



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Regulação da Apoptose por Hormonas Sexuais no Plexo Coroide: Implicações na *Clearance* do β - Amiloide

Ana Raquel Ferreira da Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Cecília Santos
Co-orientador: Prof. Doutora Isabel Gonçalves

Covilhã, Junho de 2013



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Centro de Investigação em Ciências da Saúde

Regulação da Apoptose por Hormonas Sexuais no Plexo Coroide: Implicações na *Clearance* do β - Amiloide

Ana Raquel Ferreira da Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Cecília Santos
Co-orientador: Prof. Doutora Isabel Gonçalves

A parte experimental desta dissertação foi realizada no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

Covilhã, Junho de 2013

O conteúdo desta Dissertação é da exclusiva responsabilidade do autor.

(Ana Raquel Ferreira da Costa)

Agradecimentos

Não posso deixar de agradecer a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, dos quais destaco:

A Professora Doutora Cecília Santos, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de investigação e pela orientação científica e conhecimentos transmitidos.

O projeto PTDC/SAU-NMC/114800/2009 liderado pela Professora Doutora Cecília Santos.

A Professora Doutora Isabel Gonçalves, pelo apoio, compreensão e conhecimentos transmitidos, e pela confiança que depositou em mim.

A Professora Doutora Helena Marcelino, pela disponibilidade e bons conselhos, e por todos os ensinamentos a nível laboratorial essenciais à realização deste trabalho.

A Professora Doutora Telma Quintela, pelos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos, e também pela disponibilidade demonstrada.

A Professora Doutora Mafalda Fonseca, pelos conhecimentos e ajuda na realização dos ensaios de citometria de fluxo.

As colegas de laboratório, Joana Tomás, Cláudia Sousa, Filipa Pinheiro e Carla Gomes, pelo apoio e amizade; e um obrigado especial à Joana, pela disponibilidade, conhecimentos e paciência prestados ao longo deste ano.

Aos meus amigos da Guarda, em especial a Catarina Afonso, Joana Andrade, Inês Santos, Mariana Luís e Pedro Santos que, mesmo estando longe, sempre me apoiaram e motivaram.

As colegas de casa, Mariana Tomás, Lícia Ferreira e Marta Marques, pela paciência e motivação no final de cada dia.

Aos amigos da faculdade, especialmente aos melhores amigos Ana Canheto, Sónia Miguel, Raquel Bernardino, Catarina Silva, Sónia Duarte e Ângelo Santos, pela paciência e amizade que demonstraram nestes 5 anos; e um obrigado especial à Ana porque me acompanhou e apoiou todos os dias ao longo deste ano, e pela amizade construída durante estes 5 anos.

A minha família, que durante toda a minha vida me apoiou, ouviu e deu bons conselhos.

E finalmente, e mais importante, os meus pais, por todo o esforço que fizeram para eu chegar até aqui, pela compreensão e paciência, muito obrigado por sempre terem acreditado em mim e pela educação e amor que me deram.

Resumo

A morte celular mediada pela disfunção mitocondrial pode estar associada com a acumulação de péptido β -amiloide (a-beta), que é um dos principais fatores causadores da doença de Alzheimer. O plexo coroide (CP) tem um papel fundamental na remoção do a-beta do líquido cefalorraquidiano (CSF), evitando a sua acumulação e consequente morte neuronal. No entanto, o a-beta pode também induzir a apoptose nas células epiteliais do plexo coroide, com a consequente redução da eficiência da barreira deste tecido. As hormonas sexuais regulam a acumulação de a-beta, reduzindo os seus níveis e, consequentemente, a apoptose. O CP é um alvo reconhecido das hormonas sexuais, e estas hormonas afetam a expressão de vários genes da via apoptótica e, portanto, podem afetar a apoptose induzida por a-beta nestas células. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de genes apoptóticos no CP de rato e estudar o efeito das alterações nos níveis de hormonas esteroides na expressão destes genes, o que pode ter um papel importante na neuroproteção relativa ao péptido β -amiloide e, portanto, na doença de Alzheimer. Começámos por analisar a expressão de vários genes da cascata apoptótica (Casp2, Casp3, Cflar, Casp9, BCl2l1, Mdm4p53, GzmC e Cox4i1), por PCR, na linha celular de CP, Z310, e no plexo coroide de rato, confirmando-se a sua expressão neste epitélio. Além disso, as proteínas de apoptose caspase-3 e Cox4 também foram localizadas por imunohistoquímica e whole-mount (IHC de fluorescência) no citoplasma das células do CP de rato. A expressão de BCl2l1, Mdm4p53, Casp2, Cflar e Casp9 foi comparada por real-time PCR por meio do qual foi possível confirmar que estes genes são diferencialmente expressos entre animais machos e fêmeas Sham e OOX e OVX, respetivamente. A partir desta análise, podemos concluir que a apoptose no CP está sujeita a regulação pelas hormonas sexuais em ratos machos e fêmeas. Estão a decorrer estudos, em células de CP, para analisar o impacto dos níveis hormonais na apoptose induzida pelo a-beta.

Palavras-chave

Plexo coroide; apoptose; hormonas esteroides; doença de Alzheimer; β -amiloide.

Abstract

Cell death mediated by mitochondrial dysfunction may be associated with the accumulation of β -amyloid peptide (a-beta), which is one of the major causative factors of Alzheimer's disease. The choroid plexus (CP) has a key role on the *clearance* of a-beta from the cerebrospinal fluid (CSF), thereby preventing its accumulation and consequent neuronal death. However, a-beta may also induce apoptosis in the choroid plexus epithelial cells, thereby reducing the efficiency of this tissue barrier. Sex hormones regulate the accumulation of a-beta, reducing its levels and consequently apoptosis. CP is a recognized target for sex hormones, and these sex hormones affect the expression of several genes of the apoptotic pathway and thus may affect a-beta induced apoptosis in these cells. The aim of this work was to analyze the expression of apoptotic genes in rat CP and study the effect of changes in steroid hormones levels in the expression of these genes, which may have an important role in neuroprotection against β -amyloid peptide and hence Alzheimer's disease. We began by analyzing the expression of several genes of the apoptotic cascade (Casp2, Casp3, Cflar, Casp9, Bcl2l1, Mdm4p53, GzmC and Cox4i1), by PCR, in the CP cell line Z310 and in rat CP, confirming their expression in this epithelia. In addition, the apoptotic proteins Casp3 and Cox4 were also located by immunohistochemistry and whole-mount (Fluorescence IHC) in the cytoplasm of rat CP cells. The expression of Bcl2l1, Mdm4p53, Casp2, Cflar and Casp9 was compared by Real time PCR through which it was possible to confirm that these genes are differentially expressed between male and female sham and OOX or OVX rats. From this analysis we conclude that apoptosis in CP is subject to regulation by sex hormones in male and female rats. Studies are underway in CP cells, to analyze the impact of hormone levels in a-beta induced apoptosis.

Keywords

Choroid plexus; apoptosis; steroid hormones; Alzheimer's disease; amyloid- β

Índice

I. Introdução	1
1. Plexo Coroide	2
1.1. Estrutura e Morfologia	3
1.2. Funções	4
1.2.1. Produção e Secreção de Líquido Cefalorraquidiano	4
1.2.2. Secreção de Outros Compostos	5
1.2.3. Síntese Proteica	5
1.2.4. Proteção	6
1.3. Alterações do Plexo Coroide Associadas ao Envelhecimento	6
1.3.1. Alterações Morfológicas	6
1.3.2. Alterações Funcionais	7
1.3.3. Alterações Mitocondriais	7
2. Apoptose	8
2.1. Moléculas-Chave	9
2.2. Vias Apoptóticas	10
2.2.1. Via Extrínseca	11
2.2.2. Via Intrínseca	12
2.2.3. Via das Perforinas/Granzimas	13
2.2.4. Fase da Execução	13
2.3. Regulação da Apoptose por Hormonas Sexuais	14
2.3.1. Estrogénios	14
2.3.2. Androgénios	15
3. Doença de Alzheimer	15
3.1. <i>Clearance</i> do β -Amiloide	16
3.2. Doença de Alzheimer e Hormonas Sexuais	16
3.2.1. Estrogénios	17
3.2.2. Progesterona	17
3.2.3. Androgénios	17
3.3. Doença de Alzheimer e Apoptose	18
4. Objetivo	19

II. Material e Métodos	20
1. Linhas Celulares de Plexo Coroide de Rato: Z310 e RCP	21
1.1. Cultura de Células	22
1.2. Passagem de Células	22
1.3. Contagem de Células	22
1.4. Congelamento/Descongelação de Células	23
2. RNA Total	23
2.1. Extração de RNA total	23
2.2. Determinação da Integridade do RNA total	24
2.3. Quantificação do RNA total	24
3. Transcrição Reversa e PCR	25
4. PCR em Tempo Real	26
5. Imunohistoquímica	27
6. Whole-Mount (IHC de Fluorescência)	28
7. Citometria de Fluxo	29
III. Resultados	30
1. Expressão da Via Apoptótica na Linha Celular Z310 de Plexo Coroide de Rato: Efeito das Hormonas	31
1.1. PCR Convencional	31
1.2. PCR em Tempo Real	32
1.3. Imunohistoquímica	34
1.4. Whole-Mount (IHC de Fluorescência)	35
1.5. Citometria de Fluxo	36
IV. Discussão	38
V. Conclusão e Perspetivas Futuras	41
VI. Referências Bibliográficas	43

Lista de Figuras

Figura 1 – Vista lateral esquerda do sistema ventricular do encéfalo

Figura 2 – Estrutura do Plexo Coroide

Figura 3 – Vias da Apoptose

Figura 4 – Vias celulares da neurotoxicidade da proteína β -amiloide na doença de Alzheimer

Figura 5 – Morfologia das células epiteliais coroides em cultura

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1.5% corado com GreenSafe dos produtos de PCR dos genes apoptóticos em estudo

Figura 7 – Níveis de expressão de mRNA de Bcl2l1 em CP de rato

Figura 8 – Níveis de expressão de mRNA de Mdm4p53 em CP de rato

Figura 9 – Níveis de expressão de mRNA de Casp2 em CP de rato

Figura 10 – Níveis de expressão de mRNA de Cflar em CP de rato

Figura 11 – Níveis de expressão de mRNA de Casp9 em CP de rato

Figura 12 – Localização das proteínas apoptóticas Casp3 e Cox4 em CP de rato por Imunohistoquímica

Figura 13 – Imunofluorescência com os anticorpos Casp3 e Cox4 dos CPs de rato por Whole-Mount (IHC de Fluorescência)

Figura 14 – Análise da apoptose induzida pelo α -beta na linha celular RCP por citometria de fluxo, através da marcação com anexina V-FITC e PI

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sequência dos *primers* dos genes da apoptose utilizados neste estudo

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

AD	<i>Alzheimer Disease</i> (Doença de Alzheimer)
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i> (Fator Apoptótico Ativador de Protease 1)
ApoE	Alipoproteína E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (Proteína Precursora Amiloide)
AR	<i>Androgen Receptor</i> (Recetor de Androgénios)
ATP	Adenosina Trifosfato
a-beta	<i>Amyloid-B</i> (β -Amiloide)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (Linfoma de células B 2)
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albumina de Soro Bovino)
CAD	<i>Caspase-Activated DNase</i> (DNase Ativada de Caspase)
Ca _i	Cálcio Intracelular
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i> (Domínio de Recrutamento de Caspase)
Casp	Caspase
cDNA	DNA Complementar
Cox4	Citocromo c Oxidase IV
CP	<i>Choroid Plexus</i> (Plexo Coroide)
CPEC	<i>Choroid Plexus Epithelial Cells</i> (Células Epiteliais do Plexo Coroide)
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i> (Líquido Cefalorraquidiano)
CTL	<i>Cytotoxic T Cell</i> (Célula T Citotóxica)
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i> (Complexo de Sinalização Indutor de Morte)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxirribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
ER	<i>Estrogen Receptor</i> (Recetores de Estrogénios)
FADD	<i>Fas-Associated protein with Dead Domain</i> (Proteína Fas Associada ao Domínio de Morte)
FBS	<i>Fetal Serum Bovine</i> (Soro Fetal Bovino)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de Fluoresceína)
Gzm	Granzima
IAP	Inibidor de Apoptose
ICAD	Inibidor da CAD
IHC	Imunohistoquímica
LDH	Lactato Desidrogenase

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Maior de Histocompatibilidade)
OOX	<i>Oophorectomized</i> (Ooforectomizado)
OVX	<i>Ovariectomized</i> (Ovariectomizado)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PFA	Paraformaldeído
PI	<i>Propidium Iodide</i> (Iodeto de Propídeo)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
RCP	<i>Rat Choroid Plexus</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigénio)
SDH	Sucinato Desidrogenase
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TTR	Transtirretina

I. Introdução

1. Plexo Coroide

O sistema nervoso é o sistema principal de controlo e comunicação dos seres vivos, atuando do seguinte modo: 1) usa milhões de recetores sensoriais para monitorizar alterações ocorridas dentro e/ou fora do corpo; 2) processa e interpreta o *input* sensorial; e 3) causa uma resposta motora por ativação dos órgãos efetores (Marieb and Hoehn 2007). Apesar de altamente integrado, pode ser dividido em duas partes principais. O sistema nervoso central (SNC) é constituído pelo encéfalo (constituído por cérebro, diencefalo, cerebelo e tronco cerebral) e medula espinal, que constituem o centro integrador e de comando do sistema nervoso, pois interpretam a entrada de sinais sensoriais e enviam respostas motoras. Por outro lado, o sistema nervoso periférico (SNP) consiste maioritariamente nos nervos que se estendem desde o SNC até ao resto do corpo, servindo de comunicação e ligação entre eles, e ainda em recetores sensoriais e gânglios (Seeley 2001). O SNC encontra-se protegido pelo crânio, meninges e líquido cefalorraquidiano (CSF), bem como pela barreira hematoencefálica. As meninges são três membranas de tecido conetivo que envolvem o SNC: a dura-máter, a aracnoide e a pia-máter (Marieb and Hoehn 2007).

O encéfalo contém um sistema ventricular composto por quatro orifícios internos, denominados ventrículos, que surgem de expansões do lúmen do tubo neural embrionário e são contínuos entre si e também com o canal central da medula espinal (Figura 1) (Marieb and Hoehn 2007). Estas câmaras ventriculares ocas estão preenchidas com CSF e, juntamente com os canais que fazem a comunicação entre elas, encontram-se revestidas por células epiteliais especializadas, as células endoteliais. Os ventrículos laterais pareados, profundos dentro de cada hemisfério cerebral, são câmaras largas em forma de arco que refletem o padrão do crescimento cerebral, separados inicialmente apenas por uma fina membrana designada septo pelúcido (Marieb and Hoehn 2007). Cada ventrículo lateral comunica com o 3º ventrículo no diencefalo através do forâmen interventricular (forâmen de Monro) e é contínuo com o 4º ventrículo via aqueduto de Sylvius. O 4º ventrículo atravessa o mesencefalo e estende-se até à ponte e bolbo raquidiano, sendo contínuo inferiormente com o canal central da medula espinal (Seeley 2001).

Os plexos coroides (CPs) são pequenas estruturas intraventriculares, pesam cerca de 3 g no Homem, contêm cerca de 100×10^6 células (Dohrmann 1970), e formam uma interface única entre o sangue e o CSF. Pela sua localização, podem distinguir-se dois CPs ventriculares localizados em cada um dos ventrículos laterais, um CP mediano localizado no teto do terceiro ventrículo, e um CP no quarto ventrículo (Serot et al. 2012). Estas estruturas altamente vascularizadas são compostas por vilosidades com capilares, tecido conjuntivo, e por uma monocamada de células epiteliais ciliadas (Emerich et al. 2005). Os CPs são fundamentais para manter o equilíbrio de água e, portanto, o volume do cérebro (Serot et al. 2003), pois o CSF por eles secretado que se encontra dentro e junto ao encéfalo e medula

espinal, forma um amortecimento líquido que permite a flutuabilidade das estruturas do SNC, reduzindo o peso encefálico (Marieb and Hoehn 2007). O CSF circula dos ventrículos laterais, através dos dois forâmen de Monro para o terceiro ventrículo, a partir do qual passa pelo estreito Aqueduto de Sylvius para o quarto ventrículo. O CSF passa também para o espaço subaracnoideu através do forâmen de Luschka e forâmen de Magendie, e do espaço subaracnoideu para o sangue venoso (Del Bigio 1995).

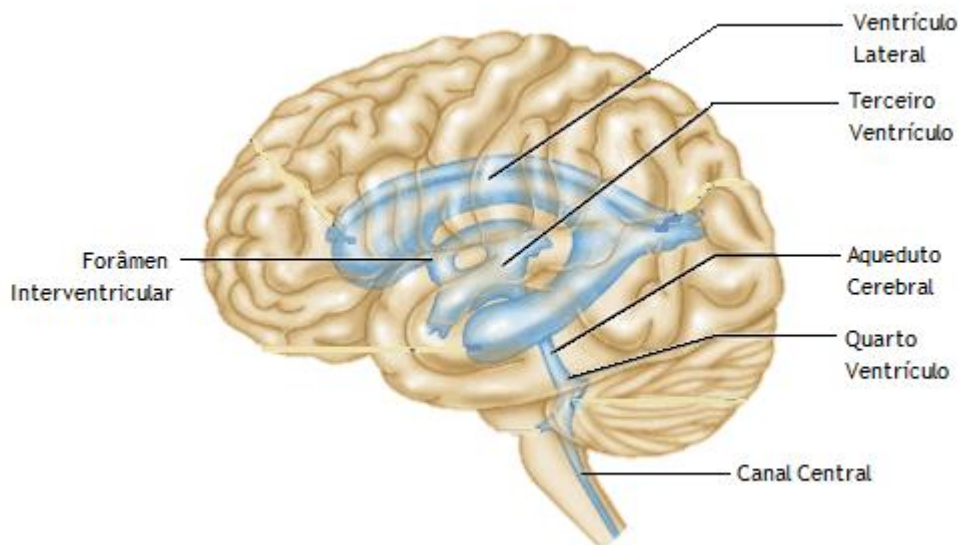


Figura 1 - Vista lateral esquerda do sistema ventricular do encéfalo. O sistema ventricular é constituído por quatro ventrículos: dois ventrículos laterais, o terceiro ventrículo e o quarto ventrículo. Adaptada de (Marieb and Hoehn 2007).

1.1. Estrutura e Morfologia

O plexo coroide é composto por vilosidades, com um eixo vascular central, coberto por um epitélio cuboide uniestratificado, com uma bordadura em escova (Dohrmann 1970), e numerosas mitocôndrias necessárias para manter o elevado metabolismo respiratório e os requisitos de energia (Cornford et al. 1997). Devido à sua elevada vascularização, os CPs têm um ótimo fornecimento de sangue, entre 4 a 7 vezes maior do que o fluxo cerebral, dependendo da espécie (Faraci et al. 1989). Os plexos coroides constituem a barreira sangue-CSF, formada por uma única camada de células epiteliais do plexo coroide (CPEC). As CPEC possuem *tight junctions* e microvilosidades no seu lado apical (ventricular) (Figura 2), aumentando a superfície de troca para o CSF (Ek et al. 2011), e encontram-se sobre uma membrana basal epitelial em torno de um estroma fino com numerosas fibras de colagénio e grandes capilares com endotélio fenestrado com poros de elevada permeabilidade (Dohrmann 1970). As CPEC estão separadas dos vasos centrais por uma fina membrana basal (Dohrmann

1970; Serot et al. 2000b) e o seu núcleo é redondo, localizado centralmente, e associado a um ou mais nucléolos. No SNC adulto, as CPEC são um componente essencial da barreira, pois segregam para o sangue, CSF e espaço intersticial do SNC (Segal 2000a). Existem também algumas células dendríticas no epitélio e estroma, sugerindo que os CPs podem participar ativamente na proteção imunológica do cérebro (Serot et al. 2000a).

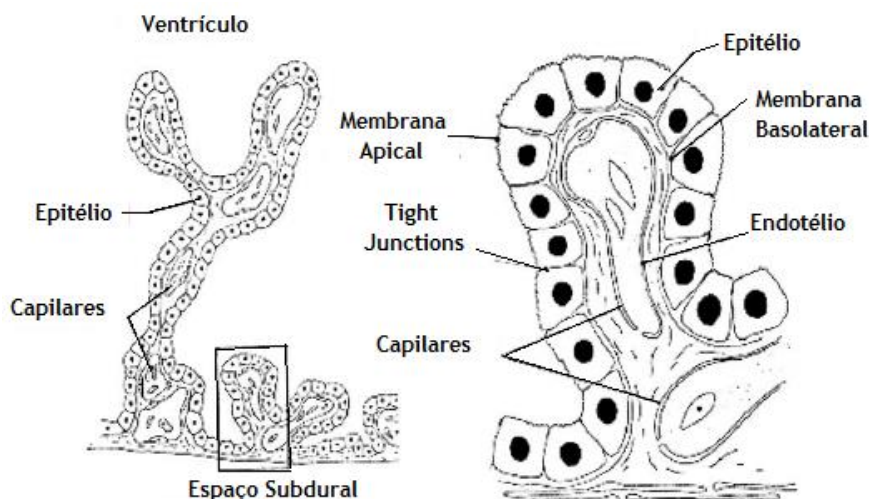


Figura 2 - Estrutura do Plexo Coroide. Cada plexo coroide possui uma estrutura ramificada com vilosidades que se projetam para o ventrículo encefálico, cuja rede de capilares se encontra coberta por uma única camada de células epiteliais unidas por *tight junctions*. Adaptada de (Brown et al. 2004).

1.2. Funções

1.2.1. Produção e Secreção de Líquido Cefalorraquidiano

O encéfalo encontra-se submerso no CSF, que lhe confere proteção mecânica e diminui o peso aparente em cerca de 60% (Segal 1993), e mantém o meio extracelular, através de processos de reparação pós-traumáticos ou desintoxicação (Serot et al. 2003). Além de atuar também como via de drenagem para o cérebro, o CSF pode ser uma importante via pela qual alguns nutrientes chegam ao SNC, atuando como via de comunicação dentro do SNC, isto é, transporta hormonas e transmite-as entre as diferentes áreas do cérebro (Johanson et al. 1999).

A secreção do CSF é uma das funções mais importantes dos CPs, que secretam 90% do CSF produzido por eles (Serot et al. 2003). O volume total de CSF é cerca de 150-270 mL, embora

apenas cerca de 25% esteja dentro dos ventrículos. Em ratos, as taxas de secreção foram estimadas em cerca de 3.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Redzic et al. 2005), e uma vez secretado, o CSF move-se através do aqueduto de Sylvius, quarto ventrículo, forâmen de Magendie, espaços subaracnoides e em torno do tronco cerebral (Sakka et al. 2011). A formação do CSF é realizada por duas enzimas: a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e a anidrase carbónica (Wostyn et al. 2011) e, em humanos, é formado a uma taxa de cerca de 0.4 mL/min. No entanto, o CSF não é um simples ultrafiltrado, e a sua composição é diferente da do plasma (Segal 2000b). O pH do CSF é ligeiramente ácido e, em relação ao plasma, os níveis de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , proteínas e glucose são mais baixos, mas os níveis de Mg^{2+} e Cl^- são mais elevados (Segal 2000a), bem como os níveis de folato que são 2 a 3 vezes maiores no CSF do que no plasma (Spector 1977). A transtirretina (TTR) representa 20% das proteínas sintetizadas pelos CPs e 25% das proteínas do CSF, sendo que a TTR do CSF é quase exclusivamente sintetizada pelos CPs (Palha et al. 2000).

1.2.2. Secreção de Outros Compostos

O epitélio do plexo coroide está soberbamente adaptado para a secreção devido à sua membrana de bordadura em escova muito bem desenvolvida (lado apical) e às invaginações da membrana basolateral do epitélio do lado do sangue que aumentam a área da superfície. Além disso, as células epiteliais contêm numerosas mitocôndrias e retículo endoplasmático bem desenvolvidos. Estas são características típicas de células secretoras. O CP é o local perfeito para a distribuição de moléculas tanto local como globalmente para o encéfalo, porque possui numerosos sistemas de transporte específicos, contém uma grande variedade de recetores, e também serve como principal fonte de compostos biologicamente ativos, capacidades que lhe permitem monitorizar e responder à bioquímica do cérebro através da manipulação e manutenção dos níveis de base do meio extracelular em todo o SNC (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2000; Stopa et al. 2001). O epitélio dos CPs medeia a absorção do K^+ a partir do CSF para o sangue (Wright 1978), e este transporte de K^+ é importante na manutenção da concentração de K^+ no CSF, e está ligado mecanicamente ao processo de secreção do CSF (Emerich et al. 2005).

1.2.3. Síntese Proteica

As CPEC possuem atividade enzimática intensa, pois sintetizam e segregam numerosas moléculas (Aldred et al. 1995). Devido à expressão de vários recetores hormonais diferentes, que medeiam a ação das hormonas sobre o plexo coroide, o metabolismo local e a secreção/composição do CSF podem ser afetados (Chodobski and Szmydynger-Chodobska

2000). Além disso, os CPs sintetizam e secretam vários polipéptidos para o CSF que podem, por um lado, ter efeitos autócrinos ou parácrinos, pois as CPEC possuem recetores para esses polipéptidos, e por outro lado conduzir esses fatores num maior fluxo de CSF, alcançando células-alvo distantes no tecido cerebral (Stopa et al. 2001). De entre as proteínas secretadas podem destacar-se a transferrina, citocinas, fatores de crescimento e transtirretina (Aldred et al. 1995; Stopa et al. 2001), a proteína mais abundante.

1.2.4. Proteção

Os CPs protegem-se ativamente de compostos provenientes do cérebro e, conseqüentemente, apresentam funções protetoras importantes. Dentro dos CPs, a função de barreira é transferida da vasculatura para o epitélio onde forma *tight junctions* entre as células epiteliais de forma a conferir as propriedades de permeabilidade das células individuais (Vorbrot and Dobrogowska 2003). Além de fornecer solutos orgânicos de suporte do cérebro, as secreções dos CPs ajustam o pH, osmolaridade, concentração de K^+ e conteúdo imune das moléculas do fluido extracelular do SNC (Johanson et al. 2004). O plexo coroide protege o cérebro contra insultos neurotóxicos agudos, pois contém: 1) concentrações elevadas de glutathione, cisteína e metalotioneínas que potencialmente sequestram agentes tóxicos que circulam no CSF; 2) enzimas de proteção, tais como a superóxido dismutase, a glutathione-S-transferase e as glutathione peroxidase e redutase, que fornecem uma barreira de proteção contra o stress oxidativo dos radicais livres; e 3) sistemas de transporte de iões orgânicos e proteínas de resistência a múltiplas drogas para exportação de compostos nocivos a partir do CSF. Além disso, o CP retransmite informação entre o sistema imunitário e o cérebro, através da indução local coordenada de citocinas pró-inflamatórias (Lacroix et al. 2006), e expressão de moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) pelas CPEC. A capacidade de apresentação de antígenos implica que os CPs façam parte de um sistema de vigilância intrínseco de defesa contra agentes patogénicos sanguíneos e antígenos localizados no CSF (Emerich et al. 2005).

1.3. Alterações do Plexo Coroide Associadas ao Envelhecimento

1.3.1. Alterações Morfológicas

Com o envelhecimento, os plexos coroides sofrem variadas alterações morfológicas. Em ratos, as células epiteliais diminuem 20% e a membrana basal epitelial e o estroma engrossam (Serot et al. 2001). Em humanos, as células epiteliais contêm corpos *Biondi* (estruturas em forma de

anel) no citoplasma e depósitos de lipofucsina, cuja presença provavelmente altera a função celular (Wen et al. 1999). As células decrescem 10%, enquanto a membrana basal epitelial duplica a sua espessura e se torna irregular. Além disso, as células epiteliais possuem um núcleo irregular e alongado, microvilosidades significativamente encurtadas e vacúolos lipídicos. O estroma fibroso engrossa e passa a conter fibras de colagénio, órgãos de hialina, corpos *psammoma* (agregados lamelares redondos de cálcio) e calcificações, cuja taxa aumenta significativamente com a idade (Shuangshoti and Netsky 1970; Serot et al. 2003). As paredes das artérias engrossam e as fibras elásticas sofrem fragmentação (Dohrmann 1970; Shuangshoti and Netsky 1970).

1.3.2. Alterações Funcionais

Ao longo do processo de envelhecimento, as atividades enzimáticas dos CPs, incluindo os níveis de enzimas envolvidas na secreção de CSF, diminuem (Ferrante and Amenta 1987; Kvitnitskaia-Ryzhova and Shkapenko 1992). Assim, a secreção de CSF diminui cerca de 45% em modelos animais, provocando consequentemente um aumento do volume de CSF causado pela atrofia cerebral, pois o *turnover* demora mais tempo (Preston 2000). Em adultos jovens, o volume é cerca de 140 mL e aumenta para cerca de 300 mL em idosos (Courchesne et al. 2000). A resistência ao fluxo do CSF também aumenta significativamente com o envelhecimento, o que está relacionado com a fibrose das meninges e diminuição da reabsorção (Silverberg et al. 2003). A concentração de proteínas é menor em jovens do que em idosos, e este aumento é inversamente proporcional à diminuição do volume de CSF relacionada com a idade. Os níveis de TTR aumentam gradualmente durante o processo do envelhecimento (Serot et al. 1997) e as células que revestem as cavidades ventriculares perdem as *tight junctions*, permitindo trocas permanentes (Serot et al. 2012).

1.3.3. Alterações Mitocondriais

Em 1972, Harman foi o primeiro a propor que as mitocôndrias podem desempenhar um papel central no processo do envelhecimento (Harman 1972) e, mais tarde, foi sugerido que a acumulação de mutações do DNA mitocondrial (mtDNA) é uma das principais causas de doenças relacionadas com a idade (Linnane et al. 1989), pois níveis muito altos de mtDNA mutado dentro de uma célula individual, levam à diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória. Como referido anteriormente, a formação de uma única camada de células de barreira entre o sangue e o CSF, permite aos plexos coroides controlar tanto a quantidade como a composição do CSF usando mecanismos de secreção e excreção, alguns dos quais dependentes de energia (Saunders et al. 2002). Nos primatas, as CPEC têm um teor

mitocondrial muito elevado (entre 12 a 15% do volume citoplasmático total da célula) e são claramente bastante dependentes do metabolismo oxidativo. Uma deficiência na citocromo c oxidase do complexo IV (Cox4), que tem três das treze subunidades codificadas por mtDNA, resulta em perturbações da produção celular de ATP (adenosina trifosfato) pelas células através da cadeia respiratória mitocondrial, podendo induzir a formação de corpos *Biondi* (Roder et al. 1993). As enzimas relacionadas com a respiração anaeróbica e fosforilação oxidativa, tais como lactato desidrogenase (LDH) e succinato desidrogenase (SDH) sofrem um declínio na sua atividade de, respetivamente, 9% e 26% no epitélio coróide envelhecido (Ferrante and Amenta 1987). Existem também sugestões de uma redução paralela na eficiência do metabolismo da glucose no tecido cerebral, uma vez que os níveis de lactato no CSF aumentam com a idade (Yesavage et al. 1982). Uma vez que o requisito de oxigénio pelos CPs aumenta, o potencial de danos oxidativos por meio da produção de radicais livres torna-se elevado.

2. Apoptose

O termo apoptose (*a-po-toe-sis*) foi usado pela primeira vez por Kerr, Wyllie e Currie em 1972 (Kerr et al. 1972) para descrever uma forma morfológicamente distinta de morte celular. Alguns anos mais tarde, a apoptose foi aceite como uma forma distinta e importante de morte celular programada, determinada geneticamente, que envolve a eliminação de células (Elmore 2007). A apoptose ocorre durante o desenvolvimento normal e envelhecimento como um mecanismo fisiológico essencial necessário para manter a homeostase em populações de células nos tecidos. Além disso, a apoptose também ocorre como mecanismo de defesa, em reações imunológicas ou quando as células sofrem danos devido a doença ou agentes nocivos (Norbury and Hickson 2001). Embora haja uma grande variedade de estímulos e condições, tanto fisiológicos como patológicos, que podem desencadear apoptose, nem todas as células morrem necessariamente em resposta ao mesmo estímulo.

Morfológicamente, a apoptose é definida pelo aspeto das células a morrer, que inclui: vesículas, condensação da cromatina (picnose), fragmentação nuclear, perda de adesão e de arredondamento (em células aderentes) e diminuição da célula. A célula apoptótica surge então como uma massa redonda ou oval com citoplasma eosinofílico escuro e densos fragmentos de cromatina nuclear roxos. Ocorre também extenso borbulhamento da membrana plasmática, seguido da separação de fragmentos celulares em corpos apoptóticos, que consistem num citoplasma com organelos firmemente juntos, com ou sem fragmentos nucleares, embora a sua integridade continue a existir, pois a membrana plasmática permanece intacta (Elmore 2007). As características bioquímicas incluem fragmentos de DNA

de elevado peso molecular (Cohen et al. 1994), externalização da fosfatidilserina (Martin et al. 1995), e clivagem proteolítica de substratos intracelulares (Martin and Green 1995). Como resultado das mudanças membranares, as células apoptóticas sofrem rápida fagocitose antes da libertação do conteúdo intracelular, não ocorrendo indução de resposta inflamatória (Zimmermann and Green 2001), pois: 1) as células apoptóticas não libertam os seus componentes celulares para o tecido intersticial circundante; 2) são rapidamente fagocitadas pelas células vizinhas, provavelmente prevenindo uma necrose secundária; e 3) as células não produzem citocinas anti-inflamatórias (Savill and Fadok 2000; Kurosaka et al. 2003).

2.1. Moléculas-Chave

A apoptose é regulada pela família de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), pela proteína adaptadora Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1), e pela família das caspases (Yuan and Yankner 2000).

A família de proteínas Bcl-2 tem um papel crucial na transdução de sinal intracelular por apoptose. Os membros da família Bcl-2 podem ser subdivididos em três categorias de acordo com a sua função e estrutura: membros anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-xL; membros pro-apoptóticos, como Bax e Bak; e membros apenas com o domínio de homologia BH3, como Bid, Bad e Bim (Merry and Korsmeyer 1997). Os principais membros anti-apoptóticos, Bcl-2 e Bcl-xL, estão localizados na membrana mitocondrial externa, no retículo endoplasmático e na membrana perinuclear, e impedem as alterações mitocondriais causadas pela libertação de fatores apoptóticos como o citocromo c, que ativa a fase de execução da apoptose. A Bcl-2 e Bcl-xL agem inibindo os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, através heterodimerização (Merry and Korsmeyer 1997). Por outro lado, os membros pro-apoptóticos estão presentes no citosol ou na membrana mitocondrial, embora também sejam encontrados noutros locais como o retículo endoplasmático e envelope nuclear (Zimmermann and Green 2001).

A proteína adaptadora Apaf-1 transmite os sinais de apoptose dos danos mitocondriais para ativar caspases, através da formação de um complexo com o citocromo c libertado pelas mitocôndrias e com a caspase 9, de forma a mediar a ativação da pró-caspase 9 (Zou et al. 1997). A caspase-9 ativada, por sua vez, cliva e ativa a caspase-3 (Yuan and Yankner 2000) e, consequentemente, a fase de execução da apoptose.

As caspases têm atividade proteolítica, apesar de residirem no citoplasma de uma forma inativa (Wolf and Green 1999), e são capazes de clivar proteínas nos resíduos de ácido aspártico, no entanto, diferentes caspases têm especificidades diferentes que envolvem o reconhecimento de aminoácidos vizinhos. As dez principais caspases identificadas foram classificadas em iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10), efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7)

e caspases inflamatórias (caspases 1, 4 e 5) (Cohen 1997; Rai et al. 2005). Além disso, as caspases podem ser também classificadas segundo os motivos de sequência nos seus pró-domínios: caspases com o domínio efetor de morte (caspases 8 e 10) são ativadas pela interação com os domínios intracelulares dos recetores de morte (Fas e Fator de Necrose Tumoral [TNF]); e as restantes caspases com domínio de recrutamento ativador (CARD) são ativadas pelo complexo citocromo *c*/Apaf-1/caspase 9 (Li et al. 1997). As caspases são ativadas por dois eventos de clivagem: a primeira clivagem proteolítica divide a cadeia em subunidades grandes e pequenas; e uma segunda clivagem remove o pró-domínio N-terminal. A caspase ativa é um tetrâmero de duas subunidades grandes e duas pequenas, com dois sítios ativos (Wolf and Green 1999). As caspases a montante, tais como a caspase 8 e a caspase 9, são referidas como caspases iniciadoras, indicando o seu papel no desencadear da apoptose através da ativação das executoras. Por outro lado, as caspases 3, 6 e 7 são denominadas executoras devido ao seu papel na coordenação da morte celular, e são ativadas pelas iniciadoras. As células também contêm IAPs (inibidores da apoptose), inibidores naturais das caspases que podem atuar como inibidores diretos dos dois efetores de morte, a caspase 3 e a caspase 7, ou suprimem a ativação das duas caspases iniciadoras, a caspase 8 e a caspase 9 (LaCasse et al. 1998; Miller 1999).

2.2. Vias Apoptóticas

São duas as principais vias de apoptose: a via extrínseca ou dos recetores de morte e a via intrínseca ou mitocondrial. No entanto, existe uma via adicional, que envolve a citotoxicidade mediada por células T e morte celular dependente de perforinas/granzimas. Todas estas vias convergem para o mesmo terminal, denominado fase da execução (Figura 3), que é iniciada pela clivagem da caspase 3 e resulta na fragmentação do DNA, degradação de proteínas nucleares e do citoesqueleto, ligação cruzada de proteínas, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligandos para recetores de células fagocíticas e, finalmente, absorção por células fagocíticas (Hengartner 2000). Na maioria das células, as caspases estão expressas na forma de proenzima inativa e, uma vez ativadas, podem ativar outras pró-caspases, o que permite a iniciação de uma cascata de proteases, ou podem também agregar-se e autoativar-se. Esta cascata proteolítica amplifica a via de sinalização apoptótica e, assim, conduz à morte celular rápida.

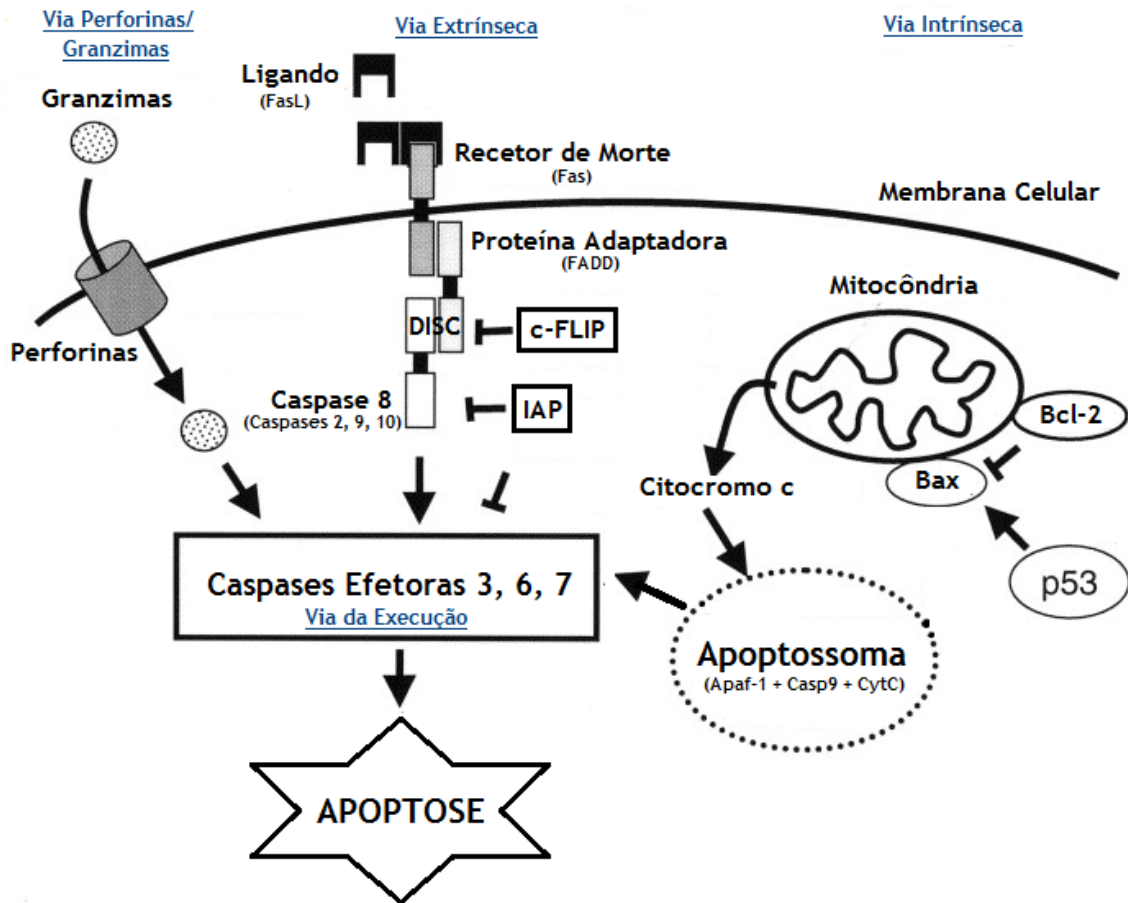


Figura 3 - Vias da Apoptose. A apoptose pode ser originada por três diferentes vias, que culminam na fase da execução. A via das perforinas/granzimas caracteriza-se pela formação de poros membranares pela perforina, permitindo a entrada de granzimas que desencadeiam apoptose. A via extrínseca, também denominada via dos recetores de morte, é caracterizada pela ligação de um ligando ao recetor de morte, que recrutam uma proteína adaptadora, ativando uma caspase iniciadora que leva à fase da execução da apoptose. A via intrínseca caracteriza-se pela resposta mitocondrial a um qualquer estímulo intracelular, que desencadeia a libertação do citocromo c pelas proteínas da família Bcl-2, que se liga ao Apaf-1 e caspase 9, levando à formação do apoptossoma e consequente ativação da fase da execução. Adaptada de (Heussler et al. 2001).

2.2.1. Via Extrínseca

A via extrínseca envolve recetores de morte, que são membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) (Locksley et al. 2001), e por isso é denominada também de via dos recetores de morte. Os membros da família do recetor TNF compartilham domínios extracelulares semelhantes, ricos em cisteína, e têm um domínio citoplasmático denominado "domínio de morte" (Ashkenazi and Dixit 1998), que desempenha um papel fundamental na transmissão do sinal de morte a partir da superfície da célula para as vias de sinalização intracelulares.

Inicialmente, ocorre aglomeração de recetores e a sua ligação com o ligando homólogo. As proteínas citoplasmáticas adaptadoras são então recrutadas, pois exibem domínios de morte correspondentes que se ligam aos recetores. A ligação do ligando Fas (FasL) ao recetor Fas resulta na ligação da proteína adaptadora FADD (Hsu et al. 1995; Wajant 2002), que se associa então com a pro-caspase 8 através de dimerização do domínio efetor de morte e forma um complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A formação do DISC resulta na ativação autocatalítica da pro-caspase 8 (Kischkel et al. 1995) em caspase 8, e a fase de execução da apoptose é desencadeada. A via da apoptose mediada pelos recetores de morte pode ser inibida por uma proteína denominada c-FLIP que se liga ao FADD e à caspase 8, tornando-os ineficazes (Kataoka et al. 1998; Scaffidi et al. 1999).

2.2.2. Via Intrínseca

A via intrínseca, também denominada via mitocondrial, envolve um conjunto diversificado de estímulos não mediados por recetores que produzem sinais intracelulares que atuam diretamente sobre os alvos dentro da célula e são eventos iniciados nas mitocôndrias. Os estímulos que iniciam a via intrínseca produzem sinais intracelulares que podem atuar de forma positiva ou negativa: os sinais negativos envolvem a ausência de certos fatores de crescimento, hormonas e citocinas que podem levar ao fracasso da supressão de morte, desencadeando a apoptose; estímulos positivos incluem radiação, toxinas, hipoxia, hipertermia, infeções virais, e radicais livres. Todos estes estímulos causam alterações na membrana mitocondrial interna, que resultam numa abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, perda do potencial de membrana mitocondrial e libertação para o citosol de duas principais proteínas pró-apoptóticas normalmente sequestradas no espaço intermembranar (Saelens et al. 2004). O citocromo c libertado pela mitocôndria liga-se e ativa o Apaf-1 e a pro-caspase 9, formando o apoptossoma (Chinnaiyan 1999; Hill et al. 2004), e a aglomeração da pro-caspase 9 conduz à ativação da caspase 9. A segunda proteína libertada é a CAD (DNase da caspase ativada), que sofre translocação para o núcleo, onde, após clivagem pela caspase 3, leva à fragmentação do DNA oligonucleossomal e à condensação de cromatina (Enari et al. 1998), embora este seja um evento tardio que ocorre depois da célula ter sido comprometida à morte.

A regulação destes eventos apoptóticos mitocondriais ocorre através dos membros da família de proteínas Bcl-2 (Cory and Adams 2002), na qual a p53 tem um papel fundamental de regulação. As proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL previnem a libertação do citocromo c das mitocôndrias, preservando a sobrevivência das células (Kluck et al. 1997; Yang et al. 1997), enquanto os membros pró-apoptóticos desempenham um papel importante na iniciação de libertação do citocromo c.

2.2.3. Vias das Perforinas/Granzimas

Os linfócitos T citotóxicos (CTL) são capazes de matar as células alvo através da via extrínseca, predominantemente pela interação FasL/FasR (Brunner et al. 2003), embora também sejam capazes de exercer os seus efeitos citotóxicos através de uma via que envolve a secreção da molécula transmembranar formadora de poros perforina com uma subsequente libertação de grânulos citoplasmáticos através dos poros para dentro da célula-alvo (Trapani and Smyth 2002). As proteases de serina das granzimas (Gzm) são o componente mais importante dentro dos grânulos, e quando uma granzima é introduzida em células-alvo com a perforina, a morte celular é induzida (Shi et al. 1992; Nakajima et al. 1995)

A granzima B cliva proteínas nos resíduos de aspartato, como o ICAD (inibidor de DNase da caspase ativada), que leva à ativação da CAD e, portanto, ativa a pró-caspase 10 (Sakahira et al. 1998). Pode também utilizar a via mitocondrial para amplificar o sinal de morte, pois cliva e ativa o Bid, um membro pro-apoptótico da família Bcl-2, que sofre translocação para a mitocôndria e facilita a formação de um poro mitocondrial criado pela Bax ou Bak ou ambas, levando à libertação do citocromo c (Barry and Bleackley 2002; Russell and Ley 2002) e constituição do apoptossoma (Barry et al. 2000; Heibein et al. 2000; Alimonti et al. 2001). A granzima B pode ainda ativar diretamente a caspase 3.

Uma outra granzima capaz de levar à morte celular é a GzmC que, apesar de não ativar caspases, Bid ou ICAD, tem efeitos diretos nas mitocôndrias que levam ao aumento de volume e despolarização. Ela induz rapidamente a morte da célula-alvo, atacando alvos nucleares e mitocondriais, e as suas características de morte celular têm muitas das características da apoptose, embora a morte induzida seja distinta da induzida pela GzmB: 1) a condensação nuclear não está sempre associada a fragmentação nuclear; 2) os danos no DNA parecem ser de cadeia simples, e não oligonucleossomais; 3) não há evidência para a ativação da caspase 3 durante as fases iniciais de apoptose; 4) danifica diretamente mitocôndrias isoladas, através de despolarização e aumento de volume (Johnson et al. 2003).

2.2.4. Fase da execução

Ambas as vias extrínseca e intrínseca terminam no ponto da fase de execução, por ativação das caspases executoras. As caspases de execução ativam a endonuclease citoplasmática, que degrada o material nuclear, e as proteases, que degradam as proteínas nucleares e o citoesqueleto. As caspases 3, 6, e 7 funcionam como efetoras ou executoras, clivando diversos substratos que, numa fase final, causam as alterações morfológicas e bioquímicas observadas nas células apoptóticas (Slee et al. 2001). A caspase 3 é considerada a mais importante das caspases executoras, é ativada por qualquer uma das caspases iniciadoras

(caspase 8, 9 ou 10), e ativa especificamente a endonuclease CAD. Nas células em apoptose, a caspase 3 ativada cliva o ICAD para libertar a CAD (Sakahira et al. 1998), que degrada então o DNA cromossómico e provoca a condensação da cromatina. A caspase 3 estimula também a reorganização do citoesqueleto e a desintegração da célula em corpos apoptóticos. A via das perforina/granzimas pode também terminar nesta fase, quando uma granzima é introduzida nas células-alvo juntamente com uma perforina.

2.3. Regulação da Apoptose por Hormonas Sexuais

As mitocôndrias são responsáveis não só pela produção de ATP, mas também são uma fonte importante de ROS (espécies reativas de oxigénio) (Turrens 2003) e têm um papel-chave na apoptose (Szewczyk and Wojtczak 2002). Pouco se sabe acerca dos efeitos das hormonas sexuais na produção de ROS mitocondriais no cérebro, mas algumas evidências indicam que as mitocôndrias são um novo alvo dos esteroides (Nilsen and Brinton 2004; Duckles et al. 2006; Singh et al. 2006).

2.3.1. Estrogénios

A presença de recetores de estrogénios (ERs) nas mitocôndrias reforça a hipótese dos estrogénios terem efeitos diretos sobre a atividade mitocondrial (Borrás et al. 2003). O estrogénio pode suprimir a produção de ROS mitocondrial (Pedram et al. 2006; Razmara et al. 2007), através de uma ação antioxidante causada pela sua interação com ERs que pode conduzir à ativação de quinases e fatores nucleares (Vina et al. 2006). O estrogénio pode também diminuir a produção de H_2O_2 mitocondrial (Stirone et al. 2005) e aumentar a expressão de várias proteínas da cadeia transportadora de eletrões, incluindo o citocromo c e subunidades do complexo IV.

O estradiol regula o equilíbrio entre a sobrevivência celular, a proliferação e a apoptose. Ele inibe a apoptose induzida por Bcl-2 e Bcl-xL (Gompel et al. 2000) e, além do ER regular os genes alvo de estrogénio, também ativa a via de Fas ou, alternativamente, regula negativamente os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, conduzindo à apoptose (Jordan 2008). O papel dos estrogénios na apoptose passa por: inibição da libertação do citocromo c, inibição da ativação da caspase 3, inativação de Bad, e regulação negativa da inibição da p53 (Morkuniene et al. 2006; Liu et al. 2011).

2.3.2. Androgénios

Os recetores de androgénios (ARs) foram também detetados nas mitocôndrias das células (Solakidi et al. 2005). Os seus efeitos anti-apoptóticos passam por: fosforilação de Bad, regulação negativa de Bax, inibição da libertação do citocromo c, fosforilação de Bcl-2, ativação da via de morte celular mitocondrial, e fragmentação do DNA (Erkkilä et al. 1997; Jia et al. 2009; Pronsato et al. 2010). Por outro lado, os seus efeitos apoptóticos são: expressão da proteína de clivagem caspase 8, diminuição da Bcl-2, expressão da caspase 3, e a clivagem através da via Fas/FasL (Jin et al. 2006; Winiarska et al. 2006).

3. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (AD) é uma doença neurodegenerativa progressiva cuja incidência aumenta drasticamente com o envelhecimento, atingindo 5% das pessoas com mais de 65 anos de idade e pelo menos 35% das pessoas com mais de 85 anos (Serot et al. 2003). Caracteriza-se clinicamente pela perda progressiva da memória e deterioração da função cognitiva. Patologicamente, a AD é caracterizada pela coexistência de dois tipos de lesões: placas amiloides, que consistem principalmente em depósitos extracelulares de fibras peptídicas β -amiloides, e degeneração neurofibrilar intracelular que consiste em filamentos retorcidos da proteína *tau* hiperfosforilada (Duyckaerts et al. 2009).

Várias mutações da proteína precursora amiloide (APP) e das presenilinas 1 e 2, através da modificação do catabolismo da APP, são responsáveis por formas hereditárias de AD, apresentando hiperprodução de β -amiloide (a-beta) (Davies 2006). O a-beta deposita-se sob a forma de oligómeros, fibrilas e grandes agregados que conduzem às placas senis, bem como depósitos vasculares no cérebro e nos vasos sanguíneos das meninges, levando à deterioração da função cerebral (Dickson 2004). No entanto, os depósitos amiloides não se devem a uma produção excessiva de a-beta, mas sim a uma diminuição de cerca de 30% na sua remoção (Mawuenyega et al. 2010). Além de se acumular no parênquima e vasos sanguíneos, o a-beta também se acumula no epitélio do plexo coroide, que desempenha um papel crítico de suporte da função neuronal através da remoção do a-beta (Carro et al. 2002; Zlokovic 2004). A solubilidade, transporte e limpeza do a-beta são mediadas por algumas proteínas do CSF, tais como apolipoproteínas e pela TTR. No caso da TTR, esta forma complexos com o a-beta, prevenindo a formação de fibrilas amiloides (Mazur-Kolecka et al. 1995; Costa et al. 2008).

Além do a-beta, há outras moléculas envolvidas na doença de Alzheimer. A proteína *tau* hiperfosforilada é o principal componente dos emaranhados neurofibrilares, cujo número e distribuição estão correlacionados com o grau de demência da doença (Yuan and Yankner

2000). As presenilinas 1 e 2 mutadas são a maior causa de Alzheimer familiar de início precoce e aumentam a produção do β -amiloide, que tem elevada propensão para formar fibrilas amiloides. Estas mutações aumentam a vulnerabilidade neuronal à apoptose (Levy-Lahad et al. 1995; Sherrington et al. 1995; Price et al. 1998). Finalmente, a herança da alipoproteína E (ApoE) é o fator de risco genético mais comum para a doença de Alzheimer após os 60 anos, pois promove a polimerização do β -amiloide nas fibras que formam as placas (Yankner 1996).

3.1. *Clearance* do β -Amiloide

Os monómeros AB40 e AB42 são catabolitos fisiológicos não neurotóxicos de um precursor membranar da APP encontrados no plasma, CSF e fluido intersticial. A única grande diferença entre os dois é que o AB42 oligomeriza mais rapidamente que o AB40 (Ono et al. 2005; Finder and Glockshuber 2007). O AB42 pode ser eliminado de diversas formas: (1) é reabsorvido nos capilares por transportadores (Deane et al. 2009); (2) é localmente degradado por várias enzimas; (3) é drenado para o CSF, onde forma complexos com apolipoproteínas ou com a TTR, que se ligam a um transportador coroide e são enviados para o sangue (Alvira-Botero and Carro 2010). Esta última via parece ser secundária e elimina 10-15% do a-beta (Tanzi et al. 2004). Além disso, os péptidos amiloides solúveis e fibrilares podem ser também resgatados pela endocitose microglial e astrocítica (Chung et al. 1999; Nielsen et al. 2010), no cérebro ou através de células endoteliais, incluindo a barreira hematoencefálica (Bell et al. 2008). O a-beta extracelular pode ser também degradado através de proteases secretadas pela microglia e pelos astrócitos (Qiu et al. 1998; Nielsen et al. 2010).

3.2. Doença de Alzheimer e Hormonas Sexuais

O declínio nos níveis de hormonas esteroides associado ao envelhecimento é frequentemente relacionado com o aparecimento e progressão da doença de Alzheimer (Lim et al. 2003; Baum 2005), e um dos mecanismos pelos quais isso acontece envolve a regulação dos níveis do péptido a-beta.

3.2.1. Estrogénios

A deficiência hormonal ovárica após a menopausa é um fator de risco significativo para o desenvolvimento da doença de Alzheimer em mulheres (Paganini-Hill and Henderson 1994; Tang et al. 1996) que tem sido atribuída, principalmente, à depleção dos níveis de estrogénios. Os estrogénios podem impedir a patogénese da AD a vários níveis: 1) protegendo contra a morte celular induzida pelo α -beta, reduzindo a produção e melhorando a *clearance* do péptido amiloide (Chen et al. 2006); 2) agindo como regulador endógeno de fatores relacionados com a apoptose, pois aumenta a expressão de Bcl-xL e diminui a proteólise mediada por caspases e morte celular induzida por α -beta (Pike 2001); 3) influenciando a função cerebral, pois atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, onde podem interagir tanto com os recetores estrogénicos nucleares como com os recetores membranares (Kawata 1995); 4) promovendo o crescimento de neurites e suprimento vascular para o cérebro (Belfort et al. 1995), de forma a aumentar a regeneração e reparação neuronais; 5) promovendo a quebra da proteína precursora amiloide a fragmentos menos suscetíveis de acumular o péptido β -amiloide (Henderson 1997); 6) enfraquecendo os efeitos neurotóxicos do β -amiloide, devido às propriedades antioxidantes (Mukai et al. 1990; Niki and Nakano 1990; Mooradian 1993); 7) aumentando o catabolismo e reduz os níveis plasmáticos da ApoE (Applebaum-Bowden et al. 1989; Kushwaha et al. 1991); e 8) através de efeitos protetores na função e/ou estabilidade mitocondriais (Simpkins and Dykens 2008).

3.2.2. Progesterona

A progesterona, por ser reguladora do estrogénio, pode antagonizar a sua ação, proporcionando uma proteção significativa contra a toxicidade do α -beta e regulando o transporte axonal, fatores que podem desempenhar um papel significativo na doença de Alzheimer (Stokin et al. 2005). No entanto, enquanto a progesterona contínua inibe, em grande parte, a proteção a partir dos estrogénios na AD, a progesterona cíclica parece aumentar significativamente a proteção estrogénica contra a acumulação de α -beta, fosforilação da proteína *tau*, e défice de memória (Pike et al. 2009).

3.2.3. Androgénios

Como consequência normal do envelhecimento, os níveis de androgénios sofrem uma depleção funcional, o que provoca dificuldades de funcionamento e aumento da vulnerabilidade a doenças em tecidos que lhes respondem (Morley 2001), pois as suas ações não só influenciam o desenvolvimento do SNC, como também contribuem para manter a sua

função apropriada na idade adulta. A depleção de androgénios em homens aumenta o risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade, incluindo a doença de Alzheimer (Rosario and Pike 2008). O declínio nos níveis de testosterona começa a partir dos 30 anos de idade e continua a diminuir a uma taxa de 0.2-1% por ano (GRAY et al. 1991; Feldman et al. 2002; Muller et al. 2003). O cérebro é um tecido altamente responsivo a androgénios onde estes induzem várias ações benéficas, e o evento-chave na iniciação e condução da patogénese da AD pode ser a acumulação da proteína β -amiloide (Hardy and Selkoe 2002), pois os androgénios agem como reguladores negativos endógenos da deposição do a-beta. Por conseguinte, a depleção de testosterona relacionada com a idade diminui a probabilidade da capacidade de regulação de a-beta pelo cérebro, resultando num aumento da deposição de a-beta e desenvolvimento da AD. A relação entre a testosterona e a AD também pode ser influenciada pela presença de, pelo menos, um alelo $\epsilon 4$ da ApoE, um fator de risco genético para AD (Strittmatter and Roses 1995), pois os homens portadores desse alelo apresentam níveis mais baixos de testosterona (Hogervorst et al. 2002).

3.3. Doença de Alzheimer e Apoptose

A morte celular na doença de Alzheimer pode ser devida a mecanismos apoptóticos. O mecanismo de neurotoxicidade do a-beta ainda não se encontra totalmente definido, mas sabe-se que ele pode induzir o *stress* oxidativo e aumentar a concentração de Ca^{2+} intracelular (Mattson et al. 1993; Behl et al. 1994) (Figura 4). Além disso, o β -amiloide pode induzir a apoptose (Loo et al. 1993) através da interação com os recetores neuronais. A oncoproteína Bcl-2 tem um efeito protetor contra a morte celular por apoptose e necrose, e enquanto a Bcl-xS promove a apoptose, a Bcl-xL tem um efeito inibidor de apoptose semelhante ao da Bcl-2 (Barinaga 1994; Benito et al. 1995; Benito et al. 1996; Minn et al. 1996). Outro membro da família é a proteína Bax, a qual se acredita promover a apoptose. Alguns estudos referem que células epiteliais de plexo coroide tratadas com a-beta têm um aumento de expressão das caspases 3 e 9, sugerindo o possível papel do a-beta na ativação da apoptose (Vargas et al. 2010).

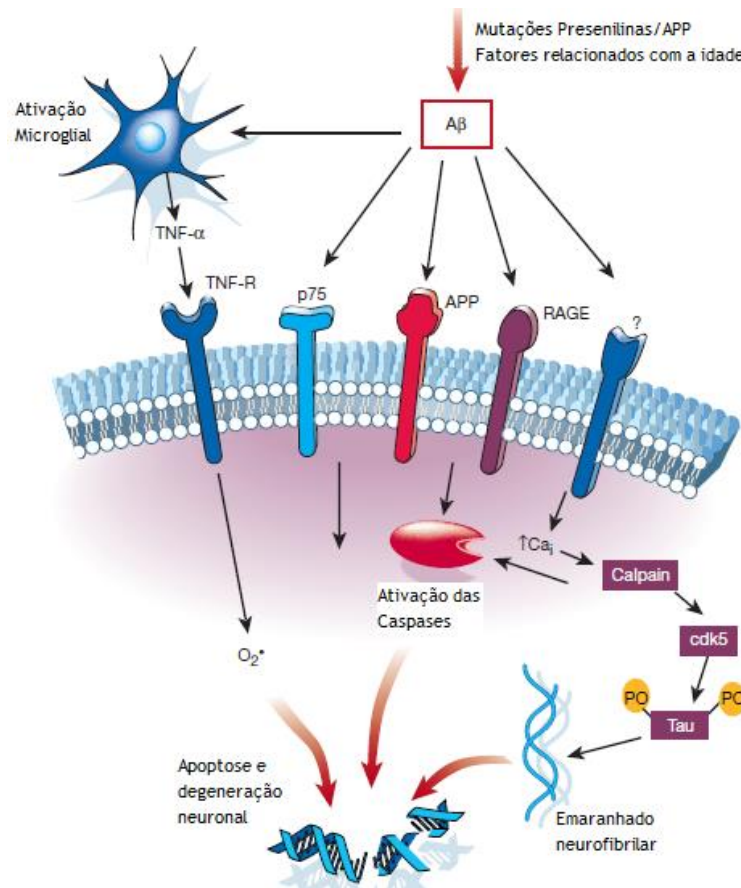


Figura 4 - Vias Celulares da Neurotoxicidade da Proteína β -amiloide na Doença de Alzheimer. O β -amiloide formado por via de mutações na APP/presenilinas ou por fatores relacionados com a idade interage com vários receptores na superfície celular e com a microglia, desencadeando cascatas de transdução de sinal que resultam na ativação de caspases, geração de radicais livres e influxo de Ca^{2+} . O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} (Ca_i) pode ativar as caspases e a proteína quinase *tau*, que pode resultar em emaranhados neurofibrilares. Finalmente, é ativada a apoptose e degeneração neuronal. Adaptada de (Yuan and Yankner 2000).

4. Objetivo

Um estudo de *microarrays* previamente realizado mostrou que alguns genes da via apoptótica são diferencialmente regulados pelo *background* hormonal em plexo coroide de rato, sugerindo que as hormonas sexuais podem ter um papel importante na regulação da apoptose. Assim, o objetivo desta dissertação é confirmar a regulação da via apoptótica em plexo coroide de rato pelas hormonas sexuais e avaliar o efeito desta regulação hormonal na proteção das células do plexo coroide contra a apoptose induzida pelo α -beta na doença de Alzheimer.

II. **Material e Métodos**

1. Linhas Celulares de Plexo Coroide de Rato: Z310 e RCP

A linha celular Z310 foi obtida a partir de culturas primárias de epitélio de CP de rato imortalizadas por transfeção estável de um plasmídeo portador do vírus SV40 T large, preservando o fenótipo e as funções das células primárias que lhes deram origem. Assim, as células Z310 apresentam a mesma morfologia poligonal das células epiteliais de plexo coroide, formando monocamadas confluentes como as culturas celulares primárias (Figura 5). Além disso, as células Z310 possuem a capacidade de formar *tight junctions* entre células adjacentes, constituindo uma base estrutural para as barreiras cerebrais, produzem TTR, um marcador para o epitélio coroide, expressam transportadores de metais e substâncias químicas orgânicas como aniões, nucleósidos, hormonas e péptidos de elevado peso molecular, e podem ter uma função secretora e/ou de absorção devido à presença de microvilosidades na sua superfície.

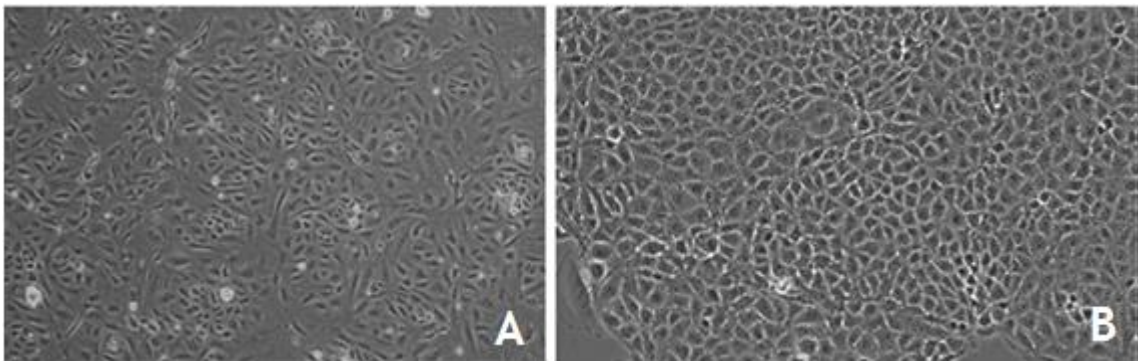


Figura 5 - Morfologia das Células Epiteliais Coroides em Cultura. (A) Cultura primária de CPECs (10x); (B) Cultura de células epiteliais Z310 imortalizadas (20x). Adaptado de (Monnot and Zheng 2013).

A linha celular RCP (*Rat Choroid Plexus*) foi obtida a partir de culturas primárias de células de plexo coroide de ratos Wistar adultos, dissecadas do 4^o ventrículo do cérebro, imortalizadas por transfeção com o adenovírus *TSori minus*. Das células imortalizadas da cultura primária foram selecionados os clones libertadores de iões de cálcio em resposta a estímulos de vasopressina, angiotensina, braquidina, serotonina ou endotelina, e aquele que exibiu melhor resposta às cinco hormonas foi selecionado e expandido em cultura, de forma a originar a linha celular.

As linhas celulares de plexo coroide Z310 e RCP possuem as mesmas condições de cultura, passagem e congelamento/descongelamento.

1.1. Cultura de Células

As linhas celulares foram suplementadas com *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich, EUA), 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina-estreptomicina num frasco de cultura e armazenadas numa estufa AutoFlow DHD CO₂ Air-Jacketed Incubator (NuAire, EUA) a 37° C com uma atmosfera de 5% CO₂ e 95% Ar.

1.2. Passagem de Células

O processo de passagem celular efetuou-se sempre que a confluência atingiu cerca de 90-100% e, desta forma, permitiu diminuir a densidade celular para assegurar a expansão contínua da linha celular. Visto que as células Z310 e RCP são aderentes, há necessidade de as tripsinizar. Aspirou-se o meio de cultura e lavaram-se as células com PBS 1X (tampão fosfato salino de pH 7.4), realizando movimentos circulares com o frasco de cultura. Aspirou-se o PBS 1X e adicionou-se tripsina-EDTA 0.25% num volume suficiente para cobrir as células, deixando-a atuar entre 3 a 5 minutos dentro da estufa. Quando as células se encontravam em solução e com um aspeto esbranquiçado a soltar do frasco de cultura, adicionou-se meio de cultura num volume igual ao da tripsina, de forma a parar a ação da enzima, e ressuspenderam-se as células. Recolheu-se a suspensão para um tubo *falcon* e centrifugou-se durante 5 minutos a 1300 rpm. De seguida, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular em PBS 1X. Centrifugou-se novamente durante 5 minutos a 1300 rpm e removeu-se o sobrenadante. As células foram então ressuspendidas em um mL de meio de cultura e colocadas na incubadora.

1.3. Contagem de Células

A contagem celular foi efetuada quando a confluência atingiu cerca de 90-100%, podendo realizar-se sempre que as células se encontrem em suspensão. Assim, retiraram-se 20 µL da ressuspensão celular, adicionou-se igual volume de Azul de Tripano e homogeneizou-se. Da mistura retiraram-se 20 µL para uma câmara de *Neubauer* de forma a contar as células viáveis. Após contagem das células nos diferentes quadrantes, estimou-se o número de células por mL e o número total de células no frasco de cultura, através das seguintes fórmulas:

$$\text{N}^\circ \text{ Células/mL} = \text{Média de células}_{\text{quadrantes}} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{N}^\circ \text{ Total Células} = \text{N}^\circ \text{ Células/mL} \times V_{\text{ressuspensão celular}}$$

1.4. Congelamento e Descongelamento de Células

O processo de congelamento de células foi efetuado de modo a assegurar a eternização da linha celular. Para tal, foi necessário proceder à tripsinização, como descrito anteriormente. As células foram diluídas em meio de cultura e adicionou-se 10% de DMSO (dimetilsulfóxido), que previne a formação de cristais de água capazes de lisar as células. Numa primeira fase, as alíquotas de células foram mantidas a -20°C passando depois a -80°C , podendo ainda armazenar-se em azoto líquido. O processo de descongelamento envolveu a ressuspensão das células criopreservadas em DMEM com 10% FBS e 1% de penicilina-estreptomicina, após descongelamento num banho a 37°C com agitação constante e moderada. De seguida, a ressuspensão foi centrifugada durante 5 minutos a 1300 rpm, aspirou-se o sobrenadante e lavaram-se novamente as células em meio de cultura. Após uma centrifugação durante 5 minutos a 1300 rpm, procedeu-se à cultura celular, como descrito anteriormente.

2. RNA Total

Realizou-se extração de RNAt (RNA total) a partir de CPs de ratos Wistar Han, congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C após a amostragem, e linha celular Z310. Todo o procedimento foi realizado em gelo, devido à sensibilidade térmica do RNA. Além disso, obter sequências de RNA íntegras torna-se difícil, principalmente devido à sua degradação enzimática por ribonucleases (RNases), pelo que é necessário utilizar fortes agentes desnaturantes, que efetuam lise celular e inativam as RNases, e água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC).

2.1. Extração de RNA total

A extração de RNAt foi efetuada utilizando TRIzol® Reagent, uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, de acordo com as recomendações do fabricante (1mL TRIzol/100 mg de tecido). Assim, adicionou-se TRIzol a cada microtubo com o tecido/células em causa e homogeneizou-se manualmente com um pilão de forma a permitir o rompimento celular e a dissolução de vários componentes celulares. No caso das células Z310 adicionaram-se 2.5 mL de TRIzol, enquanto para os CPs adicionaram-se 300 μL /microtubo. Após uma incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente, que permitiu a completa dissociação de complexos de nucleoproteínas, adicionou-se o clorofórmio (200 μL de clorofórmio/1 mL de TRIzol) e homogeneizou-se a amostra por inversão. As amostras foram então incubadas

durante 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas posteriormente a 4°C durante 15 minutos a 12000 g. Após centrifugação, a solução separou-se em três fases: no fundo do tubo obteve-se a fase orgânica (cor rosada) contendo as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio; a interfase contendo o DNA; e a fase aquosa (transparente), contendo o RNA. Deste modo, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo ao qual se adicionou o isopropanol (500 μ L de isopropanol/1mL de TRIzol) e misturou-se por inversão, de forma a permitir a recuperação do RNA por precipitação. Após incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 4°C durante 10 minutos a 12000 g, rejeitou-se o sobrenadante. O RNA, sob forma de um precipitado branco (*pellet*), foi lavado duas vezes com 500 μ L de etanol 75% em água DEPC (-20°C), centrifugou-se a 4°C durante 5 minutos a 7500 g, tendo-se rejeitado o sobrenadante. Por fim, retirou-se o etanol excedente e o precipitado de RNAt foi re-hidratado em água DEPC e armazenado a -80°C para uso posterior. No caso das células Z310 ressuspendeu-se em 50 μ L de água DEPC, e 10 μ L para os CPs.

2.2. Determinação da Integridade do RNA total

A integridade do RNAt foi analisada por uma eletroforese do RNA total em gel de agarose a 1.5% corado com *GreenSafe* (NZYTech, Portugal). A qualidade do RNA foi confirmada pela presença de 2 bandas de rRNA - 18S e 28S - em que a banda 28S apresenta o dobro da intensidade da 18S. Caso o RNA estivesse degradado, esta proporção estaria alterada, podendo mesmo observar-se arrastamento. Para efetuar este procedimento preparou-se um gel de agarose a 1.5% em Tampão TAE 1x diluído em água DEPC ao qual se adicionaram 40 μ L de *GreenSafe*, agente intercalante dos ácidos nucleicos. As amostras foram preparadas com 2 μ L de amostra, 8 μ L de H₂O estéril e 2 μ L de *loading buffer* 10x, e depositadas no gel. Após a corrida da eletroforese a 100 V durante 30 minutos, visualizou-se o gel no transiluminador UVITEC (UVitec Cambridge, Reino Unido).

2.3. Quantificação do RNA total

A quantificação do RNAt foi realizada utilizando o nanoespectrofotómetro Nanophotometer™ (Implen, Alemanha), que fornece diretamente a concentração de RNAt (μ g/ μ L) e a razão A_{260}/A_{280} , que indica o grau de pureza do RNAt com base na leitura de absorvência a 260 e 280 nm, comprimentos de onda aos quais os ácidos nucleicos e as proteínas absorvem. Considera-se que o RNAt está puro quando a razão entre as absorvências se encontrar no intervalo entre 1,8 e 2,1.

3. Transcrição Reversa e PCR

A síntese de DNA complementar (cDNA) é feita com uma transcriptase reversa que atua no RNA, sendo necessária a presença de iniciadores de síntese (*primers*). O cDNA é sintetizado a partir da transcrição reversa do mRNA, obtendo-se uma cópia exata dos genes expressos, sem intrões. A transcrição reversa do mRNA deste trabalho foi realizada usando o kit SMART™ MMLV Reverse Transcriptase (Clontech, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Primeiro, preparou-se uma MIX1 (para n+1 reações) num microtubo, com 2 μ L de *Random Primers* e 2 μ L de DNTPs, por cada amostra. De seguida, adicionaram-se 4 μ L da MIX1 a cada tubo PCR e cerca de 300 ng de RNAt extraído de cada amostra (ou seja, 1.5 μ L de RNAt, pois [RNAt] = 200 ng/ μ L), perfazendo um volume total de 9 μ L com água estéril. Os tubos foram então colocados no termociclador a 65°C durante 5 minutos e imediatamente arrefecida em gelo. De seguida preparou-se uma MIX2 num microtubo com 4 μ L de tampão RT (5x *Buffer*), 2 μ L de DTT (100 mM) e 1 μ L de MMLV RT por cada amostra. Adicionaram-se 7 μ L da MIX2 a cada tubo PCR e seguiram-se uma série de incubações: a 37°C durante 2 minutos, a 25°C durante 10 minutos e a 37°C durante 50 minutos. Finalmente, a reação foi parada com uma incubação a 70°C durante 15 minutos e o cDNA foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

A técnica de amplificação enzimática de DNA, PCR convencional, permitiu confirmar a expressão dos genes da apoptose Caspase 2 (Casp2), Caspase 3 (Casp3), Caspase 8 and FADD-like apoptosis regulator (Cflar ou Casp8), Caspase 9 (Casp9), Bcl2-like 1 (Bcl2l1), Mdm4 p53 binding protein homolog (Mdm4p53), Granzyme C (GzmC) e Cytochrome c oxidase IV isoform 1 (Cox4i1) em CP de rato e, posteriormente, na linha celular Z310. A escolha dos *primers* para cada gene foi realizada através do programa Primer-Blast (Tabela 1). De forma a amplificar enzimaticamente as sequências correspondentes aos mRNAs dos genes em estudo, realizou-se PCR utilizando Taq DNA Polimerase (NZYtech, Portugal), segundo as instruções do fabricante. Por cada reação adicionaram-se 2.5 μ L de 10x *Buffer*, 1.5 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 1 μ L de dNTPs (10 mM), 0.2 μ L de Taq DNA Polimerase, 0.3 μ L de *primer Forward* (25 μ mol) e 0.3 μ L de *primer Reverse* (25 μ mol) respetivos a cada gene em estudo. Por fim, perfez-se com água estéril para um volume total de 24 μ L. A cada reação foi adicionado 1 μ L de cDNA (de CP ou Z310), à exceção do negativo ao qual foi adicionado 1 μ L de água estéril. A amplificação dos genes apoptóticos foi efetuada num termociclador TProfessional Basic (Biometra, Alemanha), no qual as amostras foram colocadas a 95°C durante 5 minutos. Seguiram-se 40 ciclos nos quais foram expostas a 95°C durante 30 segundos de forma a desnaturar o DNA, seguidas da temperatura ótima de emparelhamento de cada *primer* durante 45 segundos de forma a ocorrer a ligação do *primer* ao DNA, 72°C durante 30 segundos para que ocorresse a amplificação, e finalmente foram expostas a 72°C durante 5 minutos. Os produtos amplificados foram depois visualizados por eletroforese em gel de agarose 1.5% na presença de *GreenSafe*, como descrito anteriormente. Retiraram-se 8 μ L de cada produto PCR, aos quais se adicionaram 2 μ L de *loading buffer* 10x e depositaram-se no gel. No primeiro poço

foram depositados 5 μ L de marcador de peso molecular HipperLadder II (Bioline, Reino Unido). Após visualização no transiluminador, os produtos PCR devidamente amplificados foram enviados para sequenciação à empresa StabVida (Portugal), e as sequências correspondentes aos genes em estudo foram confirmadas através do programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), por comparação com as sequências da base de dados de *Rattus norvegicus*.

Tabela 1 - Sequências dos *Primers* dos genes da apoptose utilizados neste estudo.

Gene	ID	Tamanho do Fragmento (bp)	Temperatura (°C)	Primer Forward	Primer Reverse
Casp2	NM_022522.2	175	58	TGTGACATGCACGTGGCCGA	GCAGGTGGCATCACGTGGGT
Casp3	NM_012922.2	116	58	ACGAACGGACCTGTGGACCTG	AGCTCTGTACCTCGGCAGGC
Cflar	NM_057138.2	174	58	AGGCCGAGGCAAGGTAGCCA	GCTTCTGGCTGGACTGCGTG
Casp9	NM_031632.1	140	58	GGCTCAGCACACGCATTGGC	GCGGTGCGCCATCTCCATCA
Bcl2l1	NM_001033670	160	58	TTCGGCACGAGCAGTCAGCC	ACCAGCTCCCGTTGCTCTGA
Mdm4p53	NM_001012026	190	58	CACGGTGCAACAGAGTGCTCC	ACCAAGGCAGGCCAGCAACA
Gzmc	NM_134332.1	173	58	TGGCAAACGCCACTCCCCAC	TCCCCAGCCAGCCATGTAGCA
Cox4i1	NM_017202	135	58	AATGTTGGCTACCAGGGCAC	GGGTAGTCACGCCGATCAAC

4. PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real permitiu quantificar a expressão relativa dos genes apoptóticos, nomeadamente Bcl2l1, Mdm4p53, Casp2, Cflar e Casp9. Na experiência foram analisados 4 grupos com 6 ratos Wistar Han - fêmeas controlo (Sham), fêmeas OVX (ovariectomizadas), machos controlo e machos OOX (ooforectomizados). As condições foram otimizadas tendo-se testado a eficiência das reações para cada um dos genes com 4 diluições de cDNA - 1:2, 1:3 (*stock*), 1:4 e 1:8 - de forma a otimizar o procedimento, e as experiências foram efetuadas em duplicado. A emissão de fluorescência do SYBR®Green I foi determinada após cada ciclo, e a quantidade relativa de cada mRNA foi quantificada usando o *software* do iCycler. A amplificação dos transcritos específicos foi confirmada pelos perfis da curva de *melting* gerados no final de cada ensaio. As curvas de *melting* resultantes do real-time PCR permitiram avaliar a formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto amplificado. O gene da Ciclofilina A foi utilizado como controlo endógeno para normalizar os níveis de

expressão dos genes da apoptose. Por cada análise adicionaram-se 10 μ L de SYBR®Green I dye (kit iQ™ SYBR®Green Supermix, Bio-Rad, EUA), 0.8 μ L de *primer Fw* e 0.8 μ L de *primer Rv* diluídos 1:20, 1 μ L cDNA nas diluições mencionadas anteriormente, e perpez-se com água estéril (Fermentas, Lituânia) para um volume de 19 μ L. As condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos, num termociclador iQ™5 (Bio-Rad, EUA). Os dados foram tratados através do método de Pfaffl (Pfaffl 2001), no qual a expressão relativa dos genes em estudo foi calculada com base na razão entre a eficiência de amplificação e o desvio do ponto de cruzamento das amostras em análise (animais OOX ou OVX) e das amostras controlo, e expressa em relação ao gene de referência Ciclofilina A. No final, os dados foram tratados estatisticamente através do *t*-test e One-Way ANOVA, com resultado estatístico significativo quando $p < 0.05$.

5. Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica permite avaliar a expressão de proteínas em cortes histológicos, bem como a sua localização celular, e baseia-se no uso de anticorpos específicos para a proteína em estudo. Assim, utilizaram-se ratos adultos Wistar Han, machos e fêmeas, aos quais foram retirados os CPs e fixados em paraformaldeído (PFA) 4% para posterior processamento histológico. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em xilol, 2 vezes 10 minutos à temperatura ambiente, de forma a ocorrer a desparafinação. De seguida, foram re-hidratadas em etanol absoluto 2 vezes, etanol 95% e etanol 80% durante 10 minutos em cada uma das concentrações, e finalmente lavadas 2 vezes em água corrente durante cerca de 5 minutos. Para ocorrer recuperação antigénica, os cortes foram colocados num banho de citrato de sódio 10 mM (pH=6) durante 10 minutos a 85/90°C, tendo sido posteriormente arrefecidos retirando água quente do banho e colocando água fria, de forma a evitar o choque térmico aquando a lavagem em água corrente durante 10 minutos. Cada seção de tecido foi então incubada com peróxido de oxigénio (H₂O₂) 3% durante 10 minutos à temperatura ambiente, para inibir as peroxidases endógenas e evitando falsos positivos. Após a incubação, os cortes foram lavados 2 vezes em PBS-T 0.1% durante 5 minutos com agitação suave e foram incubados com solução de bloqueio BSA 1% PBS durante 1 hora à temperatura ambiente de forma a bloquear reações inespecíficas. De seguida, efetuaram-se 2 lavagens em PBS-T 0.1% (PBS-Tween 0.1%) durante 2 minutos com agitação suave e os cortes foram isolados uns dos outros com uma caneta, de forma a evitar a mistura de diferentes anticorpos. As seções de CP foram incubadas *overnight* a 4°C em câmara húmida com o respetivo anticorpo primário - Caspase-3 p17 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) diluído 1:250 em BSA 1% PBS, e Cox4 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) diluído 1:50 em BSA 1% PBS. Ao

controlo negativo omitiu-se o anticorpo, tendo sido incubado apenas com tampão de diluição. Após incubação, as lâminas foram lavadas 2 vezes em PBS-T 0.1% durante 5 minutos com agitação suave, e incubadas em câmara húmida durante 1 hora com o anticorpo secundário biotilado anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:20 em BSA 1% PBS. Posteriormente lavaram-se os cortes 3 vezes com PBS-T 0.1% durante 3 minutos com agitação suave, e incubaram-se com o complexo extravidina-peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluída 1:20 em BSA 1% PBS durante 30 minutos, que se liga fortemente à biotina do anticorpo secundário. Após 3 lavagens com PBS-T 0.1% durante 5 minutos com agitação suave, as lâminas foram incubadas com a solução de diaminobenzidina (DAB 50X Dako REAL, Dako, Dinamarca) até verificar uma coloração acastanhada, pois o DAB interage com a peroxidase associada à extravidina. A reação foi então interrompida, colocando as lâminas em água corrente durante alguns minutos, e foram depois mergulhadas 4 vezes em hematoxilina durante 10 segundos para marcação dos núcleos celulares. A reação foi novamente interrompida com lavagem em água corrente e os cortes foram desidratados em sucessivas duplas passagens de 10 segundos em etanol 95%, etanol 100% e xilol. Depois de retirado o excesso de xilol e de secarem na *hotte*, as lâminas foram montadas com Entellan (meio de montagem), observadas e fotografadas ao microscópio.

6. Whole-Mount (IHC de Fluorescência)

A técnica de imunohistoquímica por fluorescência em “whole-mount” permite determinar a localização e distribuição celulares de determinada proteína num tecido inteiro, pela utilização de anticorpos específicos. O método utilizado baseia-se na utilização de um anticorpo primário específico para a proteína em estudo e de um anticorpo secundário ligado a uma molécula fluorescente, ocorrendo emissão de fluorescência quando há interação entre os anticorpos. Foram utilizados ratos Wistar Han com alguns dias de vida, aos quais foram retirados os CPs e colocados em placas de 24 poços com PFA 4% durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os CPs foram incubados com uma solução de sacarose 30% até depositarem no fundo, e incubados *overnight* a 4°C com a solução de bloqueio 2.5% BSA 0.2% Triton. Os CPs foram lavados em PBS-T 0.1% e incubados *overnight* a 4°C com o anticorpo primário - Caspase-3 p17 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) ou Cox4 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) - diluídos 1:100 em BSA 2.5% 0.2% Triton. Os tecidos foram lavados 2 vezes em PBS-T 0.1% e incubados 3 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Molecular Probes, EUA) diluído 1:1000 em BSA 2.5% 0.2% Triton. Realizaram-se novas lavagens com PBS-T 0.1% e incubou-se com Hoescht 33342 dye do kit Image-iT™ Plasma Membrane and Nuclear Labeling kit (Molecular Probes, EUA) numa diluição de 1:1000 durante cerca de 20 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, as

lâminas foram montadas com Entellan (meio de montagem), observadas e fotografadas num microscópio confocal LSM 710 (Zeiss, Alemanha).

7. Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo, além de funções bem conhecidas na área da Imunologia, permite quantificar a apoptose em amostras de células, utilizando dois reagentes que permitem avaliar esse efeito: a anexina V e o iodeto de propídio. A anexina V é uma proteína que possui alta afinidade para a fosfatidilserina que, em células viáveis se encontra na superfície interna da bicamada lipídica. Quando as células se encontram na fase inicial de apoptose, a fosfatidilserina sofre translocação para o exterior da bicamada, mesmo com a membrana celular ainda intacta, e é reconhecida por fagócitos que captam o sinal e removem a célula danificada. A conjugação da anexina V ao Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) permite identificar e quantificar as células apoptóticas através de citometria de fluxo. O iodeto de propídio (PI) é um marcador nuclear fluorescente de elevado peso molecular que se intercala no DNA quando a membrana celular se encontra permeável, pois devido ao seu elevado peso molecular apenas penetra na célula se esta não se encontrar viável, tal como ocorre na fase final da apoptose e na necrose. Assim, corar amostras celulares simultaneamente com anexina V-FITC e PI permite identificar células viáveis (negativas para FITC e PI), células apoptóticas (positivas para FITC e negativas para PI), e células em apoptose tardia ou necrose (positivas para FITC e PI). Neste trabalho foi utilizada a linha celular de CP RCP, incubada com diferentes concentrações de β -Amyloid Peptide (1-42) Human (Calbiochem, Reino Unido). Após 2 horas sem FBS, adicionou-se o a-beta às células, incubado 24 horas a 37°C numa atmosfera 5% CO₂. As células foram então tripsinizadas e lavadas em PBS 1x e em annexin V binding buffer 1x preparado de fresco (Annexin V Binding Buffer 10x: 10 mM HEPES/NaHO, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). Depois colocaram-se 100 μ L da suspensão celular em cada tubo FACS 5 mL e adicionaram-se 400 μ L do tampão da anexina. Finalmente, adicionaram-se 5 μ L de Annexin V-FITC (BD Pharmigen, EUA) a cada amostra celular durante 15 minutos ao escuro, e analisou-se num citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). Após a análise, adicionaram-se 10 μ L de PI (Sigma-Aldrich, EUA) a cada amostra que se voltou a analisar no citómetro. Além das amostras incubadas com o a-beta, fizeram-se também os controlos negativo (células sem tratamento com o a-beta) e positivo (células mortas com lixívia). As análises foram realizadas utilizando o *software* CellQuest Pro (BD Biosciences, EUA).

III. Resultados

1. Expressão da Via Apoptótica na Linha Celular Z310 de Plexo Coroide de Rato: Efeito das Hormonas

1.1. PCR Convencional

A técnica de RT-PCR permitiu confirmar a expressão de mRNA dos genes apoptóticos na linha celular Z310 do CP de rato, devido à amplificação específica das sequências de nucleótidos dos genes Casp2, Casp3, Cflar, Casp9, Bcl2l1, Mdm4p53, GzmC e Cox4i1 das vias apoptóticas. Os produtos amplificados com os *primers* específicos (Tabela 1) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1.5% corado com *GreenSafe*, confirmando-se que cada um dos fragmentos obtidos tinha o tamanho esperado pela comparação das bandas obtidas com o marcador de peso molecular HiperLadder II. O fragmento da figura 6A diz respeito ao gene Casp2, com um tamanho de 175 bp; o fragmento da figura 6B corresponde ao gene Casp3, com um peso molecular de 116 bp; o fragmento da figura 6C diz respeito ao gene Cflar, com um tamanho de 174 bp; o fragmento da figura 6D corresponde ao gene Casp9, com um peso molecular de 140 bp; o fragmento da figura 6E diz respeito ao gene Bcl2l1, com um tamanho de 160 bp; o fragmento da figura 6F corresponde ao gene Mdm4p53, com um peso molecular de 190 bp; o fragmento da figura 6G diz respeito ao gene Gzmc, com um tamanho de 173 bp; e o fragmento da figura 6H corresponde ao gene Cox4i1, com um peso molecular de 135 bp. Nos controlos negativos não se observou amplificação, o que indica a ausência de contaminação. Deste modo, confirmou-se a presença de mRNA destes genes apoptóticos no CP.

Os produtos amplificados foram sequenciados pela StabVida, Portugal, e as sequências foram confirmadas com o programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) por comparação com as sequências de base de dados. Após alinhamento das sequências com as sequências da base de dados de *Rattus norvegicus*, obteve-se: 97% de homologia com a sequência de nucleótidos da Casp2; 99% de homologia com a sequência de nucleótidos da Casp3; 96% de homologia com a sequência de nucleótidos da Cflar; 96% de homologia com a sequência de nucleótidos da Casp9; 100% de homologia com a sequência de nucleótidos da Bcl2l1; 100% de homologia com a sequência de nucleótidos da Mdm4p53; 98% de homologia com a sequência de nucleótidos da Gzmc; e 98% de homologia com a sequência de nucleótidos da Cox4i1.

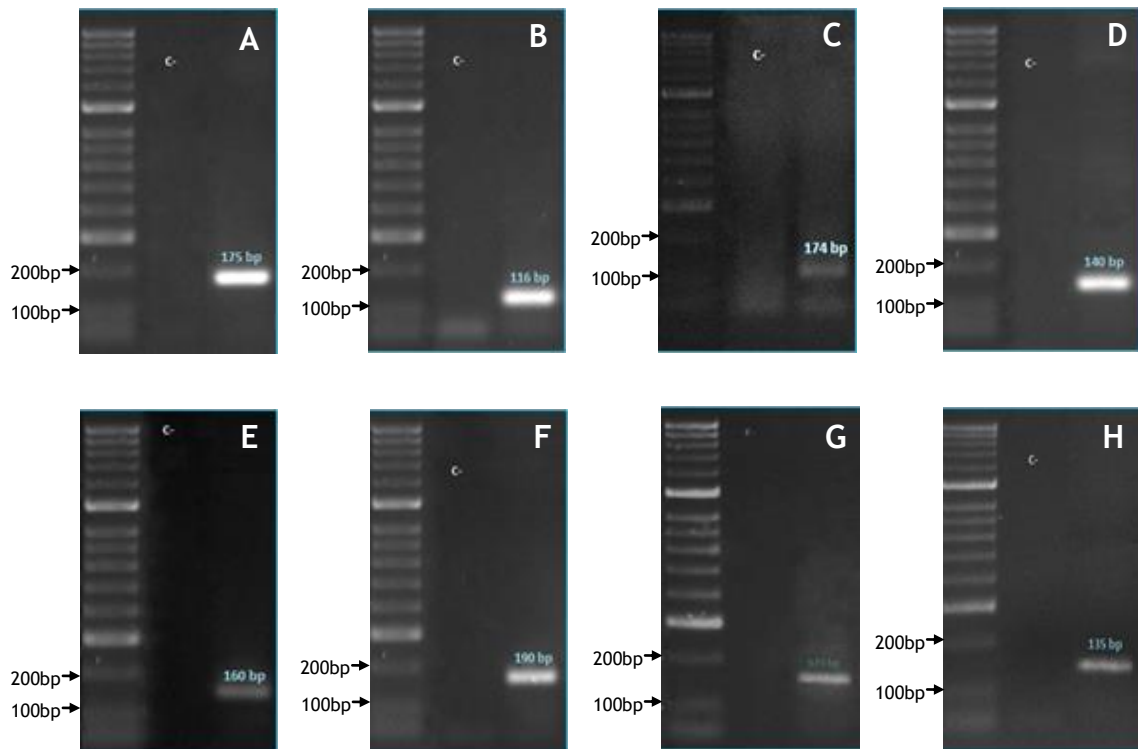


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1.5% corado com *GreenSafe* dos produtos de PCR do cDNA dos genes apoptóticos em estudo. Em cada uma das imagens encontra-se representado (da esquerda para a direita) o marcador de peso molecular, o controlo negativo (C-) e o fragmento relativo a cada gene: (A) Casp2 (175 bp); (B) Casp3 (116 bp); (C) Cflar (174 bp); (D) Casp9 (140 bp); (E) Bcl2l1 (160 bp); (F) Mdm4p53 (190 bp); (G) Gzmc (173 bp); (H) Cox4i1 (135 bp).

1.2. PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real permitiu analisar as diferenças dos níveis de expressão do mRNA dos genes Bcl2l1, Mdm4p53, Casp2, Cflar e Casp9 nos quatro grupos de ratos em estudo: fêmeas controlo, fêmeas OVX, machos controlo e machos OOX. Para normalizar os níveis de expressão dos genes apoptóticos, foi utilizado o gene da Ciclofilina A como controlo endógeno. As barras dos gráficos representam o rácio entre a expressão do gene e a Ciclofilina A para cada grupo. No final, os dados foram tratados estatisticamente usando o *t*-test e One-Way ANOVA, com resultado estatístico significativo quando $p < 0.05$. A figura 7 diz respeito ao gene apoptótico Bcl2l1, cuja expressão não apresenta alterações entre machos controlo e machos OOX mas diminui significativamente ($p < 0.05$) entre fêmeas controlo e fêmeas ovariectomizadas; a figura 8 corresponde ao gene Mdm4p53, cuja expressão tende a aumentar entre machos controlo e machos OOX e a diminuir entre fêmeas controlo e fêmeas OVX, embora sem significado estatístico. O gene Casp2 encontra-se representado na figura 9 e a sua expressão parece diminuir entre machos controlo e OOX, embora também sem significado estatístico; a figura 10 diz respeito ao gene Cflar, cujos resultados de expressão não são estatisticamente significativos, embora pareça existir uma tendência de diminuição

da expressão génica entre os grupos controlo e tratados para machos, sem significado estatístico. Finalmente, o gene Casp9 (Figura 11) sofre uma diminuição bastante significativa ($p < 0.01$) entre fêmeas controlo e tratadas.

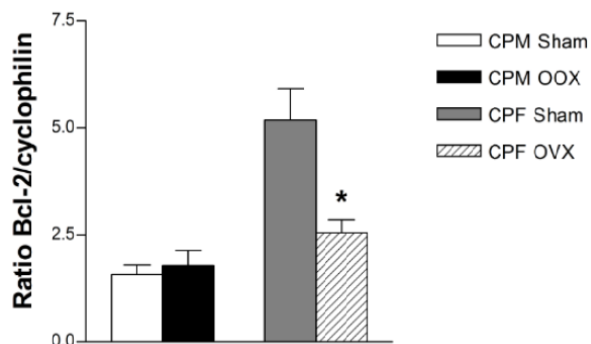


Figura 7 - Níveis de expressão do mRNA do gene apoptótico Bcl2l1 em CP de rato. A expressão do gene Bcl2l1 não apresenta diferenças entre machos Sham e OOX; nas fêmeas, a expressão génica diminui no grupo OVX relativamente ao grupo Sham, sendo esta diferença significativa ($p < 0.05$).

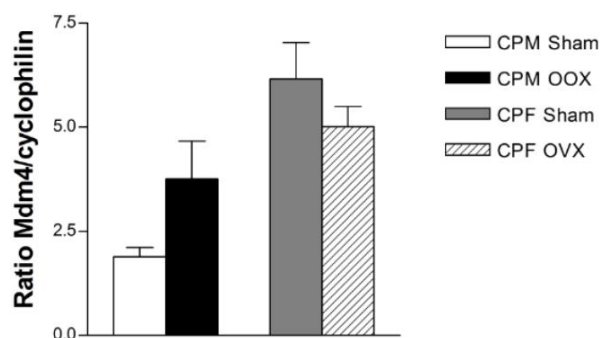


Figura 8 - Níveis de expressão do mRNA do gene Mdm4p53 em CP de rato. A expressão do gene Mdm4p53 tende a aumentar no grupo machos OOX relativamente ao grupo Sham, sem significado estatístico; nas fêmeas, parece existir um decréscimo da expressão no grupo OVX relativamente ao grupo Sham, mas também sem significado estatístico.

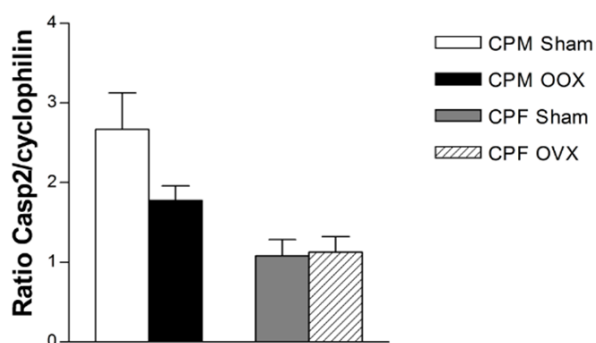


Figura 9 - Níveis de expressão do mRNA da Casp2 em CP de rato. A expressão do gene Casp2 parece ter tendência a diminuir no grupo machos OOX relativamente ao grupo Sham, sem significado estatístico; nas fêmeas também não se verificam diferenças significativas.

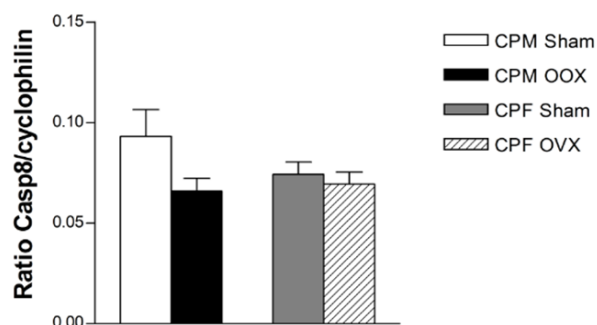


Figura 10 - Níveis de expressão do mRNA do gene Cflar em CP de rato. A expressão do gene Cflar tende a diminuir no grupo machos OOX relativamente ao grupo Sham, sem significado estatístico; a expressão génica entre os grupos Sham e OVX das fêmeas também não apresenta diferenças significativas.

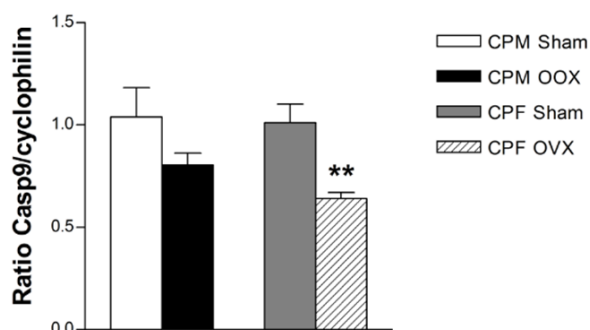


Figura 11 - Níveis de expressão do mRNA da Casp9 em CP de rato. A expressão do gene Casp9 parece ter tendência a diminuir no grupo machos OOX relativamente ao grupo Sham, embora sem significado estatístico; no entanto, nas fêmeas, verificou-se um decréscimo da expressão génica no grupo tratado relativamente ao grupo controlo, sendo esta diferença significativa ($p < 0.01$).

1.3. Imunohistoquímica

A técnica de IHC permitiu identificar a presença e a localização das proteínas da via apoptótica Casp3 e Cox4 em cortes histológicos de CP de rato, por incubação com o respetivo anticorpo primário e substrato DAB. A coloração castanha indica a localização das proteínas em causa nas células epiteliais do CP de rato. Ambas proteínas apoptóticas Casp3 (Figura 12A) e Cox4 (Figura 12B) foram observadas no citoplasma das células epiteliais de CP de rato. No controlo negativo, não se verificou qualquer marcação (Figura 12C).

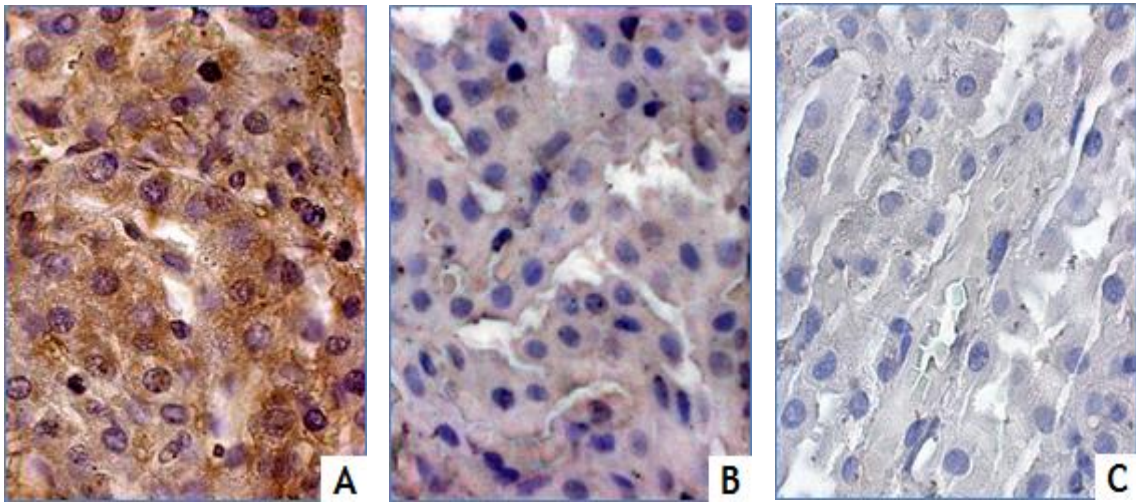


Figura 12 - Localização das proteínas apoptóticas Casp3 e Cox4 em CP de rato por Imunohistoquímica. As imagens representam cortes histológicos de CP de rato incubadas com os respetivos anticorpos primários, e posteriormente incubados com DAB. A figura A corresponde à proteína Casp3 nas células epiteliais do CP de rato; a figura B diz respeito à proteína Cox4 nas células epiteliais do CP de rato; e na figura C está representado o controlo negativo. As figuras foram obtidas numa ampliação original de 100x.

1.4. Whole-Mount de CP (IHC de Fluorescência)

A técnica de “whole-mount” utilizando IHC de fluorescência permitiu analisar a expressão e localizar as proteínas Casp3 e Cox4 no CP inteiro de rato. Os plexos coroides foram incubados com os anticorpos primários respetivos e posteriormente incubados com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488, que se liga ao anticorpo primário e emite fluorescência no comprimento de onda do verde. Além disso, os núcleos celulares dos tecidos foram ainda marcados com DAPI, que emite fluorescência azul. A fluorescência dos tecidos foi observada num microscópio confocal, tendo-se verificado que ambas as proteínas apoptóticas Casp3 (Figura 13A) e Cox4 (Figura 13B) se encontram localizadas no citoplasma das células. Nos controlos negativos (figura 13C), não se verificou qualquer tipo de marcação.

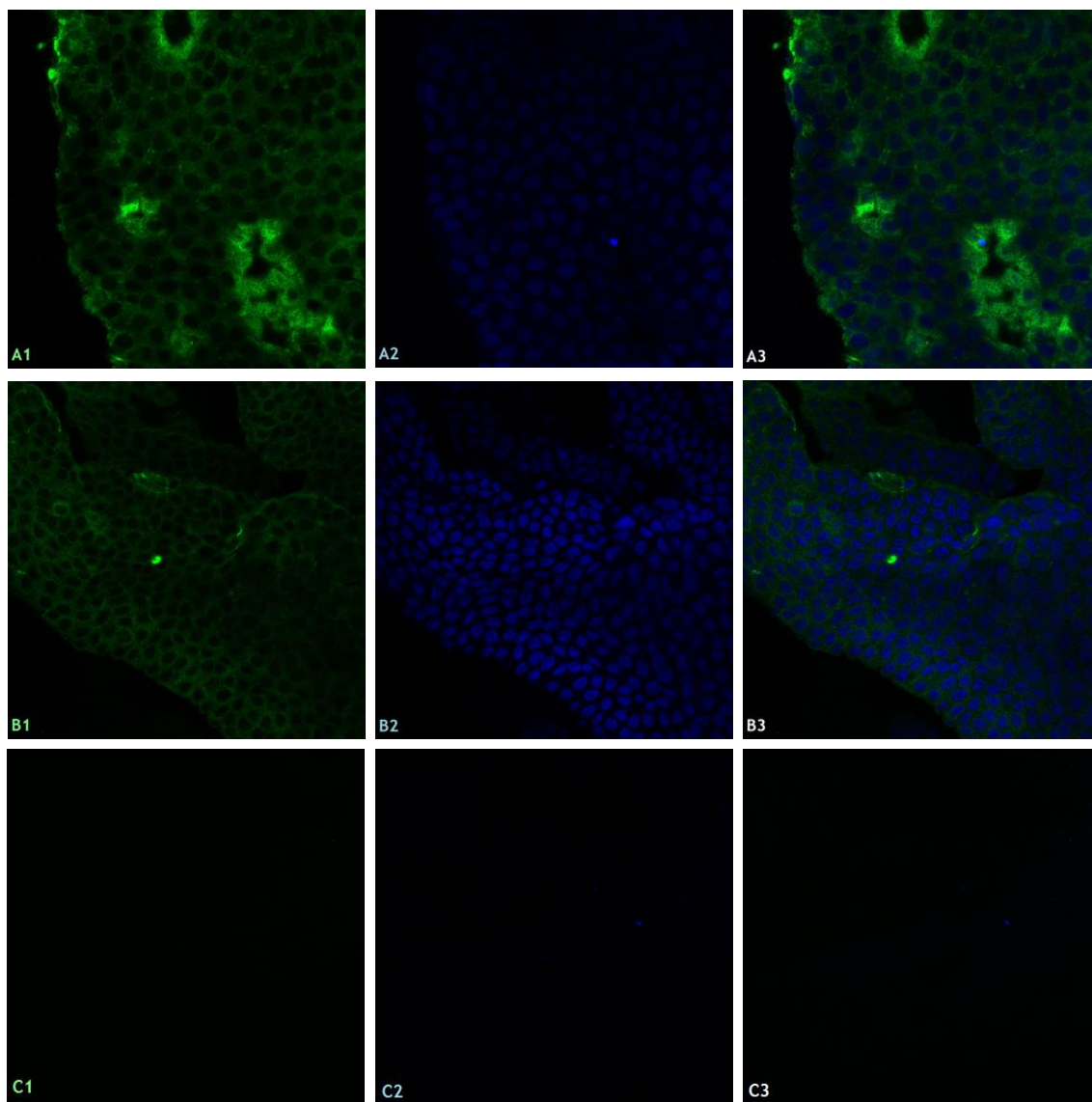


Figura 13 - Imunofluorescência com os anticorpos Casp3 e Cox4 dos CPs de rato por Whole-Mount. As imagens representam CPs de rato incubados com os anticorpos primários Casp3 (A) e Cox4 (B), e posteriormente incubados com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (A1, B1) e DAPI (A2, B2). A figura C representa o controlo negativo. As figuras A3 e B3 representam a sobreposição das figuras A1-A2 e B1-B2, respetivamente. Todas as figuras foram obtidas numa ampliação original de 63x.

1.5. Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo permitiu determinar a percentagem de células RCP apoptóticas e/ou necróticas em várias amostras, quando marcadas com anexina V-FITC e PI que, respetivamente, permitiram determinar a quantidade de células em apoptose inicial e a quantidade de células em apoptose tardia ou necrose. As células da linha celular RCP foram incubadas com a-beta nas concentrações de 10 μ M e 30 μ M (Figuras 14A e 14B, respetivamente) durante 24 horas e verificou-se que o a-beta induz apoptose celular na

proporção das concentrações utilizadas. A figura 14C representa o controlo negativo (células viáveis). Para a análise estatística, escolheu-se uma região específica dos *dot blots* obtidos, onde se pensa que se encontram as células, que resultou em 39% de apoptose celular induzida pelo a-beta 10 μ M, e 50% de células RCP apoptóticas para o a-beta na concentração 30 μ M. No entanto, as células viáveis (sem tratamento) apresentaram também cerca de 67% de apoptose.

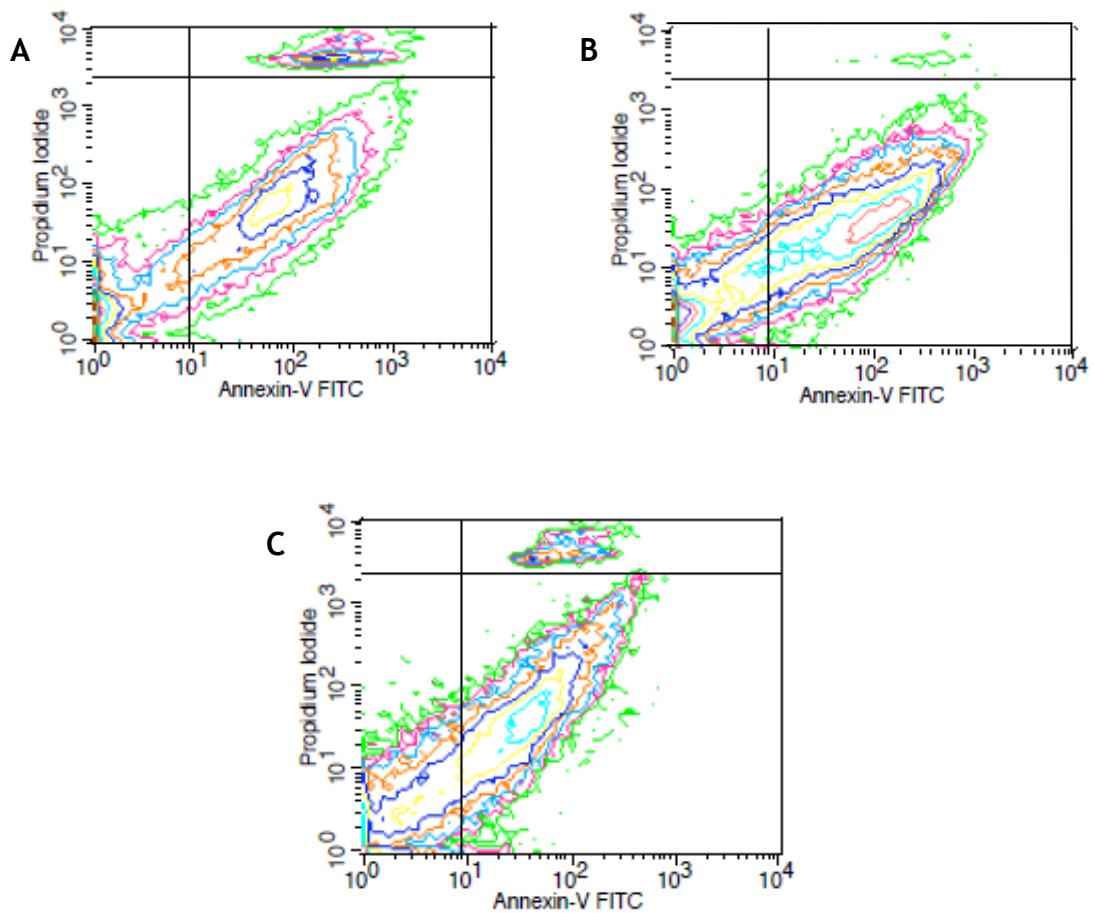


Figura 14 - Análise da apoptose induzida pelo a-beta na linha celular RCP por citometria de fluxo, através da marcação com anexina V-FITC e PI. A divisão dos *dot blot* em quadrantes permite a visualizar as células viáveis (negativas para anexina V-FITC e PI), em apoptose inicial (positivas para anexina V-FITC e negativas para PI), e células em apoptose tardia ou necrose (positivas para anexina V-FITC e PI). As figuras A e B representam as concentrações de 10 μ M e 30 μ M do a-beta, tendo resultado em 39% e 50% de células RCP apoptóticas, e em 4% e 0.3% de células mortas, respetivamente. A figura C representa o controlo negativo (células viáveis), com 67% de apoptose e 3% de células mortas.

IV. Discussão

O plexo coroide, além de ter um papel fundamental na produção e secreção de líquido cefalorraquidiano, ajustamento do volume intracranial e tamponamento do fluido extracelular do cérebro (Gherzi-Egea and Strazielle 2000), expressa recetores hormonais (Hong-Goka and Chang 2004; Quadros et al. 2007; Alves et al. 2009) e é um tecido alvo para esteroides com efeitos neuroprotetores, cujos níveis diminuem com a idade (Hong-Goka and Chang 2004). Estas hormonas evitam a apoptose e têm ação direta através dos recetores e indireta através de vias de sinalização que têm a mitocôndria como alvo (Pike et al. 2009). Os esteroides poderão regular a apoptose nas células epiteliais do CP, através da regulação da expressão dos genes da apoptose aí expressos. Um estudo de *microarrays* transcriptómicos do CP, realizado previamente pelo nosso grupo de investigação, revelou existir um grupo de genes relacionados com a apoptose, regulado pelas hormonas esteroides. Em conjunto, estas evidências levaram à hipótese do plexo coroide, sob efeito hormonal, ficar protegido contra a apoptose.

Assim, foram selecionados alguns genes apoptóticos considerados moléculas-chave na morte celular programada. A granzima C induz rapidamente a morte das células-alvo e encontra-se associada à libertação do citocromo c de mitocôndrias danificadas. Apesar de não danificar mitocôndrias diretamente, a GzmC causa despolarização e inchaço (Johanson et al. 2004). A Bcl-2 protege as células contra a morte celular programada e bloqueia a via mitocondrial, impedindo a libertação do citocromo c (Elmore 2007). A Mdm4p53 é um importante regulador da atividade da p53, um gene supressor de tumor envolvido na morte celular programada de células anormais ou danificadas (Toledo and Wahl 2007). As caspases 2, 8 e 9 são caspases iniciadoras que desencadeiam a fase de execução. A caspase 8 tem a particularidade de clivar a proteína Bid, que desencadeia a libertação do citocromo c, e a caspase 9, quando ligada ao citocromo c e ao Apaf-1, forma o apoptossoma (Elmore 2007). A caspase 3 é a caspase efetora mais importante, pois ativa especificamente a endonuclease CAD, que degrada o DNA cromossómico dentro dos núcleos e provoca a condensação da cromatina, estimulando a reorganização do citoesqueleto e a desintegração celular em corpos apoptóticos (Elmore 2007).

Começámos por analisar os níveis de expressão do mRNA destes genes apoptóticos na linha celular Z310 de plexo coroide de rato através de PCR convencional, de modo a confirmar se o CP pode estar relacionado com a apoptose. A expressão dos genes das caspases 2, 3, 8 e 9, Bcl2l1, Mdm4p53, GzmC e Cox4i1 como moléculas-chave da apoptose está identificada em todos os tecidos, incluindo os CPs e outras regiões do sistema nervoso, sobretudo em hipocampo (Loo et al. 1993; González-García et al. 1995; Merry and Korsmeyer 1997; Nagy and Esiri 1997; Gorman et al. 1998; Yuan and Yankner 2000). No entanto, após a análise do mRNA dos genes em estudo, foi possível confirmar que todos eles estão expressos na linha celular Z310 do plexo coroide de rato e, portanto, estas células constituem um bom modelo para os estudos de apoptose.

Além disso, a expressão dos genes apoptóticos diferencialmente expressos nos *microarrays* - Bcl2l1, Mdm4p53, Casp2, Casp8 e Casp9 - foi também confirmada através de PCR em tempo real, por análise dos níveis de mRNA em animais fêmeas e machos cujas gónadas foram removidas, de modo a confirmar o efeito das hormonas esteroides na maquinaria apoptótica. A ação das hormonas esteroides na apoptose foi já diversas vezes descrita (Simpkins et al. 1994; Razmara et al. 2007; Pike et al. 2008; Pike et al. 2009; Vasconsuelo et al. 2011). Segundo a literatura, os estrogénios têm efeitos diretos nas mitocôndrias, podendo suprimir a produção de ROS (Borrás et al. 2003; Razmara et al. 2007), e inibem a libertação do citocromo c e a ativação da caspase 3 (Morkuniene et al. 2006). Por sua vez, a testosterona ativa a via de morte mitocondrial, expressão das caspases 3 e 8, e clivagem através da via Fas/FasL (Jin et al. 2006; Winiarska et al. 2006). Apenas as diferenças de expressão dos genes das caspases coincidiram com os resultados dos *microarrays*, nos grupos tratados *versus* controlo, em machos e fêmeas. A alteração dos níveis de expressão dos genes apoptóticos não foi significativa na maioria dos casos, e os resultados contraditórios podem estar relacionados com um baixo número de amostras para cada gene (n=6), podendo ser possível obter os resultados esperados com um maior número de amostras de cada grupo de animais. No entanto, estas análises da expressão do mRNA dos genes apoptóticos mencionados acima na linha celular Z310 permitiram confirmar que a apoptose no CP pode ser regulada por modificações hormonais.

Posteriormente, as proteínas da Caspase 3 e Cox4 foram também analisadas através de imunohistoquímica e whole-mount (IHC de fluorescência), de modo a observar a distribuição e localização das proteínas no tecido. O resultado de ambas as técnicas confirmou a presença destas proteínas no citoplasma celular de CP, tal como descrito anteriormente neste e noutros tecidos por outros autores (Wong-Riley 1989; Hevner et al. 1995; Wong-Riley et al. 1997; Mancini et al. 1998; Clark et al. 2000).

Por fim, foi analisado o efeito do a-beta na indução de apoptose, através de citometria de fluxo na linha celular RCP. Os resultados mostram que o a-beta em diferentes concentrações induz apoptose celular em percentagens crescentes, tal como descrito anteriormente na literatura (Loo et al. 1993; Nagy and Esiri 1997; Dickson 2004; Vargas et al. 2010). No entanto, as células sem tratamento revelaram uma maior percentagem de apoptose, mas os resultados obtidos são ainda preliminares, pelo que a técnica necessita de ser otimizada.

V. Conclusão e Perspetivas Futuras

A elaboração desta dissertação permitiu confirmar que no plexo coroide alguns genes apoptóticos são diferencialmente expressos em função dos níveis hormonais, nomeadamente estrogénios e androgénios, causadas pela castração. Além disso, confirmámos que o a-beta induz a apoptose nas células do CP, pelo que pode ser sujeito à regulação das hormonas sexuais, prevenindo a apoptose celular na doença de Alzheimer.

O envelhecimento, devido à depleção das hormonas, e a doença de Alzheimer, pela acumulação de β -amiloide, estão também associados com o plexo coroide, pois induzem alterações morfológicas, funcionais e mitocondriais. Futuramente, e tendo em conta que a morte celular mediada pela disfunção mitocondrial está associada à acumulação do péptido β -amiloide, que provoca a doença de Alzheimer, e que as hormonas esteroides reduzem a acumulação de a-beta, deverão ser realizados estudos de forma a confirmar esta hipótese. Assim sendo, deverá ser otimizada a técnica de whole-mount, através da incubação de CPs com a-beta, para avaliar a resposta dos anticorpos Casp3 e Cox4 ao β -amiloide, e posteriormente os CPs tratados com a-beta poderão ser incubados com hormonas sexuais, de forma a avaliar o efeito delas na apoptose causada pela acumulação do β -amiloide. Uma outra forma de avaliar este efeito é a otimização da citometria de fluxo, incubando as células com a-beta e hormonas sexuais.

A longo prazo, poderá ser possível saber qual o papel das hormonas sexuais na apoptose causada pela acumulação do péptido β -amiloide na doença de Alzheimer no plexo coroide, e de que forma as hormonas sexuais, ao atuar neste tecido, podem atenuar o efeito do a-beta.

VI. Referências Bibliográficas

- Aldred AR, Brack CM, Schreiber G. 1995. The cerebral expression of plasma protein genes in different species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **111**(1): 1-15.
- Alimonti JB, Shi L, Baijal PK, Greenberg AH. 2001. Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry* **276**(10): 6974-6982.
- Alves CH, Gonçalves I, Socorro S, Baltazar G, Quintela T, Santos CR. 2009. Androgen Receptor is Expressed in Murine Choroid Plexus and Downregulated by 5α -Dihydrotestosterone in Male and Female Mice. *Journal of molecular neuroscience* **38**(1): 41-49.
- Alvira-Botero X, Carro E. 2010. Clearance of amyloid- β peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Current aging science* **3**(3): 219.
- Applebaum-Bowden D, McLean P, Steinmetz A, Fontana D, Matthys C, Warnick G, Cheung M, Albers J, Hazzard W. 1989. Lipoprotein, apolipoprotein, and lipolytic enzyme changes following estrogen administration in postmenopausal women. *Journal of lipid research* **30**(12): 1895-1906.
- Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**(5381): 1305-1308.
- Barinaga M. 1994. Cell suicide: by ICE, not fire. *Science* **263**: 754-756.
- Barry M, Bleackley RC. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology* **2**(6): 401-409.
- Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee S-F, Moyer RW, Green DR, Bleackley RC. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and cellular biology* **20**(11): 3781-3794.
- Baum LW. 2005. Sex, hormones, and Alzheimer's disease. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **60**(6): 736-743.
- Behl C, Davis J, Lesley R, Schubert D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**(6): 817.
- Belfort MA, Saade GR, Snabes M, Dunn R, Moise KJ, Cruz A, Young R. 1995. Hormonal status affects the reactivity of the cerebral vasculature. *American journal of obstetrics and gynecology* **172**(4): 1273-1278.
- Bell RD, Deane R, Chow N, Long X, Sagare A, Singh I, Streb JW, Guo H, Rubio A, Van Nostrand W. 2008. SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid- β clearance in brain vascular cells. *Nature cell biology* **11**(2): 143-153.
- Benito A, Grillot D, Nuñez G, Fernández-Luna JL. 1995. Regulation and function of Bcl-2 during differentiation-induced cell death in HL-60 promyelocytic cells. *The American journal of pathology* **146**(2): 481.

- Benito A, Silva M, Grillot D, Nunez G, Fernandez-Luna JL. 1996. Apoptosis induced by erythroid differentiation of human leukemia cell lines is inhibited by Bcl-XL. *Blood* **87**(9): 3837-3843.
- Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J. 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine* **34**(5): 546-552.
- Brown P, Davies S, Speake T, Millar I. 2004. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience* **129**(4): 955-968.
- Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N. 2003. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. In *Seminars in immunology*, Vol 15, pp. 167-176. Elsevier.
- Carro E, Trejo J, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. 2002. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid- β levels. *Nature medicine* **8**(12): 1390-1397.
- Chen S, Nilsen J, Brinton RD. 2006. Dose and temporal pattern of estrogen exposure determines neuroprotective outcome in hippocampal neurons: therapeutic implications. *Endocrinology* **147**(11): 5303-5313.
- Chinnaiyan AM. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia (New York, NY)* **1**(1): 5.
- Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. 2000. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microscopy research and technique* **52**(1): 65-82.
- Chung H, Brazil MI, Soe TT, Maxfield FR. 1999. Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer's amyloid β -peptide by microglial cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**(45): 32301-32308.
- Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, Seidberg NA, Melick J, Loeffert JE, Nathaniel PD, Jin KL. 2000. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *Journal of neurochemistry* **74**(2): 740-753.
- Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* **326**(Pt 1): 1.
- Cohen GM, Sun X-M, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D. 1994. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *The Journal of Immunology* **153**(2): 507-516.
- Cornford EM, Varesi JB, Hyman S, Damian RT, Raleigh MJ. 1997. Mitochondrial content of choroid plexus epithelium. *Experimental brain research* **116**(3): 399-405.
- Cory S, Adams JM. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* **2**(9): 647-656.
- Costa R, Goncalves A, Saraiva M, Cardoso I. 2008. Transthyretin binding to A-Beta peptide- Impact on A-Beta fibrillogenesis and toxicity. *FEBS letters* **582**(6): 936-942.
- Courchesne E, Chisum HJ, Townsend J, Cowles A, Covington J, Egaas B, Harwood M, Hinds S, Press GA. 2000. Normal brain development and aging: quantitative analysis at in vivo MR imaging in healthy Volunteers1. *Radiology* **216**(3): 672-682.

- Davies P. 2006. A very incomplete comprehensive theory of Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **924**(1): 8-16.
- Deane R, Bell R, Sagare A, Zlokovic B. 2009. Clearance of amyloid- β peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* **8**(1): 16.
- Del Bigio MR. 1995. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* **14**(1): 1-13.
- Dickson DW. 2004. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **114**: 23-27.
- Dohrmann GJ. 1970. The choroid plexus: a historical review. *Brain research* **18**(2): 197-218.
- Duckles SP, Krause DN, Stirone C, Procaccio V. 2006. Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Molecular interventions* **6**(1): 26.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier M-C. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta neuropathologica* **118**(1): 5-36.
- Ek CJ, Dziegielewska KM, Habgood MD, Saunders NR. 2011. Barriers in the developing brain and *i> Neurotoxicology</i>. *Neurotoxicology*.*
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**(4): 495-516.
- Emerich DF, Skinner SJ, Borlongan CV, Vasconcellos AV, Thanos CG. 2005. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *Bioessays* **27**(3): 262-274.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Erkkilä K, Henriksen K, Hirvonen V, Rannikko S, Salo J, Parvonen M, Dunkel L. 1997. Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82**(7): 2314-2321.
- Faraci FM, Mayhan WG, Heistad DD. 1989. Effect of serotonin on blood flow to the choroid plexus. *Brain research* **478**(1): 121-126.
- Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, Bremner WJ, McKinlay JB. 2002. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**(2): 589-598.
- Ferrante F, Amenta F. 1987. Enzyme histochemistry of the choroid plexus in old rats. *Mechanisms of ageing and development* **41**(1): 65-72.
- Finder VH, Glockshuber R. 2007. Amyloid- β aggregation. *Neurodegenerative Diseases* **4**(1): 13-27.
- Gherzi-Egea JF, Strazielle N. 2000. Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus. *Microscopy research and technique* **52**(1): 83-88.

- Gompel A, Somaï S, Chaouat M, Kazem A, Kloosterboer HJ, Beusman I, Forgez P, Mimoun M, Rostène W. 2000. Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids* **65**(10): 593-598.
- González-García M, Garcia I, Ding L, O'Shea S, Boise LH, Thompson CB, Núñez G. 1995. Bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**(10): 4304-4308.
- Gorman AM, Orrenius S, Ceccatelli S. 1998. Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreport* **9**(10): R49-R55.
- GRAY A, FELDMAN HA, MCKINLAY JB, LONGCOPE C. 1991. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **73**(5): 1016-1025.
- Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**(5580): 353-356.
- Harman D. 1972. The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* **20**(4): 145.
- Heibin JA, Goping S, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, Bleackley RC. 2000. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *The Journal of experimental medicine* **192**(10): 1391-1402.
- Henderson VW. 1997. The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology* **48**(5 Suppl 7): 275-355.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**(6805): 770-776.
- Heussler VT, Küenzi P, Rottenberg S. 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International journal for parasitology* **31**(11): 1166.
- Hevner R, Liu S, Wong-Riley M. 1995. A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: histochemical, densitometric and biochemical studies. *Neuroscience* **65**(2): 313-342.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal* **23**(10): 2134-2145.
- Hogervorst E, Lehmann D, Warden D, McBroom J, Smith A. 2002. Apolipoprotein E ϵ 4 and testosterone interact in the risk of Alzheimer's disease in men. *International journal of geriatric psychiatry* **17**(10): 938-940.
- Hong-Goka BC, Chang F-LF. 2004. Estrogen receptors α and β in choroid plexus epithelial cells in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* **360**(3): 113-116.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* **81**(4): 495-504.
- Jia Y, Castellanos J, Wang C, Sinha-Hikim I, Lue Y, Swerdloff RS, Sinha-Hikim AP. 2009. Mitogen-activated protein kinase signaling in male germ cell apoptosis in the rat. *Biology of reproduction* **80**(4): 771-780.

- Jin L, Ai X, Liu L, Wang Z, Cheng Y, Qiao Z. 2006. Testosterone induces apoptosis via Fas/FasL-dependent pathway in bone marrow-derived macrophages. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* **28**(5): 283-294.
- Johanson C, McMillan P, Tavares R, Spangenberg A, Duncan J, Silverberg G, Stopa E. 2004. Homeostatic capabilities of the choroid plexus epithelium in Alzheimer's disease. *Cerebrospinal Fluid Res* **1**(3).
- Johanson CE, Preston JE, Chodobski A, Stopa EG, Szmydynger-Chodobska J, McMillan PN. 1999. AVP V1 receptor-mediated decrease in Cl⁻ efflux and increase in dark cell number in choroid plexus epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **276**(1): C82-C90.
- Johnson H, Scorrano L, Korsmeyer SJ, Ley TJ. 2003. Cell death induced by granzyme C. *Blood* **101**(8): 3093-3101.
- Jordan VC. 2008. The 38th David A. Karnofsky Lecture: the paradoxical actions of estrogen in breast cancer—survival or death? *Journal of Clinical Oncology* **26**(18): 3073-3082.
- Kataoka T, Schröter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J. 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *The Journal of Immunology* **161**(8): 3936-3942.
- Kawata M. 1995. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neuroscience research* **24**(1): 1-46.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**(4): 239.
- Kischkel F, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer P, Peter M. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* **14**(22): 5579.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**(5303): 1132-1136.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *The Journal of Immunology* **171**(9): 4672-4679.
- Kushwaha RS, Foster DM, Barrett PHR, Dee Carey K, Bernard MG. 1991. Metabolic regulation of plasma apolipoprotein E by estrogen and progesterone in the baboon (*Papio* sp). *Metabolism* **40**(1): 93-100.
- Kvitnitskaia-Ryzhova T, Shkapenko A. 1992. A comparative ultracytochemical and biochemical study of the ATPases of the choroid plexus in aging]. *Tsitologiya* **34**(6): 81.
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**(25): 3247.
- Lacroix S, Feinstein D, Rivest S. 2006. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain pathology* **8**(4): 625-640.

- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu C-e, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269**(5226): 973-977.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**(4): 479-490.
- Lim D, Flicker L, Dharamarajan A, Martins RN. 2003. Can testosterone replacement decrease the memory problem of old age? *Medical Hypotheses* **60**(6): 893-896.
- Linnane A, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. 1989. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* **1**(8639): 642.
- Liu H, Pedram A, Kim JK. 2011. Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38 α -mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38 β . *Cardiovascular research* **89**(1): 119-128.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**(4): 487.
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. 1993. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**(17): 7951-7955.
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. 1998. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *The Journal of cell biology* **140**(6): 1485-1495.
- Marieb EN, Hoehn K. 2007. *Human anatomy & physiology*. Pearson Education.
- Martin S, Reutelingsperger C, McGahon AJ, Rader JA, Van Schie R, LaFace DM, Green DR. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine* **182**(5): 1545-1556.
- Martin SJ, Green DR. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* **82**(3): 349.
- Mattson MP, Tomaselli KJ, Rydel RE. 1993. Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated β -amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain research* **621**(1): 35-49.
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. 2010. Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science* **330**(6012): 1774-1774.
- Mazur-Kolecka B, Frackowiak J, Wisniewski HM. 1995. Apolipoproteins E3 and E4 induce, and transthyretin prevents accumulation of the Alzheimer's beta-amyloid peptide in cultured vascular smooth muscle cells. *Brain Res* **698**(1-2): 217-222.
- Merry D, Korsmeyer S. 1997. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annual review of neuroscience* **20**(1): 245-267.

- Miller LK. 1999. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in cell biology* **9**(8): 323-328.
- Minn AJ, Boise LH, Thompson CB. 1996. Bcl-x Antagonizes the Protective Effects of Bcl-x. *Journal of Biological Chemistry* **271**(11): 6306-6312.
- Monnot AD, Zheng W. 2013. Culture of Choroid Plexus Epithelial Cells and In Vitro Model of Blood-CSF Barrier. In *Epithelial Cell Culture Protocols*, pp. 13-29. Springer.
- Mooradian AD. 1993. Antioxidant properties of steroids. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **45**(6): 509-511.
- Morkuniene R, Arandarcikaite O, Borutaite V. 2006. Estradiol prevents release of cytochrome *c* from mitochondria and inhibits ischemia-induced apoptosis in perfused heart. *Experimental gerontology* **41**(7): 704-708.
- Morley JE. 2001. Androgens and aging. *Maturitas* **38**(1): 61-71.
- Mukai K, Daifuku K, Yokohama S, Minoru N. 1990. Stopped-flow investigation of antioxidant activity of estrogens in solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1035**(3): 348-352.
- Muller M, den Tonkelaar I, Thijssen J, Grobbee DE, van der Schouw YT. 2003. Endogenous sex hormones in men aged 40-80 years. *European Journal of Endocrinology* **149**(6): 583-589.
- Nagy Z, Esiri M. 1997. Apoptosis-related protein expression in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **18**(6): 565-571.
- Nakajima H, Park HL, Henkart PA. 1995. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *The Journal of experimental medicine* **181**(3): 1037-1046.
- Nielsen HM, Mulder SD, Beliën JA, Musters RJ, Eikelenboom P, Veerhuis R. 2010. Astrocytic A β 1-42 uptake is determined by A β -aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia* **58**(10): 1235-1246.
- Niki E, Nakano M. 1990. [34] Estrogens as antioxidants. *Methods in enzymology* **186**: 330-333.
- Nilsen J, Brinton RD. 2004. Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders* **3**(4): 297-313.
- Norbury CJ, Hickson ID. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology* **41**(1): 367-401.
- Ono K, Noguchi M, Matsumoto Y, Yanase D, Iwasa K, Naiki H, Yamada M. 2005. Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes β -amyloid fibril formation in vitro. *Neurobiology of disease* **20**(2): 233-240.
- Paganini-Hill A, Henderson VW. 1994. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *American Journal of Epidemiology* **140**(3): 256-261.
- Palha JA, Fernandes R, de Escobar GM, Episkopou V, Gottesman M, Saraiva MJ. 2000. Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the

- brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model. *Endocrinology* **141**(9): 3267-3272.
- Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER. 2006. Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Molecular biology of the cell* **17**(5): 2125-2137.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**(9): e45-e45.
- Pike CJ. 2001. Estrogen Modulates Neuronal Bcl-xl Expression and β -Amyloid-Induced Apoptosis. *Journal of neurochemistry* **72**(4): 1552-1563.
- Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM. 2009. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroendocrinology* **30**(2): 239-258.
- Pike CJ, Nguyen T-VV, Ramsden M, Yao M, Murphy MP, Rosario ER. 2008. Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions. *Hormones and behavior* **53**(5): 693-705.
- Preston JE. 2000. Ageing choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Microscopy research and technique* **52**(1): 31-37.
- Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS. 1998. Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annual review of genetics* **32**(1): 461-493.
- Pronsato L, Ronda A, Milanesi L, Vasconsuelo A, Boland R. 2010. Protective role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis of skeletal muscle. *Actualizaciones en Osteologia* **6**: 66-80.
- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. 1998. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid β -protein by degradation. *Journal of Biological Chemistry* **273**(49): 32730-32738.
- Quadros PS, Pfau JL, Wagner CK. 2007. Distribution of progesterone receptor immunoreactivity in the fetal and neonatal rat forebrain. *The Journal of comparative neurology* **504**(1): 42-56.
- Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The international journal of lower extremity wounds* **4**(3): 138-144.
- Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. 2007. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain research* **1176**: 71-81.
- Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. 2005. The Choroid Plexus-Cerebrospinal Fluid System: From Development to Aging. *Current topics in developmental biology* **71**: 1-52.
- Roder HM, Eden PA, Ingram VM. 1993. Brain protein kinase PK40erk converts TAU into a PHF-like form as found in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **193**(2): 639-647.
- Rosario ER, Pike CJ. 2008. Androgen regulation of β -amyloid protein and the risk of Alzheimer's disease. *Brain research reviews* **57**(2): 444-453.
- Russell JH, Ley TJ. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* **20**(1): 323-370.

- Saelens X, Festjens N, Walle LV, Van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**(16): 2861-2874.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**(6662): 96-99.
- Sakka L, Coll G, Chazal J. 2011. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*.
- Saunders N, Habgood M, Dziegielewska K. 2002. Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* **26**(1): 11-19.
- Savill J, Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**(6805): 784-788.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **274**(3): 1541-1548.
- Seeley RR. 2001. Anatomia & fisiologia.
- Segal M. 1993. Extracellular and cerebrospinal fluids. *Journal of inherited metabolic disease* **16**(4): 617-638.
- Segal MB. 2000a. The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cellular and molecular neurobiology* **20**(2): 183-196.
- . 2000b. Transport of nutrients across the choroid plexus. *Microscopy research and technique* **52**(1): 38-48.
- Serot J-M, Béné M-C, Faure GC. 2003. Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Front Biosci* **8**: s515-521.
- Serot J-M, Béné M-C, Foliguet B, Faure GC. 2000a. Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium. *Journal of neuroimmunology* **105**(2): 115-119.
- . 2000b. Morphological alterations of the choroid plexus in late-onset Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* **99**(2): 105-108.
- Serot J-M, Zmudka J, Jouanny P. 2012. A Possible Role for CSF Turnover and Choroid Plexus in the Pathogenesis of Late Onset Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **30**(1): 17-26.
- Serot J, Christmann D, Dubost T, Couturier M. 1997. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **63**(4): 506-508.
- Serot JM, Foliguet B, Béné MC, Faure GC. 2001. Choroid plexus and ageing in rats: a morphometric and ultrastructural study. *European Journal of Neuroscience* **14**(5): 794-798.
- Sherrington R, Rogaev E, Liang Y, Rogaeva E, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**(6534): 754-760.
- Shi L, Kam C-M, Powers J, Aebersold R, Greenberg A. 1992. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate

- and target cell interactions. *The Journal of experimental medicine* **176**(6): 1521-1529.
- Shuangshoti S, Netsky MG. 1970. Human choroid plexus: morphologic and histochemical alterations with age. *American Journal of Anatomy* **128**(1): 73-95.
- Silverberg GD, Mayo M, Saul T, Rubenstein E, McGuire D. 2003. Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: a hypothesis. *The Lancet Neurology* **2**(8): 506-511.
- Simpkins JW, Dykens JA. 2008. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain research reviews* **57**(2): 421-430.
- Simpkins JW, Singh M, Bishop J. 1994. The potential role for estrogen replacement therapy in the treatment of the cognitive decline and neurodegeneration associated with Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*.
- Singh M, Dykens JA, Simpkins JW. 2006. Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Experimental Biology and Medicine* **231**(5): 514-521.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 2001. Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of biological Chemistry* **276**(10): 7320-7326.
- Solakidi S, Psarra AG, Nikolaropoulos S, Sekeris CE. 2005. Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction* **20**(12): 3481-3487.
- Spector R. 1977. Vitamin homeostasis in the central nervous system. *The New England journal of medicine* **296**(24): 1393.
- Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. 2005. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Molecular pharmacology* **68**(4): 959-965.
- Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS. 2005. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* **307**(5713): 1282-1288.
- Stopa EG, Berzin TM, Kim S, Song P, Kuo-LeBlanc V, Rodriguez-Wolf M, Baird A, Johanson CE. 2001. Human choroid plexus growth factors: What are the implications for CSF dynamics in Alzheimer's disease? *Experimental neurology* **167**(1): 40-47.
- Strittmatter WJ, Roses AD. 1995. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**(11): 4725-4727.
- Szewczyk A, Wojtczak L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacological reviews* **54**(1): 101-127.
- Tang M-X, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R. 1996. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *The Lancet* **348**(9025): 429-432.
- Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. 2004. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* **43**(5): 605-608.

- Toledo F, Wahl GM. 2007. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**(7): 1476-1482.
- Trapani JA, Smyth MJ. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology* **2**(10): 735-747.
- Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* **552**(2): 335-344.
- Vargas T, Ugalde C, Spuch C, Antequera D, Morán MJ, Martín MA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E. 2010. AB accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis. *Neurobiology of aging* **31**(9): 1569-1581.
- Vasconsuelo A, Pronsato L, Ronda AC, Boland R, Milanesi L. 2011. Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids* **76**(12): 1223-1231.
- Vina J, Sastre J, Pallardo F, Gambini J, Borras C. 2006. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. *Free radical research* **40**(12): 1359-1365.
- Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. 2003. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain research reviews* **42**(3): 221-242.
- Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science Signaling* **296**(5573): 1635.
- Wen GY, Wisniewski HM, Kascsak RJ. 1999. Biondi ring tangles in the choroid plexus of Alzheimer's disease and normal aging brains: a quantitative study. *Brain research* **832**(1): 40-46.
- Winiarska A, Mandt N, Kamp H, Hossini A, Seltmann H, Zouboulis C, Blume-Peytavi U. 2006. Effect of 5 α -dihydrotestosterone and testosterone on apoptosis in human dermal papilla cells. *Skin pharmacology and physiology* **19**(6): 311-321.
- Wolf BB, Green DR. 1999. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry* **274**(29): 20049-20052.
- Wong-Riley M, Antuono P, Ho K-C, Egan R, Hevner R, Liebl W, Huang Z, Rachel R, Jones J. 1997. Cytochrome oxidase in Alzheimer's disease: biochemical, histochemical, and immunohistochemical analyses of the visual and other systems. *Vision research* **37**(24): 3593-3608.
- Wong-Riley MT. 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in neurosciences* **12**(3): 94-101.
- Wostyn P, Audenaert K, De Deyn PP. 2011. choroidal proteins Involved in cerebrospinal Fluid production may be potential Drug Targets for Alzheimer's Disease Therapy. *Perspectives in medicinal chemistry* **5**: 11.
- Wright EM. 1978. Transport processes in the formation of the cerebrospinal fluid. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 83*: 1-34.

- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**(5303): 1129-1132.
- Yankner BA. 1996. Mechanisms of Neuronal Degeneration Review in Alzheimer's Disease. *Neuron* **16**: 921-932.
- Yesavage JA, Holman CA, Sarnquist FH, Berger PA. 1982. Elevation of cerebrospinal fluid lactate with aging in subjects with normal blood oxygen saturations. *Journal of Gerontology* **37**(3): 313-315.
- Yuan J, Yankner BA. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**(6805): 802-809.
- Zimmermann KC, Green DR. 2001. How cells die: apoptosis pathways. *Journal of allergy and clinical immunology* **108**(4): S99-S103.
- Zlokovic BV. 2004. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry* **89**(4): 807-811.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**(3): 405-414.