expressas.

4.1 Análise da expressão do gene da $G_{\alpha olf}$ e ACIII por electroforese em gel de agarose a 1,5%

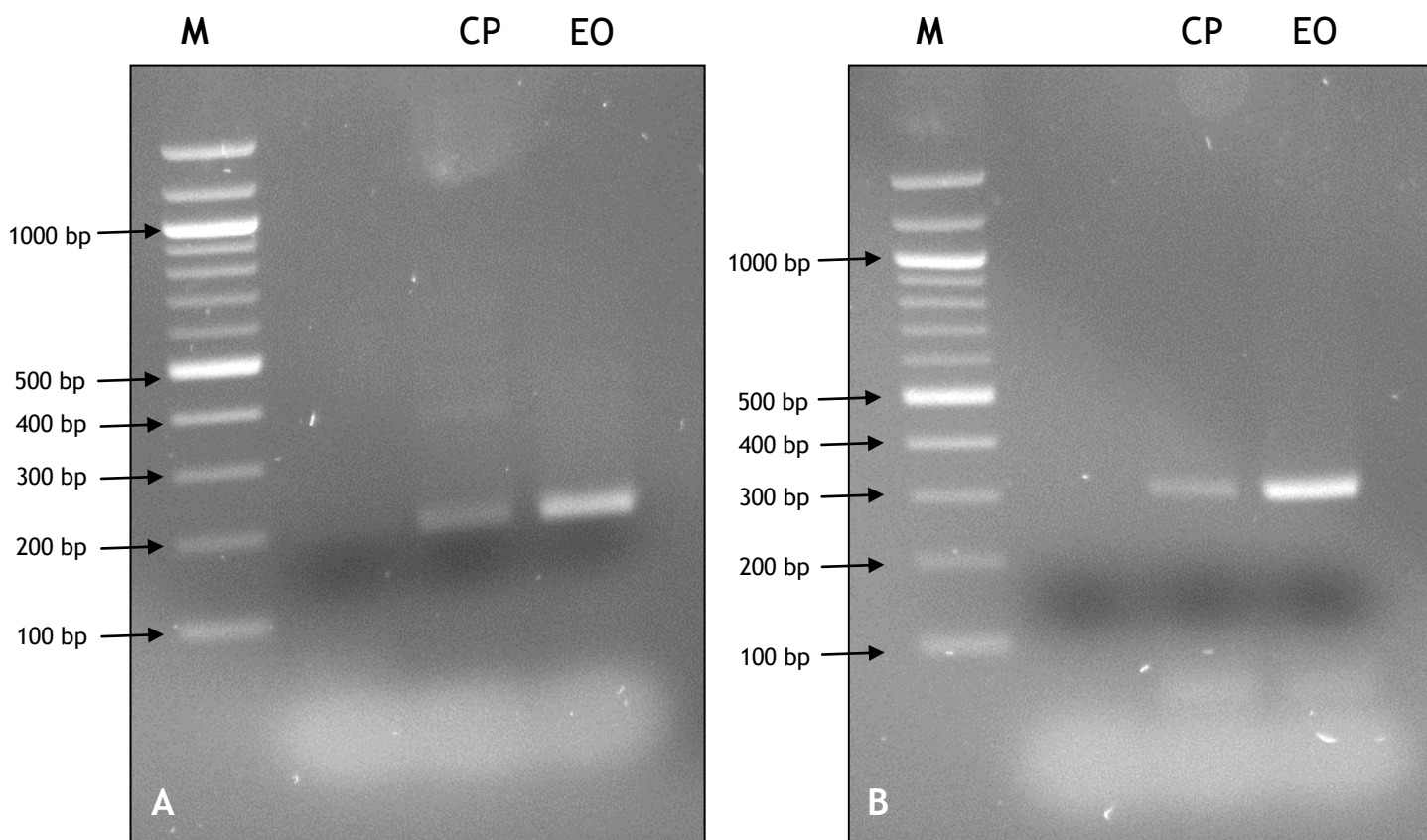


Figura 12- Electroforese de 1,5% em gel de agarose, coloração com Green Save (nzyTech, Portugal). A - amplificação do cDNA em CP e EO de rato com primers específicos para ACIII; B - amplificação do cDNA de CP e EO com primers específicos para $G_{\alpha olf}$ de rato. (M) Marcador de pesos moleculares DNA ladder 100bp (Biolabs).

Após optimização das condições de PCR com primers específicos, como indicado na secção 3.4, obtiveram-se as bandas de 285bp e 197bp, respectivamente para a $G_{\alpha olf}$ e ACIII, como ilustrado na figura 12. Os resultados mostram que $G_{\alpha olf}$ e ACIII são expressos, ao nível do RNAm, no CP de rato, tendo-se obtido bandas com tamanhos equivalentes às obtidas no epitélio olfactivo (EO), usado como

controlo positivo. Os produtos de PCR foram purificados (Kit Wizard® SV Gel end PCR Clean-Up System, Promega) e enviados para sequenciar pelo método da Sanger (Stabvida Portugal). Os resultados da sequenciação foram analisados no programa do NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) confirmando, assim, a identidade dos RNAm correspondente aos genes em análise: ACIII e Gaolf de rato. Observou-se 100% de homologia para ACIII e 100% de homologia para Gaolf, em relação à sequência da base de dados, de *Rattus norvegicus*.

4.2 Análise da expressão dos genes do OR 19 e OR 63 no CP por PCR em tempo real

4.2.1 Controlo negativo

O gráfico da figura 13 ilustra os resultados do PCR em tempo real do controlo negativo, mostrando a ausência de sinal.

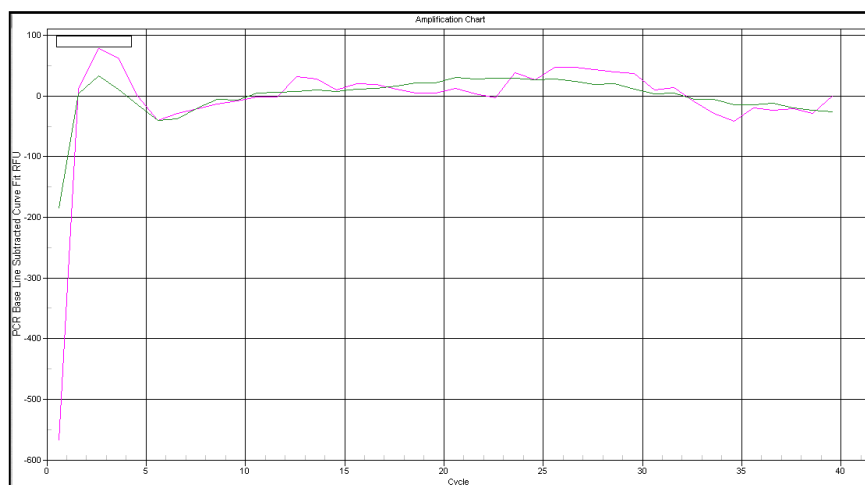


Figura 13- Curva de amplificação do controlo negativo da reacção de PCR em tempo real

4.2.2 OR 63 e OR19 no CP de rato

Os resultados de PCR em tempo real para os genes OR63 e OR 19 encontram-se representados na figura 14. Desta figura tiram valores dos CTs médios, de 30,82 para o CP e 27,57 para o EO relativos à amplificação do gene do OR 63.

Acrescenta-se ainda que a expressão deste gene no EO é superior à expressão no CP, já que o primeiro apresenta um CT mais baixo.

Para o gene OR19 verifica-se a ausência de amplificação (C), situação que não se verifica no OE (D), tecido usado como controlo positivo. Neste último, retira-se um valor médio de CT de 30,67.

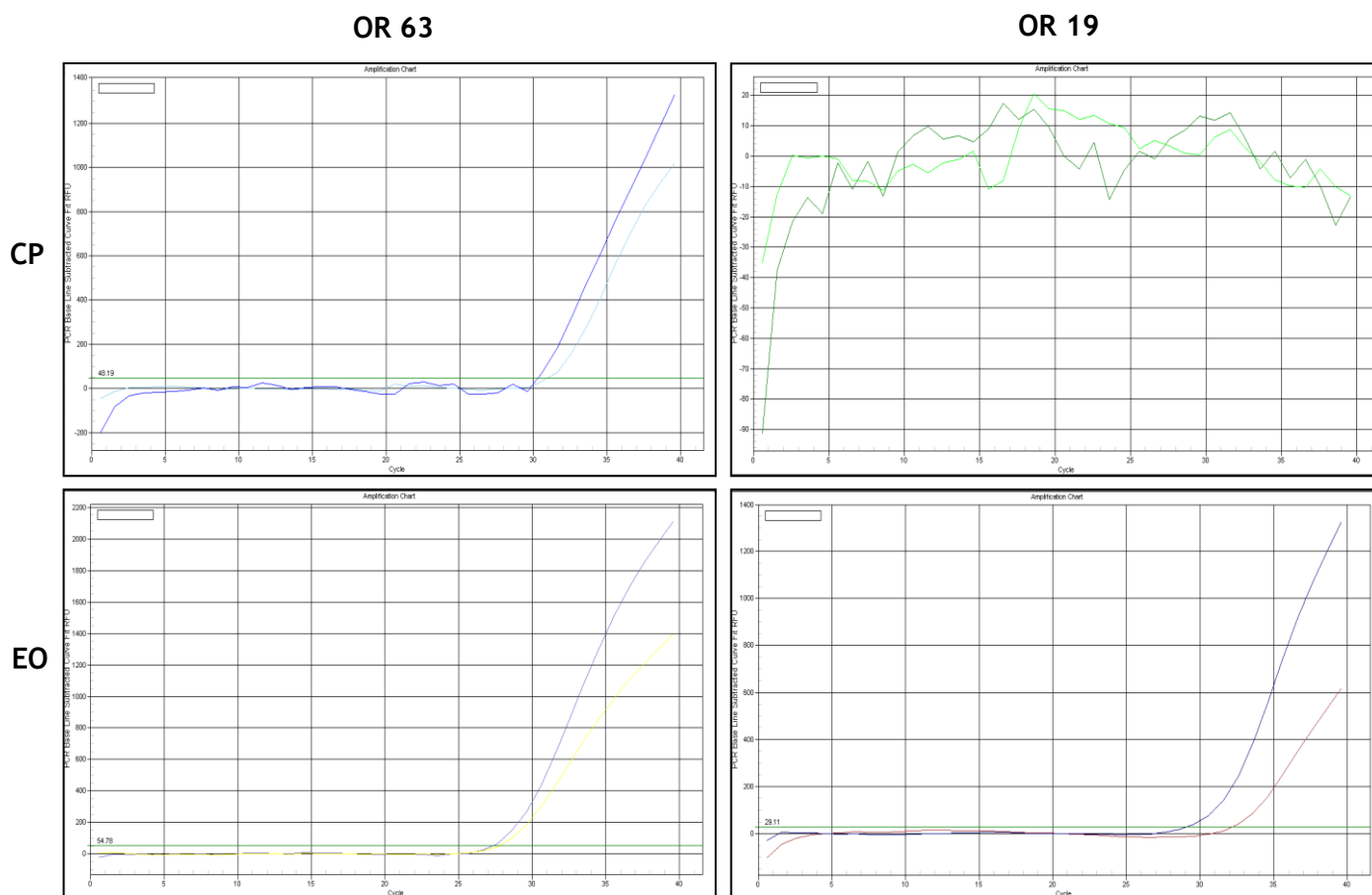


Figura 14- Curvas de amplificação da reacção de PCR em tempo real dos genes do OR 63 OR 19, em CP e em EO de rato.

4.3 Análise da expressão das proteínas ACIII, G α olf, OR 63, OR 19, OR600, OR620/624 no CP de rato por imunohistoquímica

A análise da expressão das proteínas da via de transdução olfactiva, ACIII, G α olf, OR 63, OR 19, OR600 e OR620/624, foi realizada pela técnica de imunohistoquímica (IHC), em cortes histológicos de CP de rato, tendo-se usado o EO como controlo positivo.

4.3.1 Controlo negativo

Na figura 15 observa-se marcação dos núcleos das células epiteliais do CP de rato (A e B) e nos cortes (C e D), as diferentes camadas celulares do EO de rato, usado como controlo positivo em todas as fases deste trabalho. Os cílios olfactivos estão indicados pela seta mais fina, mais interiormente observam-se os núcleos das células que constituem o EO (células de suporte, neurónios olfactivos, células basais) e ainda mais anteriormente, as fibras que constituem o nervo olfactivo.

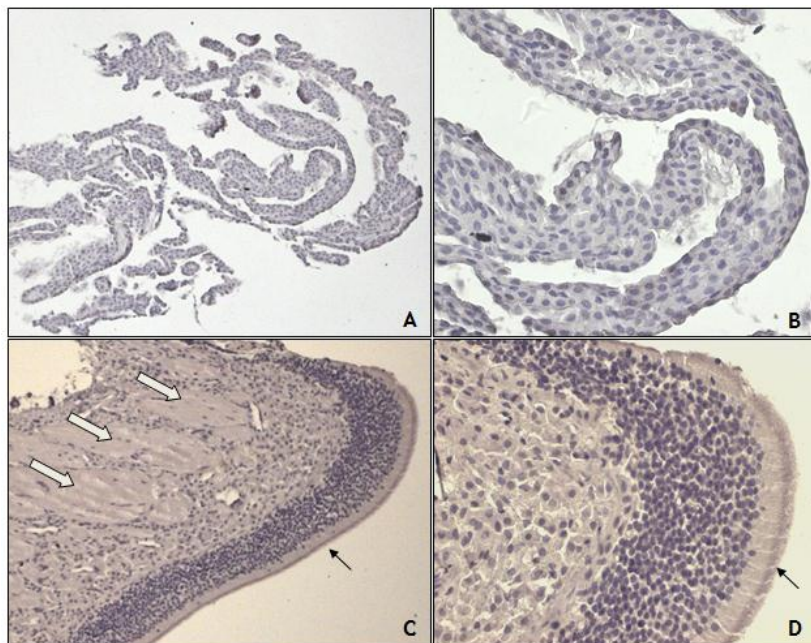


Figura 15- Cortes histológicos de CP (A e B) e EO (C, D) com marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer, nas ampliações 10X e 40X.

4.3.2 ACIII em CP de rato

As imagens ilustradas na figura 16 evidenciam a presença da ACIII nas células epiteliais de CP (A e B), nos cílios e nas células olfactivas do EO de rato (C e D).

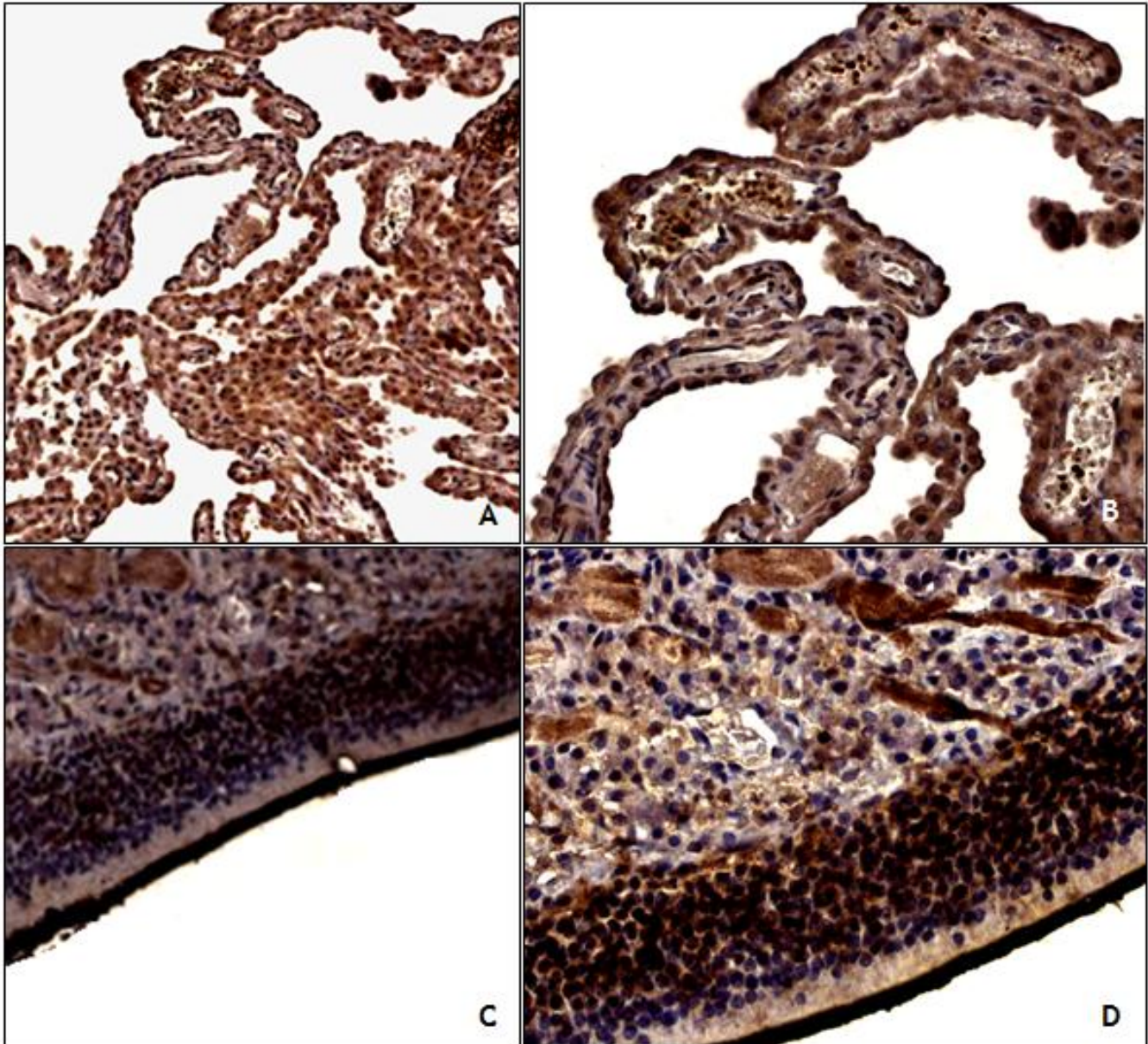


Figura 16- Expressão proteica da adenil ciclase III (AC III) em CP e EO de rato. (A e B) - IHC de secções de CP de rato incubado com anti-AC III (1:50) e posteriormente com diaminobenzidina (DAB), nas ampliações 10X e 40X, (C e D) - IHC de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-ACIII e DAB, nas ampliações 10X e 40X. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

4.3.2 G α olf no CP de rato

A imagem 17 ilustra a presença da proteína G α olf nas células epiteliais de CP (A e B) e nos cílios, células olfactivas (OSN) e compartimento basal do EO de rato (C e D).

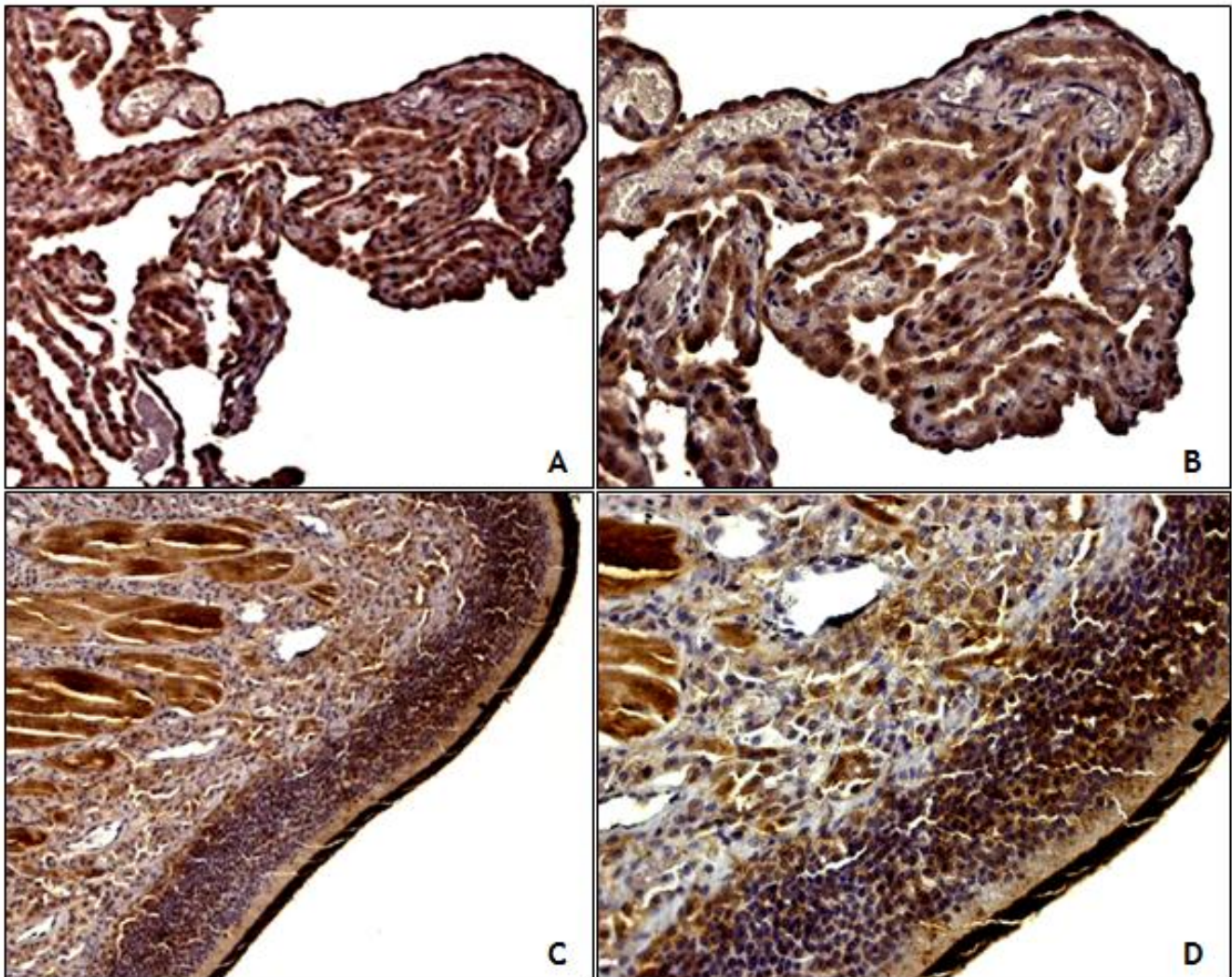


Figura 17- Expressão proteica da subunidade α da proteína G (G α olf) em CP e EO de rato. (A e B) - IHC de secções de CP de rato incubado com anti- Gnal (1:1000) e posteriormente com diaminobenzidina (DAB), nas ampliações 10X e 40X, (C e D) - IHC de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-Gnal e DAB, nas ampliações 10X e 40X. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

4.3.3 OR 63 no CP de rato

A figura 18 mostra a presença da proteína OR 63 nas células epiteliais de CP de rato (A e B) e nos cílios e células olfactivas de EO de rato (C e D).

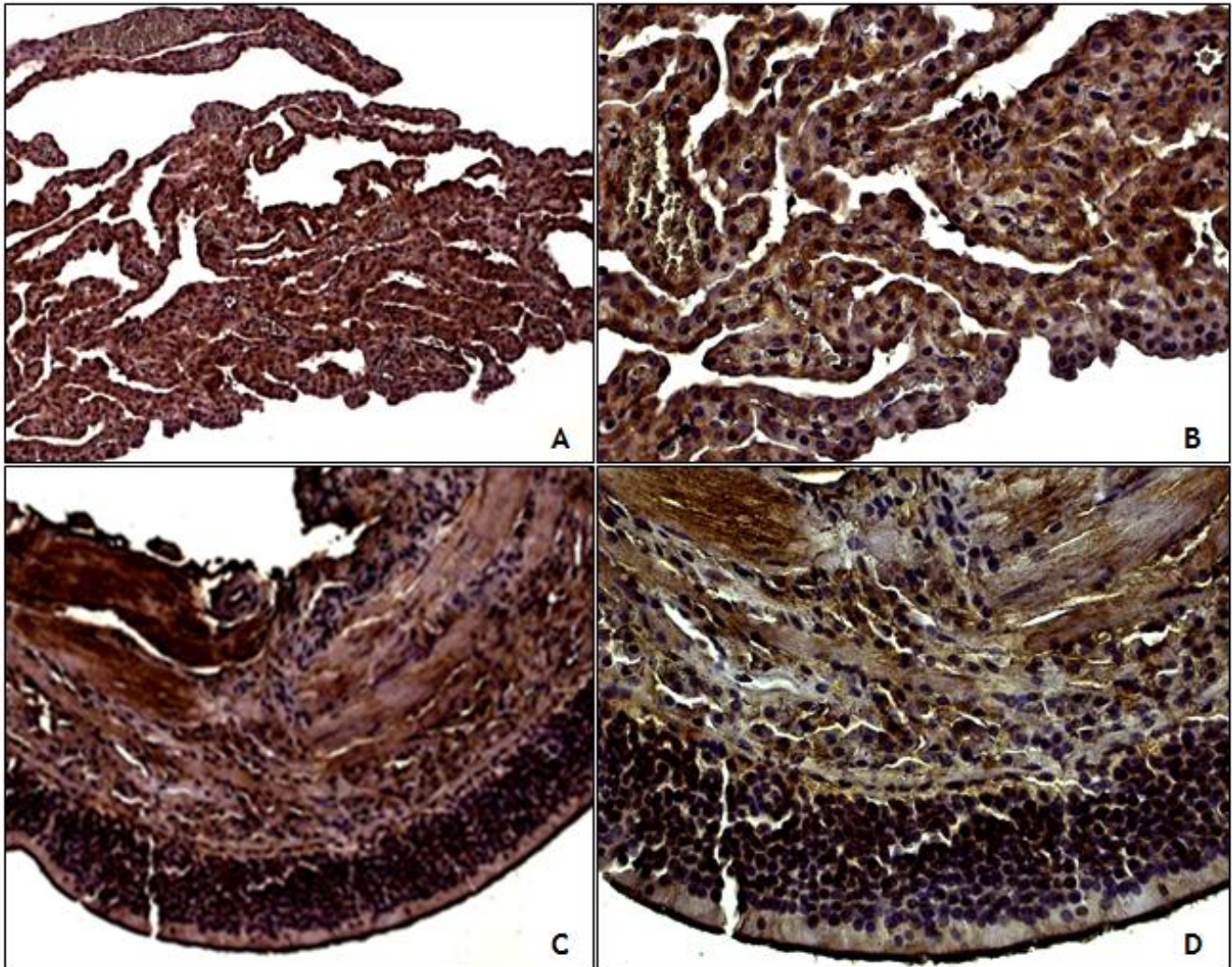


Figura 18 - Expressão proteica do OR63 (MOR 267-1) em CP e EO de rato. (A e B) - IHC de secções de CP de rato incubado com anti- Olfactory receptor 63 (1:1000) e posteriormente com diaminobenzidina (DAB), nas ampliações 10X e 40X, (C e D) - IHC de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti- Olfactory receptor 63 e DAB, nas ampliações 10X e 40X. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

4.3.4 OR 19 no CP de rato

A figura 19 ilustra a marcação da proteína OR 19, comprovando a sua expressão nas células epiteliais de CP (A e B), sobretudo na membrana, e nos cílios e células olfactivas de EO de rato (C e D).

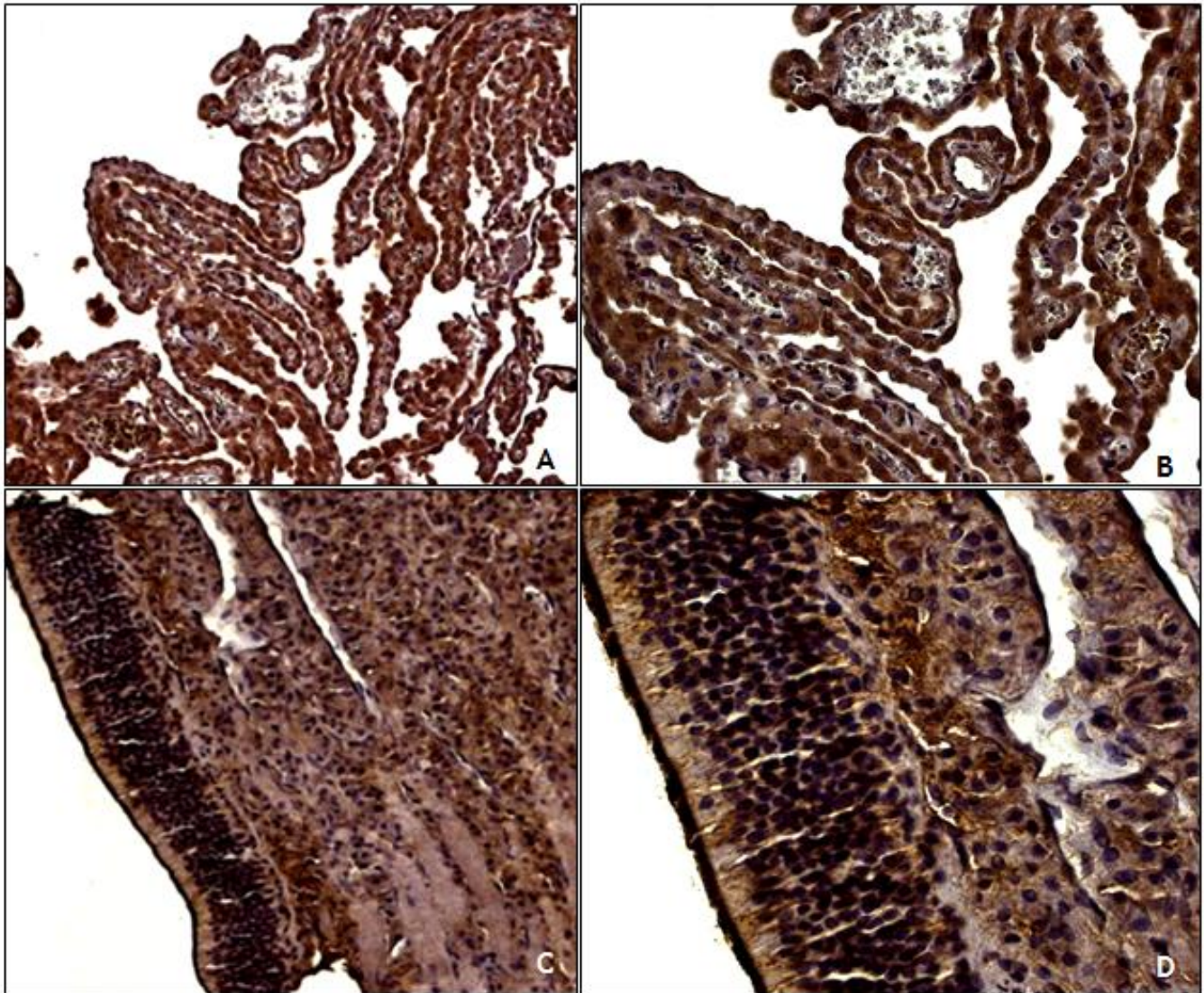


Figura 19- Expressão proteica do OR19 (MOR 140-1) em CP e EO de rato. (A e B) - IHC de secções de CP de rato incubado com anti- Olfactory receptor 19 (1:500) e posteriormente com diaminobenzidina (DAB), nas ampliações 10X e 40X, (C e D) - IHC de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti- Olfactory receptor 19 e DAB, nas ampliações 10X e 40X. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

4.3.4 OR 600 no CP de rato

A figura 20 ilustra a marcação da proteína OR 19, comprovando a sua expressão nas células epiteliais de CP (A e B), sobretudo na membrana, e nos cílios e células olfactivas de EO de rato (C e D).

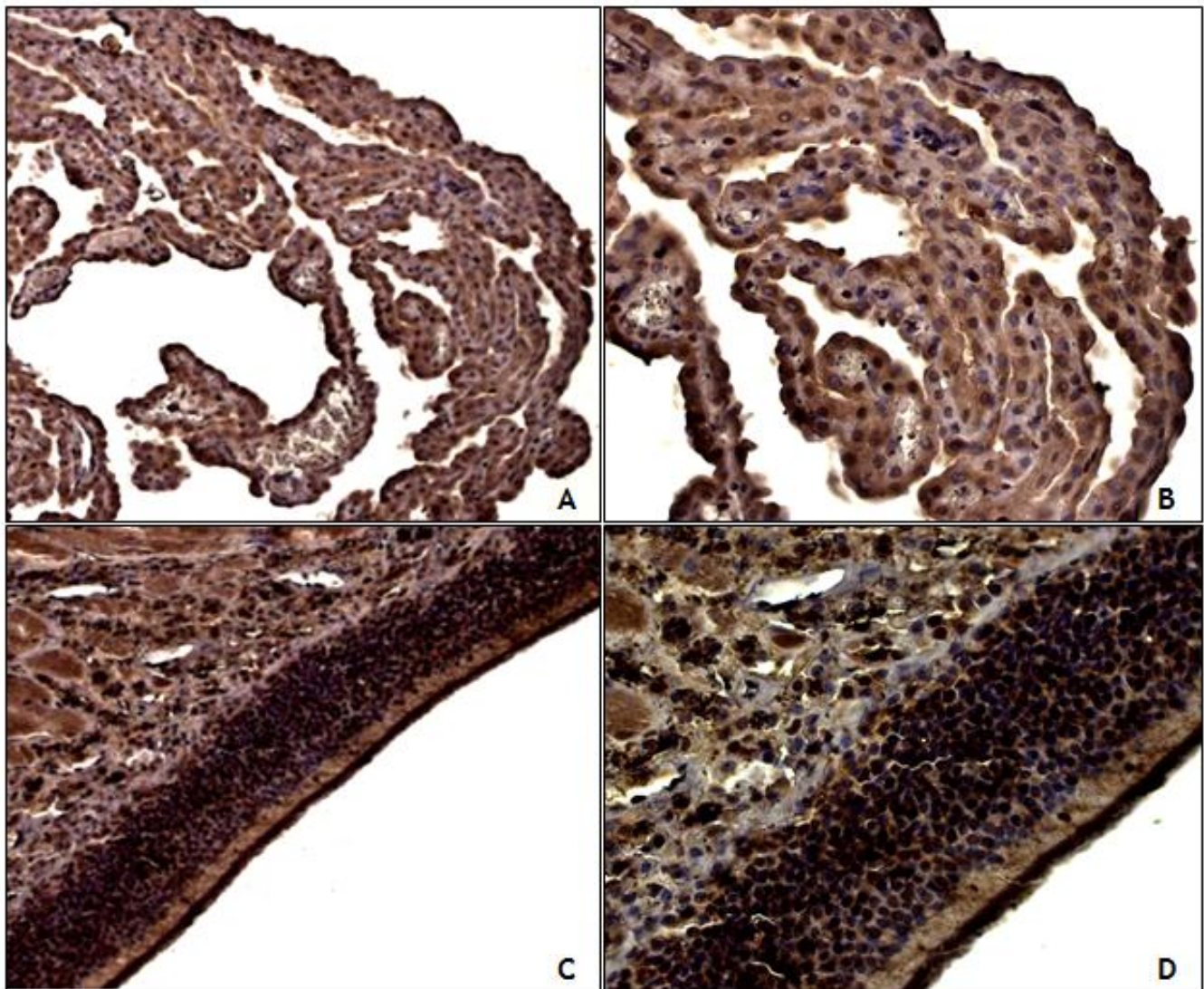


Figura 20 - Expressão proteica do OR 600 (Mor 39-1) em CP e EO de rato. (A e B) - IHC de secções de CP de rato incubado com anti- Olf600 (1:750) e posteriormente com diaminobenzidina (DAB), nas ampliações 10X e 40X, (C e D) - IHC de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-Olf600 e DAB, nas ampliações 10X e 40X. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

4.3.4 OR 620/624 em CP de rato

OS cortes ilustrados na figura 21 evidenciam a presença da proteína OR 620/624 nas células epiteliais de CP (A e B), sobretudo na membrana, e nos cílios e nas células olfactivas do EO de rato (C e D).

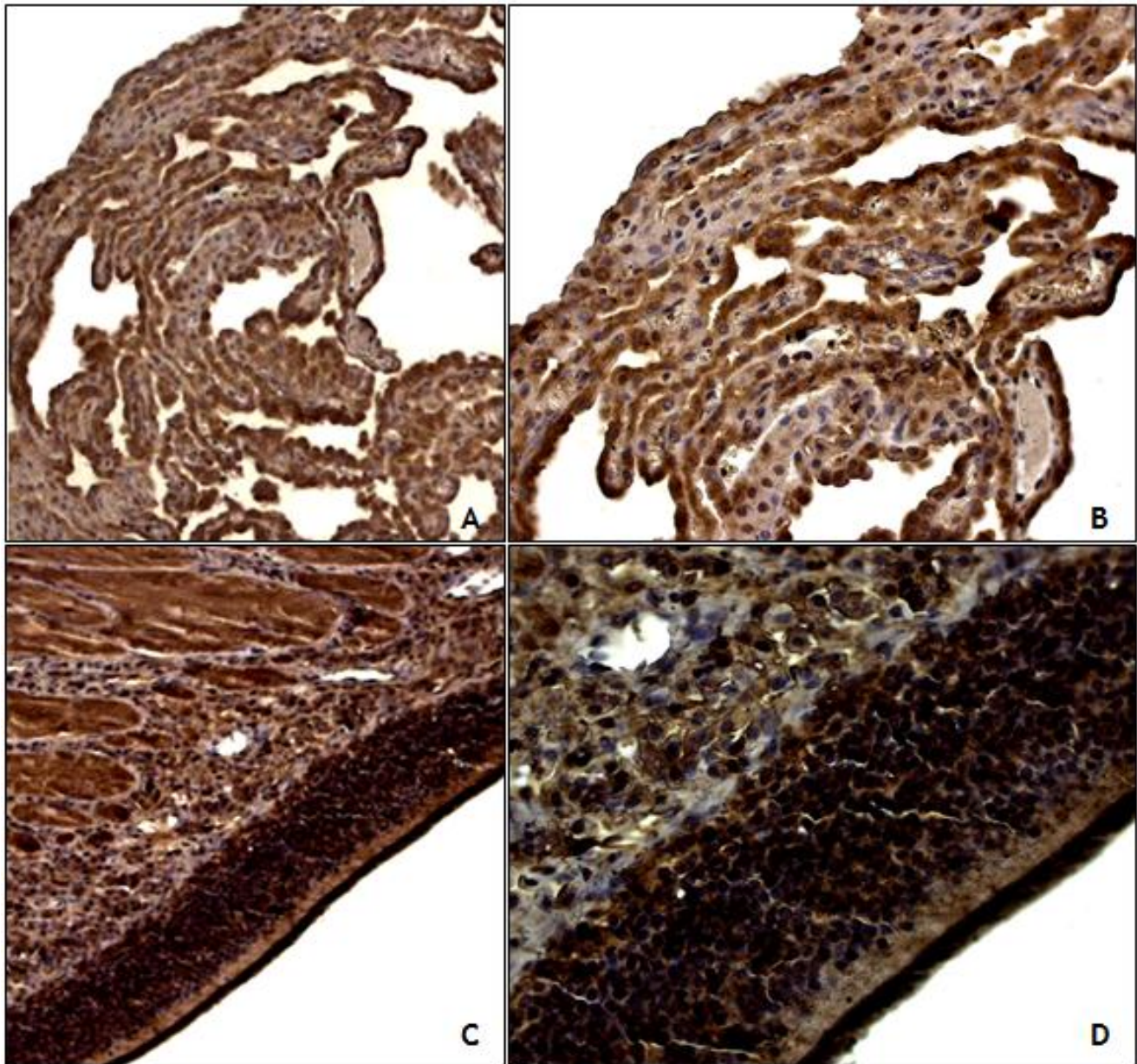
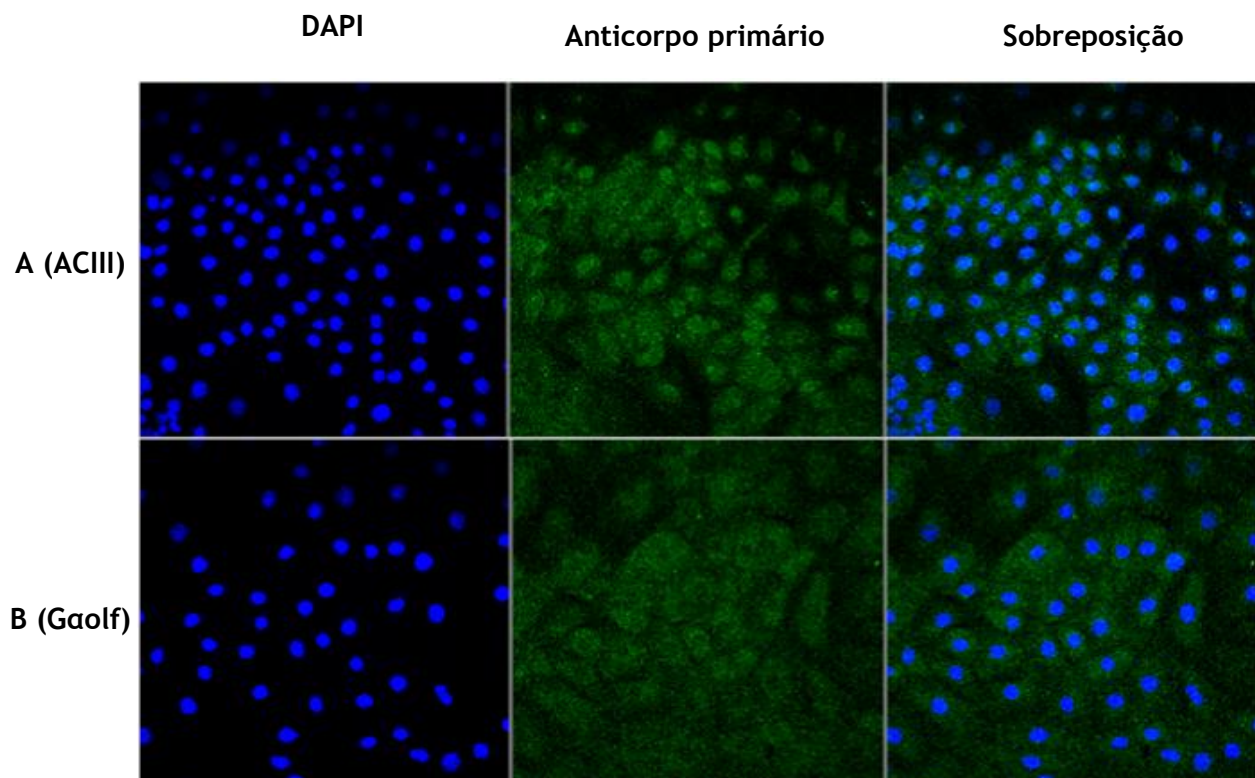


Figura 21 - Expressão proteica do OR 620/624 (Mor 4-1 /Mor 4-2P) em CP e EO de rato. (A e B) - IHC de secções de CP de rato incubado com anti- Olf620/624 (1:750) e posteriormente com diaminobenzidina (DAB), nas ampliações 10X e 40X, (C e D) - IHC de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-Olf620/624 e DAB, nas ampliações 10X e 40X. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

4.4 Análise da expressão das proteínas ACIII, Gaolf, OR 63, OR 19, OR600, OR620/624 e OR 1496 por imunofluorescência em culturas primárias de células epiteliais de CP.

Foram estabelecidas culturas primárias de células epiteliais de CP de rato de acordo com o protocolo descrito em Quintela et al.,2009 e fixadas para marcação por imunofluorescência, com anticorpos específicos das proteínas da via olfactiva: proteínas ACIII, Gaolf, OR 63, OR19, OR600, OR 620/624 e OR 1496.

A figura 22 mostra que estas células epiteliais do CP expressam todas as proteínas em estudo, podendo observar-se a marcação nuclear com DAPI, as marcações específicas de cada anticorpo e a sobreposição das duas marcações.



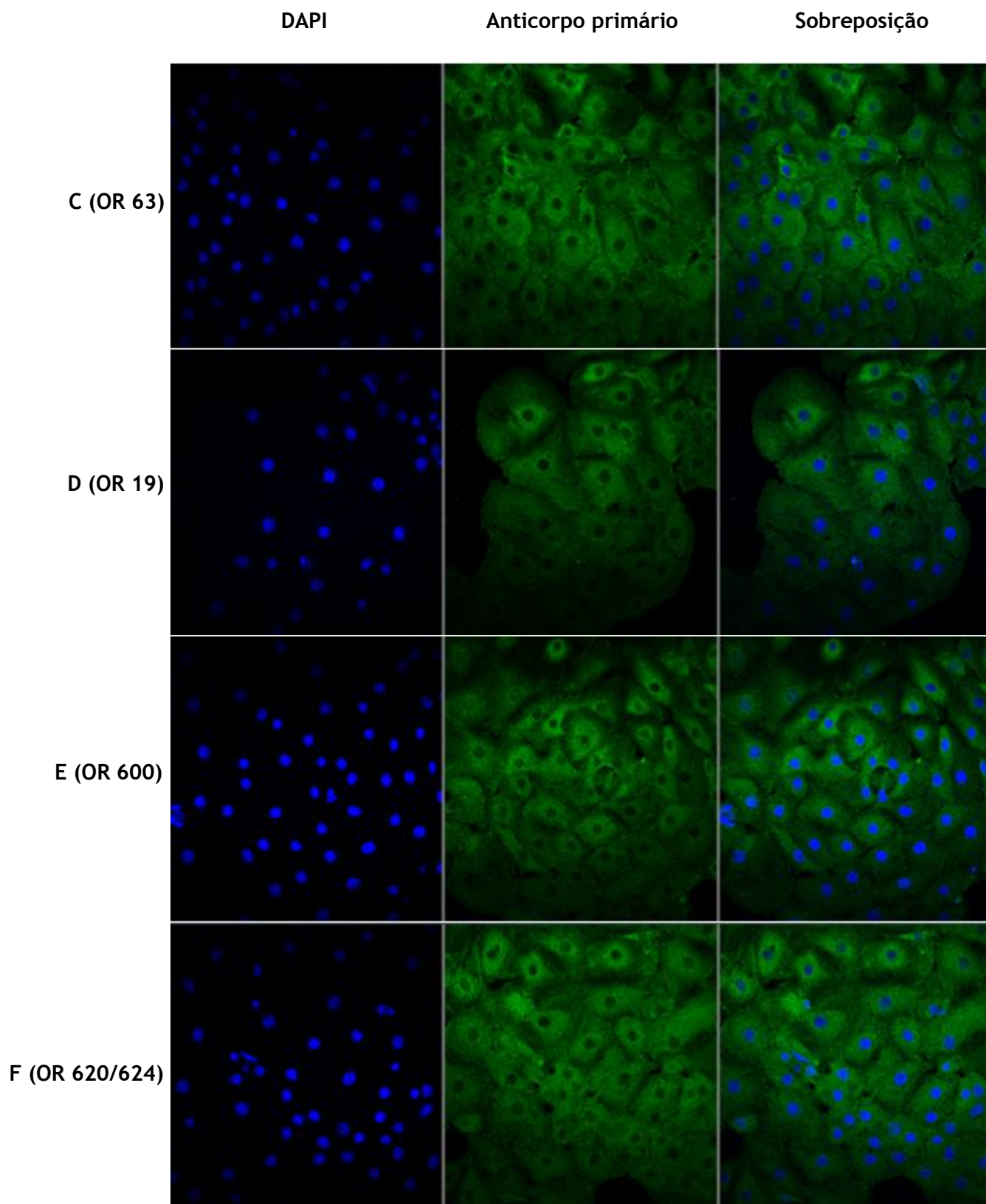


Figura 22- Imunofluorescência das culturas primárias das células epiteliais de CP de rato com os anticorpos ACIII (A), Gaolf (B), OR 63 (C), OR 19 (D), OR 600 (E) e OR 620/624 (F). A coluna da esquerda mostra a marcação dos núcleos com DAPI; a coluna central mostra a marcação com o anticorpo específico; a coluna da direita mostra a sobreposição das duas colorações.

4.5 Análise da expressão das proteínas ACIII e Gαolf no CP por Western blot

A figura 23 ilustra o resultado dos Western blots realizados com extractos de proteína total de CP e OE, e incubados com os anticorpos específicos para as proteínas ACIII e Gαolf.

A incubação com anti-ACIII (figura 23-A) revela a existência de uma proteína no CP com um peso estimado de 55 kDa. No EO, a incubação com anti-ACIII revelou uma banda com o mesmo peso, 55 kDa, e uma banda adicional de cerca de 200 kDa.

Em relação à incubação com anti-Gαolf (figura 23-B) observa-se a presença de uma banda com um peso molecular aproximado de 85 kDa, tanto no CP como no EO.

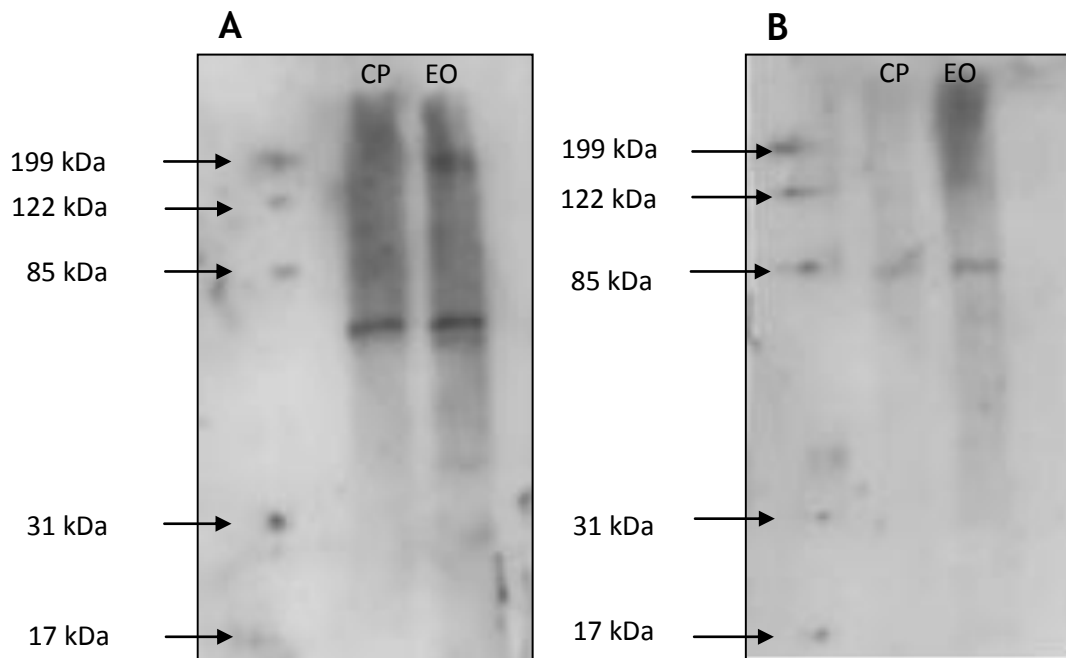


Figura 23- Western Blot de extractos de proteína total de CP e de OE de rato, incubados com anti-ACIII (A) e com anti-Gαolf (B).

5. Discussão

O CP é uma estrutura ramificada e altamente vascularizada que forma uma interface única entre o sangue e o líquido cefalorraquidiano (CSF). Encontra-se bem estabelecido que a principal função do CP é a produção do CSF, responsável pelo ajuste do volume intracranial, nutrição do SNC, fornecendo neuropéptidos, micronutrientes e neurotransmissores através do CSF, uma vez que monitoriza e regula o ambiente bioquímico extracelular (Redzic and Segal 2004; Emerich, Skinner et al. 2005).

Um estudo de “microarrays” transcritómicos, realizado previamente no nosso laboratório com o objectivo de estudar o efeito das hormonas sexuais no transcrito do CP de ratos *Wistar Han*, machos e fêmeas, mostrou que existem varias vias de sinalização celular que são reguladas pelas hormonas sexuais, entre as quais a via de transdução olfactiva.

Como nos últimos anos a via da transdução olfactiva tem sido detectada em outros tecidos que não o epitélio olfactivo (EO), com relevância funcional, uma análise mais detalhada deste resultado foi encorajada.

A via da transdução olfactiva foi já identificada no coração em desenvolvimento, rim, placenta, espermatozóides, baço, língua e encéfalo (Itakura, Ohno et al. 2006; Pluznick, Zou et al. 2009). Todos estes tecidos, tal como o plexo coróide, são tecidos de barreira que respondem a estímulos externos.

Desta forma realizou-se este trabalho experimental com o objectivo de confirmar a presença das proteínas que constituem a via da transdução olfactiva no CP de rato e inferir acerca do possível papel que esta via desempenha neste tecido.

Numa primeira fase verificou-se a presença do RNAm dos genes da ACIII e Gaolf por RT-PCR, seguido de sequenciação dos fragmentos amplificados, tendo-se verificado 100% de homologia das sequências de ACIII e Gaolf, em relação à sequência da base de dados, de *Rattus norvegicus*. O EO de rato foi utilizado como controlo positivo da reacção de PCR, porque se conhece a expressão da ACIII e Gaolf neste tecido.

Para fazer o estudo da via olfactiva ao nível de RNAm escolheram-se dois ORs para os quais existissem anticorpos específicos comerciais.

Estudaram-se assim o OR 19 e o OR 63 em CP de rato e utilizou-se a metodologia de PCR em tempo real, porque os OR pertencem a uma família génica que codifica cerca de 1000 genes, que partilham grande homologia entre si.

Neste contexto tornou-se preferível a utilização de sondas Taqman comerciais altamente específicas para a deteção dos transcritos dos genes dos ORs em estudo, dado a dificuldade em desenhar “primers” para PCR convencional. Assim pôde-se provar a presença de RNAm do OR 63 em CP de rato, mas não do OR 19.

Contudo, por imunohistoquímica foi possível detectar a proteína do OR19 nas células epiteliais de CP. Uma análise detalhada dos resultados dos microarrays mostrou que este gene tem um baixo nível de expressão, ao nível do RNAm, designado nível basal. Este facto pode explicar a ausência de sinal do PCR em tempo real.

O EO de rato foi utilizado como tecido controlo da reacção de PCR em tempo real, tendo mostrado a presença de RNAm de ambos os ORs (63 e 19) com CTs inferiores ao obtido no CP de rato sugerindo maiores níveis de expressão, ao nível de RNAm dos ORs no EO que no CP.

Para melhor caracterizar as proteínas da transdução olfactiva no CP de rato foram ainda realizados ensaios de Western blot, imunohistoquímica e citofluorescência, para determinar a localização de acordo com a morfologia tecidual e celular.

De acordo com a literatura, as adenil ciclases transmembranares (ACstm) das células somáticas apresentam um peso molecular que pode variar entre 120 a 200 kDa de acordo com modificações pós-tradução, que estas proteínas possam sofrer como glicosilações e fosforilações (Baxendale and Fraser 2003). Em tecidos não olfactivos encontra-se descrito que a proteína ACIII pode ser representada pelas bandas de western a 55kDa, 90kDa e 130kDa (Itakura, Ohno et al. 2006; Pluznick, Zou et al. 2009). Por outro lado, no tecido olfactivo, a forma glicosilada da ACIII migra segundo um peso molecular entre 180 e 200 kDa (Gautier-Courteille, Salanova et al. 1998). Se no entanto, o estrato de EO for tratado com péptido glicohidrolase N-glicosidase F (PNGase F) a mobilidade da ACIII altera-se de 200kDa para 130kDa, uma vez que a PNGase cliva o resíduo de asparagina ligado aos oligossacarídeos das glicoproteínas levando a ACIII a perder a sua forma glicosilada (Wei, Zhao et al. 1998).

Os resultados obtidos por Western blot mostram uma banda com 55 kDa para a ACIII no CP de rato, enquanto no EO observam-se duas bandas: uma com 200kDa e outra com 55kDa. Estes resultados mostram que a ACIII é expressa no CP apresentando um peso molecular de 55kDa que se encontra descrito na bibliografia, sugerindo que a ACIII exista no CP na sua forma não-glicosilada.

Relativamente à proteína Golf encontra-se descrito, que para tecidos que não o EO, esta pode ser representada por uma banda de 42-46kDa e por uma banda de 77kDa (Itakura, Ohno et al. 2006; Pluznick, Zou et al. 2009). Neste trabalho foram identificadas bandas com cerca de 85kDa, correspondentes à Golf tanto em CP com em EO de rato.

Uma vez que este resultado não se encontra de acordo com os resultados descritos na literatura, tentou-se avançar uma possível justificação. Pensamos que os 85 kDa, podem corresponder ao peso molecular da conformação nativa da proteína G, incluindo os 42 - 45kDa da subunidade α , 35 kDa da subunidade β e 8 - 10kDa da subunidade γ . Os resultados obtidos sugerem a necessidade de uma optimização em relação à desnaturação do estrato proteico.

Fez-se ainda a técnica de imunohistoquímica, que permite comprovar a presença das proteínas da via olfactiva no tecido e ainda localizá-las a nível celular. Os resultados das imunohistoquímicas comprovam a presença da ACIII e Golf nas células epiteliais do CP.

Realizaram-se ainda IHQ para detectar e localizar os OR 63, OR 19, OR 600, OR 620 no CP, tendo-se obtido marcação para todos os ORs em estudo para as células epiteliais de CP.

Para garantir que a marcação por IHQ não foi obtida a partir de uma contaminação com células não epiteliais, fez-se uma cultura primária de células epiteliais de CP (CPEC) e detecção por imunofluorescência.

Os resultados de imunofluorescência das células epiteliais de CP permitiram mostrar a localização celular das proteínas (ACIII, G α olf, OR 63, OR19, OR600, OR620/624 e OR1496) comprovando a sua presença nas CEPC.

Os ORs apresentam todos eles, localização citoplasmática com fluorescência mais intensa sobre a zona perinuclear, formando uma auréola em volta do núcleo sugerindo que se possam localizar no retículo endoplasmático. No entanto para confirmar este facto, ter-se-á que fazer uma colocalização de cada OR em estudo com um marcador do reticulo endoplasmático.

Segundo os dados da literatura, os ORs são proteínas com 7 domínios transmembranares, que apresentam no seu tecido nativo (EO) uma localização na membrana citoplasmática celular (Wong, Trinh et al. 2000).

Sabe-se no entanto que em cultura, as células encontram-se fora do seu ambiente celular nativo, podendo por isso, alterar uma correcta diferenciação e correspondente expressão proteica.

As proteínas são traduzidas nos ribossomas, que se encontram no retículo endoplasmático rugoso e posteriormente são enviadas para o citoplasma, outros organelos ou para o espaço extracelular de acordo com a sua função.

Assim sendo, a localização dos OR no espaço perinuclear, possivelmente no retículo endoplasmático rugoso, pode dever-se ao facto de as células em cultura primária não se encontrarem devidamente diferenciadas, não induzindo, por isso a correcta translocação dos OR do retículo para a membrana citoplasmática. Um estudo de Bush and Hall (2008), mostrou que ORs expressos em sistemas heterólogos apresentam uma maior localização no reticulo endoplasmático do que na membrana citoplasmática. Os autores sugerem que a falta de determinado componente crítico, nas células destes sistemas, que induza a translocação dos ORs para a membrana citoplasmática poderá justificar esta localização celular.

À semelhança dos sistemas heterólogos, pode ocorrer o mesmo nas células epiteliais de CP, ou pode por outro lado, ser necessário um estímulo externo que induza esta translocação.

Tal como acontece com os OR, está descrito que a G α olf se encontra pouco localizada na membrana citoplasmática celular quando expressa em sistemas heterólogos, explicação possível para o resultado na marcação da G α olf, com localização citoplasmática, sem definir um padrão membranar.

Por sua vez a ACIII mostrou localizar-se no citoplasma e nos núcleos das células epiteliais do CP.

Para melhor se compreender a sua localização, sabe-se que a forma glicosilada da ACIII apresenta uma localização tipicamente membranar. Tal como acontece no EO, onde a ACIII se situa sobre a membrana ciliar dos neurónios olfactivos sensoriais.

No CP e pela análise do Western blot verifica-se que a ACIII existe unicamente na sua forma não-glicosilada, (tamanho de 55kDa), podendo desta forma não apresentar uma localização restrita à membrana celular e estar, por isso, presente no núcleo.

Estudos realizados por vários investigadores nos últimos anos, mostram a importância da presença de uma sinalização quimiossensitiva do tipo olfactiva em vários tecidos e células.

Pluznick e colaboradores (2008) desenvolveram um estudo no rim, para averiguar a presença dos constituintes da via da transdução olfactiva neste tecido e a sua funcionalidade, já que o rim é um órgão que monitoriza de forma rigorosa a composição química do fluido tubular.

Este estudo mostrou que as proteínas G α olf, ACIII e dos OR se encontram expressas nas células do rim e testes funcionais desenvolvidos provaram que a ausência desta via de sinalização no rim compromete a função deste órgão, apresentando uma diminuição da taxa de filtração glomerular.

Um outro estudo desenvolvido por Itakura e colaboradores (2006) evidenciou a presença das proteínas da via da transdução olfactiva na placenta. Este estudo sugere que OR's permitem a detecção de sinais químicos presentes na interface mãe/filho criada pela placenta e que a transdução desses sinais induza respostas (como a libertação de factores de crescimento) em função das necessidades fisiológicas do feto.

Spehr e colaboradores (2003) desenvolveram um estudo em espermatozóides, mostrando que a presença dos OR's nestas células promove a quimiotaxia em direcção ao óócito, contribuindo desta forma, para os eventos da fecundação.

Os OR foram também identificados no córtex cerebral pelo estudo de Otaki e colaboradores (2003), sugerindo que pequenas moléculas químicas ambientais que circulem pelo corpo possam atravessar a barreira hematoencefálica, e ser detectadas localmente pelo encéfalo. Por outro lado, a presença de OR's no córtex cerebral pode permitir ainda a detecção de químicos produzidos endogenamente na vizinhança.

Com base em todos estes dados pensa-se que a presença de todos os componentes da via da transdução olfactiva nas células epiteliais do CP permita o reconhecimento de estímulos químicos presentes no CSF, como moléculas tóxicas, citocinas ou neuropéptidos expressos em situações fisiológicas normais e também de patologia ou trauma, induzindo um resposta celular que permita colmatar as necessidades fisiológicas do SNC.

Parece que a cascata da transdução olfactiva está activa nas células de CP e poderá funcionar como um sistema de alerta e de protecção do SNC, sendo contudo necessário realizar estudos funcionais para o comprovar.

6. Perspectivas futuras

Com a realização deste trabalho foi possível provar a presença de uma via quimiossensitiva do tipo olfactiva no CP de rato. Sugere-se que este via de transdução de sinal possa estar activa no CP de rato, funcionando como um sistema de alerta e de protecção do SNC, através da possível detecção de moléculas químicas circulantes no CSF. Para se comprovar esta hipótese estudos funcionais terão que ser realizados.

Um dos possíveis estudos a realizar passa por estimular culturas primárias de células epiteliais de CP com diferentes moléculas químicas e estudar os potenciais eléctricos induzidos nestas células pela interacção dos OR's com os seus ligandos.

Num futuro próximo, para consolidar o estudo da via de transdução olfactiva no CP, pretende-se analisar a expressão do canal nucleotídico cíclico no CP de rato, envolvido produção de cAMP da transdução olfactiva, um segundo mensageiro importante na activação de vias de sinalização celular.

Perspectiva-se ainda testar a colocalização dos OR's com um marcador de retículo e um marcador de membrana, de forma a compreender melhor a localização celular dos mesmos.

7. Bibliografia

Baxendale, R. W. and L. R. Fraser (2003). "Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa." Mol Reprod Dev **66**(2): 181-189.

Bush, C.F. and Hall, A. (2008). "Olfactory receptor trafficking to the plasma membrane". Cellular and Molecular Life Sciences **65**: 2289-2295.

Chodobski, A. and J. Szmydynger-Chodobska (2001). "Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis." Microsc Res Tech **52**(1): 65-82.

Conn, P. M. Neuroscience in Medicine. 2nd edition. Humana Press, 2003.

DeMaria, S. and J. Ngai (2010). "The cell biology of smell." J Cell Biol **191**(3): 443-452.

Emerich, D. F., S. J. Skinner, et al. (2005). "The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain." Bioessays **27**(3): 262-274.

Gautier-Courteille, C., M. Salanova, et al. (1998). "The olfactory adenylyl cyclase III is expressed in rat germ cells during spermiogenesis." Endocrinology **139**(5): 2588-2599.

Gherzi-Egea, J. F. and N. Strazielle (2001). "Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus." Microsc Res Tech **52**(1): 83-88.

Hurowitz, E. H., J. M. Melnyk, et al. (2000). "Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes." DNA Res **7**(2): 111-120.

Itakura, S., K. Ohno, et al. (2006). "Expression of Golf in the rat placenta: Possible implication in olfactory receptor transduction." Placenta **27**(1): 103-108.

Marieb E, Hoehn K. Human Anatomy & Physiology. 7th edition. USA: Pearson, 2007.

Menini, A. The Neurobiology of olfaction. 1st edition. CRC Press, 2010

Milligan, G. and E. Kostenis (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S46-55.

Pluznick, J. L., D. J. Zou, et al. (2009). "Functional expression of the olfactory signaling system in the kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 2059-2064.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Lawrence, C. K. Lamantia, . S., McNamara, J. O. Williams, S. M. Neurosciemce. 3rd edition, Sinauer Associates Inc., 2005

Quintela, T. Gonçalves, I. et al., (2009). "17 β estradiol induces transthyretin expression in murine choroid plexus via an intracellular oestrogen receptor dependent pathway." Molecular and Cellular neurobiology **9** (4): 75-83.

Redzic, Z. B. and M. B. Segal (2004). "The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium." Adv Drug Deliv Rev **56**(12): 1695-1716.

Ronnett, G. V. and C. Moon (2002). "G proteins and olfactory signal transduction." Annu Rev Physiol **64**: 189-222.

Smith, D. E., C. E. Johanson, et al. (2004). "Peptide and peptide analog transport systems at the blood-CSF barrier." Adv Drug Deliv Rev **56**(12): 1765-1791.

Stevens, A. and Lowe, J. Human Histology. 2nd edition. Mosby, 1997.

Tresguerres, M., Levin, L.R., et al. (2011). "Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase". NIH **79** (12): 1277-1288.

Uraih, L.C. and Maronpot, R.R (1990). "Normal histology of the nasal cavity and application of special techniques." Environmental Health Perspectives **85**: 187-208.

Vosshall, L. B. (2004). "Olfaction: attracting both sperm and the nose." Curr Biol **14**(21): R918-920.

Wackym, P. A., J. A. Cioffi, et al. (2005). "G-protein Golfalpha (GNAL) is expressed in the vestibular end organs and primary afferent neurons of Rattus norvegicus." J Vestib Res **15**(1): 11-15.

Wei, J., A. Z. Zhao, et al. (1998). "Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals." Neuron **21**(3): 495-504.

Wong, S. T., K. Trinh, et al. (2000). "Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice." Neuron **27**(3): 487-497.

Young, B., Lowe, J.S., Stevens, A., Heath, J.W. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. 5th edition. churchill livingstone, 2008.