



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Ritmo circadiano no plexo coroideu: Influência das hormonas sexuais

Cláudia Marisa Fernandes Sousa

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

Orientador: Prof. Doutora Cecília Santos
Co-orientador: Prof. Doutora Telma Quintela

Covilhã, junho de 2013

O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora

(Cláudia Marisa Fernandes Sousa)

Agradecimentos

Não posso deixar de expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que contribuíram com apoio, motivação, incentivo, compreensão e disponibilidade para a concretização desta dissertação. Desejo expressar os meus sentidos e profundos agradecimentos:

À Professora Doutora Cecília Santos pela orientação científica, conhecimentos e disponibilidade demonstrada durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Telma Quintela, pela disponibilidade, dedicação, conhecimentos teóricos e práticos e orientação científica... um Muito Obrigada.

À Professora Doutora Isabel Gonçalves e à Professora Doutora Helena Marcelino pela disponibilidade manifestada e apoio.

Ao projeto PTDC/SAU-NMC/114800/2009 pelo financiamento de todo o trabalho experimental.

Às minhas colegas do laboratório, Carla Gomes, Ana Costa e Joana Tomás, pela ajuda e disponibilidade no decorrer deste trabalho, mas em especial à Filipa Pinheiro por todo o apoio prestado, colaboração no trabalho prático e teórico.

Às minhas amigas e colegas, Joana Pereira, Ana Filipa Esteves, Armanda Gonçalves, Tatiana Saraiva, Sofia Pombal pelo companheirismo, incentivo, compreensão e amizade.

Por fim, um agradecimento muito especial aos meus pais e à minha irmã pelo carinho e por todas as oportunidades concedidas. Sou grata a todos os demais familiares, aos meus avôs, tios, padrinho e primos pelo encorajamento recebido ao longo destes anos. Ao meu namorado, Edgar, obrigada pelo apoio, amor e atenção sem reservas...

Especialmente agradeço aos animais experimentais que com inocência sacrificam as suas vidas pela ciência.

A todos o meu apreço e a minha gratidão.

Resumo

Os ritmos circadianos são controlados por um relógio central, o núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo. A nível molecular, o sistema circadiano é composto por circuitos de feedback de transcrição e tradução que envolvem vários genes da via do ritmo circadiano. Os ritmos circadianos são observáveis numa variedade de tecidos periféricos em todo o corpo. Estudos em animais sugerem que o ciclo circadiano é modulado pelas hormonas sexuais, sobretudo pelos esteroides ovários em fêmeas. Estes efeitos hormonais na ritmicidade circadiana são conhecidos, no entanto, o que falta é a compreensão clara de como o SCN integra essas influências hormonais. Um estudo de *microarrays* de cDNA, realizado anteriormente pelo nosso grupo de investigação, mostrou que os genes do ritmo circadiano são expressos no plexo coroídeo (CP) de rato. Neste trabalho, confirmou-se a presença de alguns genes da via do ritmo circadiano, particularmente BMAL1, CLOCK, Cry 1, Cry 2, Per 1, Per 2 e Per 3 no CP de rato. A expressão dos genes do ritmo circadiano no CP de ratos fêmeas e machos foi analisada por PCR em tempo real. No CP, a expressão rítmica do BMAL1 nos machos, Cry2 nas fêmeas, CLOCK e Per1 nos machos e fêmeas foi considerada não significativa. Pelo contrário, a expressão de mRNA de BMAL1 nas fêmeas, Cry2 nos machos e do Per2 nos machos e nas fêmeas apresentaram ritmicidade significativa. Concluiu-se que, o CP de rato expressa todos os genes do ritmo circadiano estudados, o que sugere que este tecido seja um oscilador extra-SCN. Como os esteroides sexuais atuam noutros osciladores extra-SCN por vias indiretas e diretas é possível que o CP possa contribuir para a interpretação dos estímulos hormonais, atuando como um local extra-SCN que participe numa via indireta da passagem desta informação para o oscilador central.

Palavras-chave

Ritmo circadiano, plexo coroídeo, núcleo supraquiasmático, genes *clock*, hormonas sexuais.

Abstract

Circadian rhythms are controlled by the master clock, the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus. At the molecular level, the clock system is composed of interlocked transcriptional and translational feedback loops which involve several genes of the circadian rhythm. Circadian rhythms also exist in a variety of peripheral tissues throughout the body. Studies in animals suggest that the circadian cycle is modulated by the sex hormones, especially by ovarian steroids in females. The effects of sex hormones on circadian rhythmicity are established; however, clear understanding of how the SCN integrates these hormonal influences is lacking. In previous work, using a cDNA microarray approach, we found that several genes of the brain clock machinery are expressed in the choroid plexus (CP) of rats. This work confirmed the presence of some genes of the circadian rhythm, particularly BMAL1, CLOCK, Cry 1, Cry 2, Per 1, Per 2 and Per 3 in the rat CP. In addition, the rhythmic expression of clock genes in female and male rat CP was investigated by real time PCR. In CP, the rhythmic expression of BMAL1 in male rats, Cry2, Per1 in female rats and CLOCK in male and female rats was not significant. In contrast, the mRNA expression of Bmal1 in females, Cry2 in males and Per2 in males and females showed significant rhythmicity in the CP. It was concluded that the CP expressed all genes the mouse circadian rhythm studied, thus suggesting that this tissue is extra-SCN oscillator. As sex hormones influence other extra-SCN oscillators by direct and indirect routes it is possible that CP may contribute to the interpretation of hormonal stimuli, acting as an extra-SCN clock participating in an indirect route to veinculate this information to the master clock.

Keywords

Circadian rhythm, choroid plexus, suprachiasmatic nucleus, clock genes, sex hormones.

Índice

I. Introdução	15
1. Ritmo circadiano.....	16
1.1. Organização funcional do ritmo circadiano	16
1.1.1. Oscilador circadiano central: SCN	17
1.1.2. Osciladores circadianos no cérebro	19
1.1.3. Osciladores circadianos periféricos	22
1.2. Mecanismo molecular circadiano	24
1.3. Efeitos das hormonas sexuais.....	26
2. Plexo coroideu	28
2.1. Organização estrutural	28
2.2. Funções.....	31
2.2.1. Produção e secreção de Líquido Cefalorraquidiano	31
2.2.2. Síntese proteica.....	32
2.2.3. Função imunológica	33
2.3. O plexo coroideu no envelhecimento	34
II. Objetivo	35
III. Metodologia.....	37
1. Animais	38
1.2. Animais utilizados na experiência gonadectomizados vs sham.....	38
1.3. Animais utilizados no estudo do ritmo circadiano no plexo coroideu.....	38
2. Extração de RNA total	39

3.	Síntese de DNA complementar	40
4.	PCR convencional	41
5.	PCR em tempo real	42
5.2.	Estudo da regulação do ritmo circadiano	43
6.	Imunohistoquímica	43
8.	Western Blot.....	45
9.	Cultura primária de células epiteliais do plexo coroideu de rato - CPEC.....	46
10.	Imunocitoquímica por fluorescência	47
IV.	Resultados	48
1.	Expressão de mRNA dos genes da via do ritmo circadiano no Plexo Coroideu de rato .	49
1.1.	PCR convencional (RT-PCR).....	49
1.2.	PCR em tempo real - Experiência gonadectomizados vs sham	50
1.3.	PCR em tempo real - Estudo do ritmo circadiano	52
2.	Localização das proteínas na via do ritmo circadiano no Plexo Coroideu de rato	57
2.1.	Imunohistoquímica	57
2.2.	Western blot.....	59
2.3.	Imunocitoquímica por fluorescência	59
V.	Discussão	61
VI.	Conclusões e Perspetivas Futuras	61
VII.	Bibliografia.....	61

Lista de Figuras

Figura 1. Componentes do sistema circadiano nos mamíferos.	17
Figura 2. Localização do núcleo supraquiasmático (SCN).....	18
Figura 3. As principais vias aferentes do núcleo supraquiasmático (SCN).	19
Figura 4. Osciladores circadianos no cérebro de mamíferos.	20
Figura 5. Oscilador circadiano central (relógio supraquiasmático) e glândulas pineal e adrenal.	21
Figura 6. Controlo central dos osciladores periféricos.	23
Figura 7. Mecanismo molecular nos mamíferos.	25
Figura 8. Diferenças entre o local de ação de hormonas estrogénicas e androgénicas no núcleo supraquiasmático (SCN).	27
Figura 9. Localização dos plexos coroideus (CPs) e a distribuição de líquido cefalorraquidiano (CSF) no sistema nervoso central humano.	29
Figura 10. Morfologia do plexo coroideu (CP) do ventrículo lateral cerebral.	30
Figura 11. Modelo esquemático dos animais usados ao longo deste trabalho.	39
Figura 12. Expressão de mRNA dos genes da via circadiana no plexo coroideu de rato.	49
Figura 13. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de BMAL1 em plexo coroideu de rato.	51
Figura 14. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per 2 em plexo coroideu de rato.	51
Figura 15. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per 3 em plexo coroideu de rato.	52
Figura 16. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de BMAL1 no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.	53
Figura 17. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de CLOCK no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.	53

Figura 18. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de Cry2 no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.	54
Figura 19. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de Per1 no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.	55
Figura 20. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de BMAL1 no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.	56
Figura 21. Imunohistoquímica em cortes histológicos de plexo coroideu de rato.	58
Figura 22. Western blot de extratos de proteína total de plexo coroideu de rato.	59
Figura 23. Imunocitoquímica das CPEC de rato com os anticorpos BMAL1, CLOCK, Cry 1, Per 1 e Per 2.	60

Lista de Tabelas

Tabela 1. Alguns polipéptidos e proteínas sintetizadas no plexo coroideu.....	33
Tabela 2. <i>Primers</i> dos genes da via do ritmo circadiano.....	42
Tabela 3. Reagentes e respectivas quantidades para a quantificação de proteína total em placa de 96 poços, pelo método de Bradford.	45
Tabela 4. Genes do ritmo circadiano identificados no plexo coroideu de rato.....	50

Lista de Abreviaturas

5-HT	Serotonina
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
AMY	Amígdala
ARC	Núcleo arqueado
AR	Recetor de androgénio
AVP	Arginina-vasopressina
BMAL1	<i>Brain and muscle-Arnt-like 1</i>
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
BNST	Núcleo da estria terminal
BSA	Albumina sérica bovina
CB	Cerebelo
CKI	Caseína quinase I
CLOCK	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
CNS	Sistema nervoso central
CP	Plexo coroideu
CPEC	Culturas primárias de células epiteliais do plexo coroideu
Cry1-2	Criptocromo 1-2
CSF	Líquido cefalorraquidiano
CX	Córtex
DAB	Diaminobenzidina
DG	Giro denteado

DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DRN	Núcleo dorsal da rafe
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ER	Recetor estrogénio
FBS	Soro fetal bovino
FEO	Oscilador sincronizador dos alimentos
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDX	Gonadectomia
GFP	Proteína verde fluorescente
GHT	Trato geniculohipotalâmico
Glu	Glutamato
GRP	Péptido de libertação da gastrina
HB	Habenula
Hip	Hipocampo
ICC	Imunocitoquímica
IGF	Factor de crescimento semelhante à insulina
IGL	Folheto intergeniculado
IHC	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
IpRGCs	Células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis
LH	Hipotálamo lateral

MASCO	Oscilador circadiano sensível da metanfetamina
ME	Eminência mediana
Mel	Melatonina
MRN	Núcleo mediano da rafe
NAC	Núcleo accumbens
NPAS2	Proteína 2 de domínio PAS neuronal
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
OB	Bulbo olfatório
OOX	Orquidectomizado
OVL	Órgão vascular da lâmina terminal
OVX	Ovariectomizada
PACAP	Proteína ativadora de adenilato ciclase na pituitária
pB	Pares de bases
PBS(T)	Tampão de fosfato salino (Tween)
Per1-3	Período 1-3
PFA	Paraformaldeído
Pi	Córtex piriforme
Pin	Glândula pineal
Pit	Glândula pituitária
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
PVT	Núcleo paraventricular do tálamo
RA	Ácido retinoico

Recetor NMDA	Recetor ionotrópico ativado pelo glutamato
Ret	Retina
Rev-erba ou NR1D1	Recetor nuclear
RH	Trato retinohipotalâmico
ROR α	Recetor órfão relacionado com retinoide alfa
RT-PCR	Reação em cadeia da Polimerase via transcriptase reversa
RVLM	Medula ventrolateral rostral
SCN	Núcleo supraquiasmático
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SON	Núcleo supraóptico
SP	Substância P
TBS	Tampão salino de Tris
TJ	<i>Tight junctions</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TTR	Transtirretina
VIP	Polipéptido intestinal vasoativo
VLPO	Área pré-ótica ventrolateral
VTA	Área tegmental ventral
ZT	Tempo de <i>Zeitgeber</i>

I. Introdução

1. Ritmo circadiano

A palavra “circadiana” deriva do latim "circa diem" que significa aproximadamente um dia (Toh, 2008; Yang, 2010). O ciclo circadiano é um ciclo regular de processos biológicos de um organismo ao longo de um período de aproximadamente vinte e quatro horas, que ocorre independentemente dos tempos *zeitgebers* (palavra alemã que significa tempo doador) (Gerstner & Yin, 2010).

O tempo *zeitgeber* refere-se a uma sinalização exógena, tal como o ciclo dia/noite (ou ciclo claro/escuro), que sincroniza o ritmo circadiano (Gerstner & Yin, 2010). Qualquer sinalização exógena pode sincronizar a hora do sistema de manutenção endógena (Kwon, Choe, Son, & Kim, 2011). O *zeitgeber* mais importante é o ciclo claro/escuro, apesar de existirem outros sincronizadores temporais externos como por exemplo, a temperatura e ingestão alimentar (Dardente, Dardente, & Cermakian, 2007; Kwon et al., 2011; Yang, 2010).

O sistema circadiano é capaz de gerar períodos de vinte e quatro horas de múltiplos processos e fenómenos biológicos conhecidos como ritmos circadianos (atividade locomotora, ciclo sono-vigília, metabolismo do fígado, pressão arterial, temperatura corporal, secreção de hormonas e peptídeos, etc.) (Gerstner & Yin, 2010; Kondratov, 2007). Os ritmos circadianos são controlados evolutivamente por relógios internos conservados, que residem na maioria dos tecidos do corpo (Yang, 2010).

O comportamento e a fisiologia dos organismos vivos apresentam ritmos circadianos bem definidos (Yang, 2010), filogeneticamente antigos, que estão presentes em quase todas as plantas e animais (Karatsoreos, Bhagat, Bloss, Morrison, & McEwen, 2011).

1.1. Organização funcional do ritmo circadiano

O sistema circadiano está organizado de forma hierárquica (Figura 1) (Kondratov, 2007). Nos mamíferos, este ritmo é gerado por um relógio circadiano central, o núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo, que por sua vez sincroniza os osciladores circadianos do cérebro e do corpo em quase todos os tipos de células e sistemas de órgãos (Karatsoreos et al., 2011), apesar dos mecanismos neuronal e humoral permanecerem inexplicados (Yang, 2010). Como tal, o principal relógio circadiano dos mamíferos é o SCN, o qual é constituído por um conjunto de neurónios (20,000-100,000 nos mamíferos) no hipotálamo anterior perto do quiasma (Dardente et al., 2007; Kondratov, 2007).

Estudos comportamentais em animais de laboratório, tais como ratinhos e ratos, revelaram que os animais intatos exibem cerca de vinte e quatro horas de ritmo circadiano, mesmo na ausência de sinais de tempo externos (por exemplo, escuridão constante). Estes resultados

apoiam a existência de um "oscilador circadiano central", que gera ritmicidade circadiana intrínseca (Figura 1) (Kwon et al., 2011).

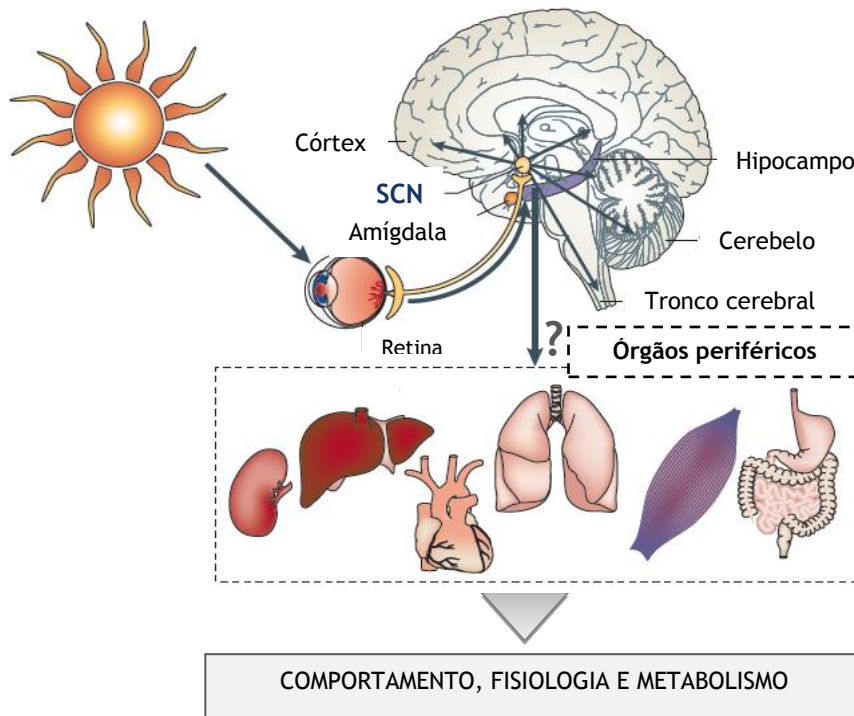


Figura 1. Componentes do sistema circadiano nos mamíferos.

As alterações na luz devido ao ciclo de dia/noite são detetadas diretamente pela retina. A informação de luz é transmitida para o núcleo supraquiasmático (SCN) no hipotálamo anterior pelo trato retinohipotalâmico (RHT). O SCN funciona como um oscilador circadiano onde a ritmicidade circadiana é gerada. Esta é convertida em sinais emitidos que controlam o comportamento, a fisiologia e o metabolismo dos organismos. Adaptada de Kondratova & Kondratov, 2012; Kwon et al., 2011.

1.1.1. Oscilador circadiano central: SCN

O SCN é uma estrutura neuronal localizada no hipotálamo anteroventral, em ambos os lados do terceiro ventrículo, logo acima do quiasma ótico (Figura 2A). No rato, cada SCN unilateral contém ~10 mil neurónios em duas subdivisões anatómicas: uma região ventral "nuclear" e uma região dorsal "capsular" (Figura 2B) (Welsh, Takahashi, & Kay, 2010). A região ventral é caracterizada pela expressão do polipéptido intestinal vasoativo (VIP), péptido de libertação da gastrina (GRP) 3 e 8, e neuromedina S9 e S10; a região dorsal contém células que expressam a arginina-vasopressina (AVP) (Figura 2B) (Mohawk & Takahashi, 2011).

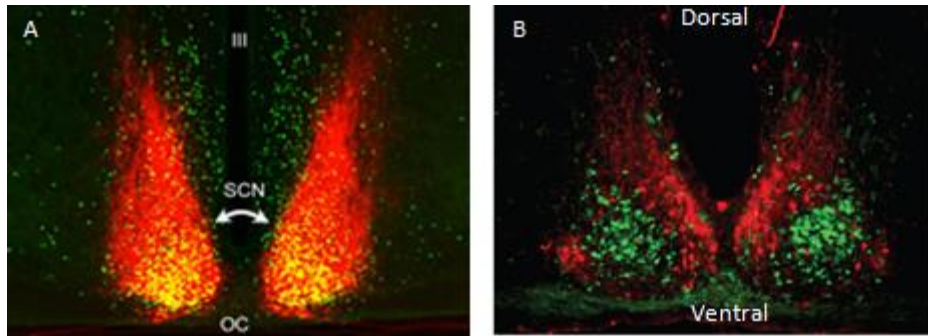


Figura 2. Localização do núcleo supraquiasmático (SCN).

(A) A imagem representa o SCN, localizado entre o terceiro ventrículo, e superiormente ao quiasma óptico. Adaptada de <http://www.neuroendo.org.uk/Topics/BodyClock/20Seeingthelight.aspx>. (B) Secção coronal do SCN, mostrando a região ventral do núcleo delimitado pela proteína verde fluorescente (GFP), presente nos neurónios que expressam o péptido de libertação da gastrina (GRP) representado a cor verde e a região dorsal capsular delimitada por imunofluorescência para a arginina-vasopressina (AVP) identificado a cor vermelha. Adaptada de Welsh et al., 2010.

O SCN pode ser influenciado através de três vias de entrada ou aferentes principais: o trato retinohipotalâmico (RHT), o trato geniculohipotalâmico (GHT) e as terminações serotoninérgicas (5-HT) dos núcleo dorsal da rafe (DRN) e mediano da rafe (MRN) (Figura 3). O RHT medeia a informação luminosa, enquanto o GHT e os núcleos da rafe fornecem informações não luminosas para o SCN (Dibner, Schibler, & Albrecht, 2010).

A luz é traduzida num sinal neuronal por células ganglionares da retina fotossensíveis (ipRGCs), que expressam o fotopigmento melanopsina. Estas células enviam informações luminosas diretamente para o SCN ao longo do RHT (Figura 3) (Albrecht, 2012; Antle & Silver, 2005). As fibras do RHT monossinápticas terminam diretamente na região ventrolateral do SCN (Dibner et al., 2010). Este trato projeta também para o folheto intergeniculato (IGL) que por sua vez projeta para o SCN através do GHT, fornecendo assim a informação luminosa para o SCN. O IGL pode receber informação luminosa através do RHT mas também pode receber informação não luminosa vinda do DRN (Morin & Allen, 2006).

A estimulação de luz na retina conduz à libertação do neurotransmissor glutamato (Glu), e de dois pépticos co-transmissores, substância P (SP) e polipéptido ativador da adenilato-ciclase pituitária (PACAP) no RHT, e o sinal é então propagado para o SCN (Figuras 3) (Albrecht, 2012; Antle & Silver, 2005; Rosenwasser, 2009).

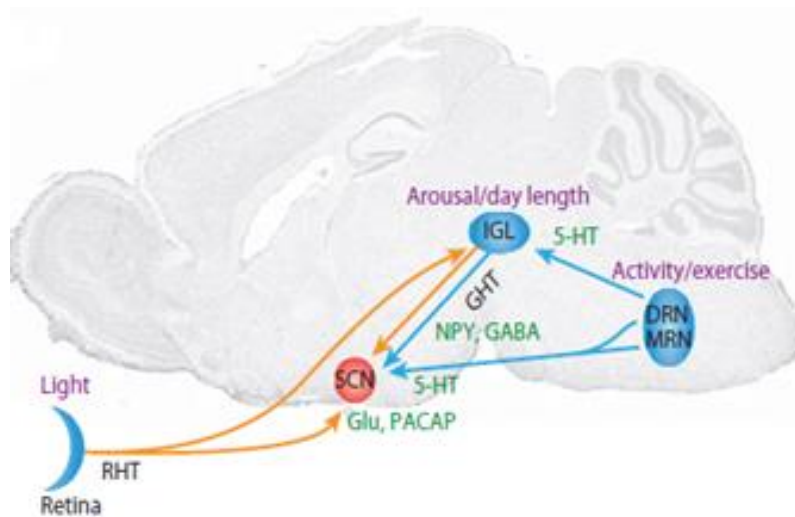


Figura 3. As principais vias aferentes do núcleo supraquiasmático (SCN).

5-HT, serotonina; DRN, núcleo dorsal da rafe, IGL, folheto intergeniculado; GABA, ácido gama-aminobutírico; GHT, trato geniculohipotalâmico; Glu, glutamato; MRN, núcleo mediano da rafe; NPY, neuropeptídeo Y; PACAP, polipéptido ativador da adenilato-ciclase pituitária; RHT, trato retinohipotalâmico; SCN, núcleo supraquiasmático. As setas cor de laranja representam a entrada luminosa e as setas azuis representam a entrada não luminosa no SCN. Adaptada de Dibner et al., 2010.

1.1.2. Osciladores circadianos no cérebro

O SCN funciona como um transmissor central coordenando outros relógios e, assim, sincroniza o sistema circadiano para o ciclo de dia/noite ambiental (Albrecht, 2012).

A ligação do SCN com outras estruturas cerebrais mostra que os seus eferentes contatam em muitas regiões do cérebro (Dardente et al., 2007; Dibner et al., 2010), incluindo núcleos do tálamo e hipotálamo, amígdala (AMY), bulbo olfativo (OB) e cerebelo (Dibner et al., 2010) (Figura 4).

A habeluna (HB) tem sido proposta como oscilador semiautónomo pois recebe projeções não luminosas diretamente da retina e em conjunto com o núcleo accumbens (NAc) projeta para a glândula pineal, para o núcleo da rafe, para a substância *nigra*, e área tegmental ventral (VTA). A HB pode ser importante para a integração de sinais e para regular o comportamento diurno (Dibner et al., 2010; Zhao & Rusak, 2005). O OB é um oscilador circadiano central que regula o nível de sensibilidade dos neurónios olfativos (Dibner et al., 2010; Guilding & Piggins, 2007). Este oscilador funciona mesmo na ausência de todos os outros tecidos, ou seja, é autossustentado. Por outro lado, outros osciladores semiautónomos, como o núcleo arcuado, conseguem manter as oscilações mas são incapazes de se sincronizarem sem o auxílio de um oscilador central. Contrariamente, os osciladores designados de “escravos”, como por

exemplo, o hipocampo, a glândula pineal e a hipófise, têm a capacidade de oscilar mas sob controle de osciladores centrais ou intermediários (Figura 4) (Guilding & Piggins, 2007).

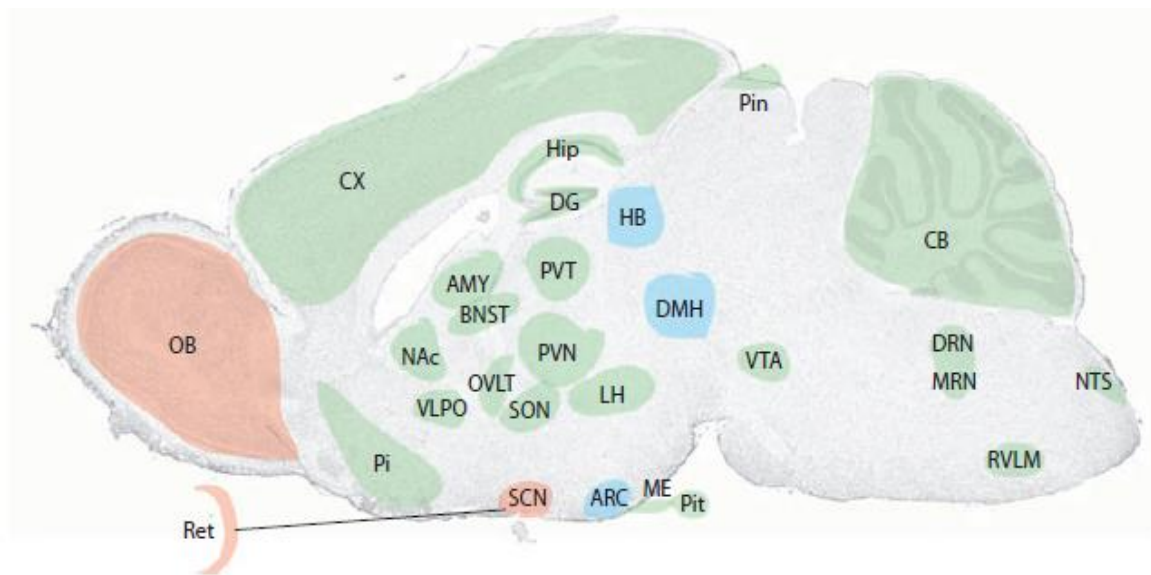


Figura 4. Osciladores circadianos no cérebro de mamíferos.

Os osciladores circadianos autossustentados estão representados a vermelho, os osciladores semiautônomos a azul, e osciladores “escravos” ou independentes a verde. AMY, a amígdala, ARC, núcleo arqueado; BNST, núcleo da estria terminal; CB, cerebelo; CX, córtex; DG, giro denteado; DMH, hipotálamo dorsomedial; DRN, do núcleo dorsal da rafe, HB, habenula; Hip, hipocampo; LH, hipotálamo lateral; ME, eminência mediana; MRN, núcleo mediano da rafe; NAC, núcleo accumbens; NTS, núcleo do trato solitário, OB, bulbo olfatório; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal; Pi, córtex piriforme; Pin, glândula pineal, Pit, glândula pituitária, PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; PVT, núcleo paraventricular do tálamo; Ret, retina; RVLM, medula ventrolateral rostral; SCN, núcleo supraquiasmático; SON, núcleo supraóptico; VLPO, área pré-ótica ventrolateral; VTA, área tegmental ventral (Dibner et al., 2010).

A informação circadiana é transmitida através de hormonas e metabolitos, contudo também é feita através do controlo nervoso direto, envolvendo o sistema nervoso autónomo e o sistema neuroendócrino (Dibner et al., 2010). A melatonina (Mel) é uma hormona sintetizada na glândula pineal, que é depois libertada no líquido cefalorraquidiano e na circulação. A Mel é, portanto, um produto endócrino eferente do SCN, que fornece uma mensagem circadiana para o organismo por meio da circulação geral. A síntese e libertação de Mel pela glândula pineal são controladas pelo SCN e inibidas pela exposição à luz, sendo considerada uma hormona noturna (Figura 5) (Pevet & Challet, 2011).

A glândula adrenal produz glucocorticoides ritmicamente, principalmente no início do período de maior atividade, ou seja, ao amanhecer e ao anoitecer em espécies diurnas e noturnas, respetivamente. O SCN influencia os relógios adrenais sinápticamente via sistema nervoso autónomo e humoralmente através da sinalização ACTH (hormona adrenocorticotrófica)

(Figura 5). Ambas as entradas são relativamente indiretas com várias etapas intermediárias que podem ser moduladas (Menaker, Murphy, & Sellix, 2013).

Tanto a Mel como os corticoides distribuem sinais temporais gerados pelo SCN para tecidos alvo que expressam os recetores de melatonina e de glucocorticoides, respetivamente (Pevet & Challet, 2011).

Como seria de esperar, o sistema nervoso autónomo influencia a ritmicidade de outros órgãos periféricos, tais como como o fígado, o tecido adiposo, pâncreas, e o trato gastrointestinal (Figura 5) (Menaker et al., 2013).

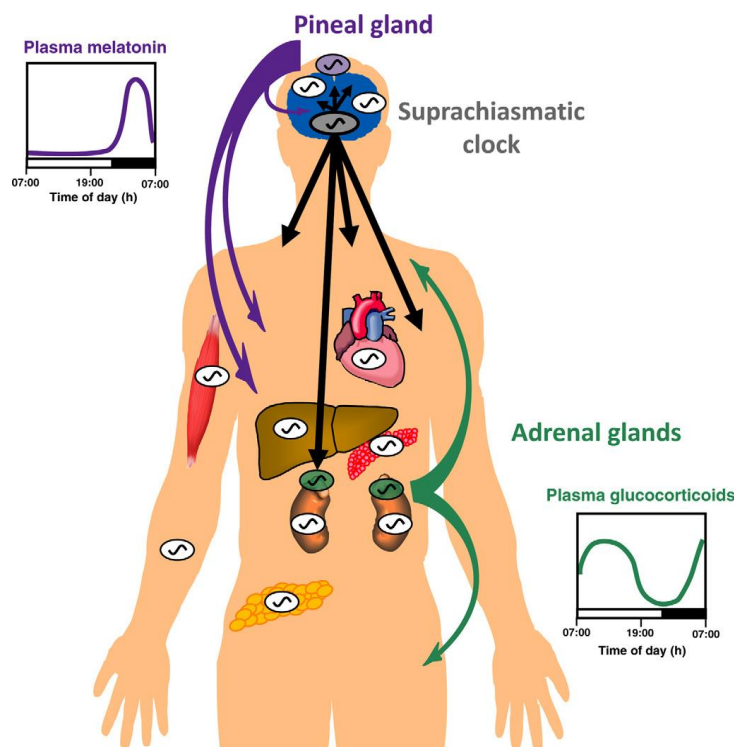


Figura 5. Oscilador circadiano central (relógio supraquiasmático) e glândulas pineal e adrenal.

Outros relógios circadianos são encontrados no cérebro e nos tecidos periféricos. As setas pretas indicam sinais transmitidos por fibras nervosas a partir do núcleo supraquiasmático (SCN) para alvos periféricos. A melatonina (cor roxa) é sintetizada pela glândula pineal e é secretada exclusivamente durante a noite, sob o controlo do relógio central. Os glucocorticoides (cor verde) são sintetizados pelas glândulas supra-renais e secretados principalmente no início de atividade (Pevet & Challet, 2011).

1.1.3. Osciladores circadianos periféricos

Os genes do relógio circadiano foram identificados, em mamíferos, pela primeira vez no final da década de 90 (King et al., 1997; Shearman, Zylka, Weaver, Kolakowski Jr, & Reppert, 1997; Sun et al., 1997), que foram detetados não só no SCN, mas também em vários tecidos periféricos (Saini, Suter, Liani, Gos, & Schibler, 2011), tais como o fígado, pâncreas, músculo esquelético, intestino, e tecido adiposo (Dibner et al., 2010; Rana & Mahmood, 2010). O SCN sincroniza os relógios periféricos através de vias indiretas e diretas para que o ritmo seja coerente e sincronizado ao nível do organismo (Albrecht, 2012; Rana & Mahmood, 2010).

A descoberta de que o SCN é o estimulador circadiano dominante que controla muitos aspetos ao nível da fisiologia do organismo (por exemplo, atividade, temperatura corporal, sono) sugeriu uma organização hierárquica mais simples em que os sinais do SCN controlam diretamente os osciladores periféricos (Figura 6) (Menaker et al., 2013).

A sincronização indireta é alcançada por meio do controlo de ciclos de atividade, como por exemplo, o tempo de alimentação; os ciclos da alimentação (ou jejum) são *zeitgebers* dominantes para muitos, se não para a maioria dos relógios periféricos. Os ciclos de atividade também influenciam os ritmos de temperatura do corpo, que por sua vez podem participar na sincronização dos relógios periféricos. A sincronização direta utiliza hormonas secretadas e sinais neuronais para os relógios periféricos através do sistema nervoso periférico (Rana & Mahmood, 2010). Em suma, os sinais mais diretos que o SCN emprega são considerados as saídas neuronais e humorais, para sincronizar os osciladores periféricos (Figura 6) (Dibner et al., 2010).

Outras estruturas semelhantes ao SCN podem ter a capacidade de receber os sinais de outras regiões centrais extra-SCN (Figura 6). Apesar da sua existência, sabe-se muito pouco sobre estes osciladores independentes do SCN (Menaker et al., 2013; Pendergast, Oda, Niswender, & Yamazaki, 2012). Um exemplo é o caso do oscilador sincronizador da alimentação (FEO - *food entrainable oscillator*), cuja influência sobre as fases de alguns osciladores periféricos supera a do SCN. Outro exemplo é o oscilador circadiano sensível da metanfetamina (MASCO - *methamphetamine sensitive circadian oscillator*), que na ausência do SCN assume muitas das suas funções. Nem a localização anatómica, nem os mecanismos moleculares destes osciladores extra-SCN são conhecidos. Pode-se assumir que estão localizados centralmente, uma vez que influenciam o comportamento de grande parte dos órgãos periféricos (Menaker et al., 2013). Sabe-se, no entanto que, em ambos os casos, a sua oscilação não depende da atividade dos genes *clock* dos osciladores canónicos (Menaker et al., 2013; Mohawk & Menaker, 2009).

Há muitas semelhanças importantes entre o MASCO e o FEO. Ambos são capazes de alterar o comportamento locomotor circadiano em animais com SCN intato, também podem induzir

ritmos circadianos de comportamento locomotor em animais com lesões no SCN. FEO e MASCO podem ser o mesmo oscilador, ou seja, um único oscilador extra-SCN (Menaker et al., 2013; Mohawk & Menaker, 2009). Várias regiões cerebrais extra-SCN têm sido identificadas como osciladores circadianos independentes, mas ainda não se demonstrou que algum destes funcione como um estimulador, conduzindo a possibilidade de que outros estimuladores centrais continuem por descobrir (Menaker et al., 2013).

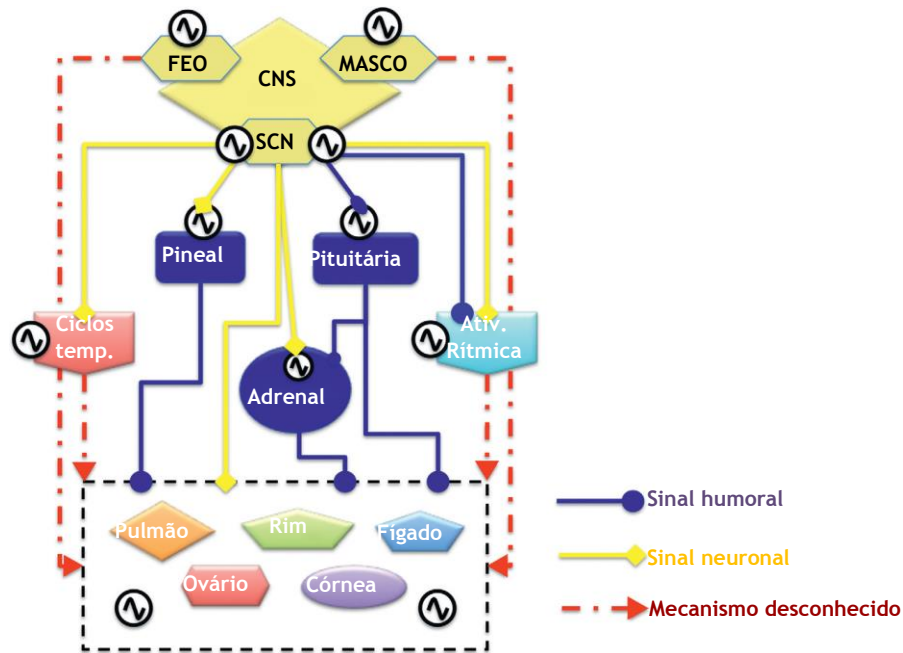


Figura 6. Controlo central dos osciladores periféricos.

O núcleo supraquiasmático (SCN) sincroniza os osciladores periféricos no ciclo dia/noite, dirige oscilações a nível tecidual e regula a organização circadiana interna. O SCN coordena os osciladores periféricos através de sinais: (1) neuronal (linha amarela) e (2) humoral (linha azul). Sinais independentes do SCN direcionam-se para outros osciladores, incluindo as glândulas pineal, adrenal e pituitária. Os ritmos circadianos da melatonina pineal e dos esteroides adrenais arrastam e sincronizam vários osciladores periféricos. Através das vias neuroendócrinas, o SCN direciona os ritmos de secreção hormonal na pituitária. O SCN regula o tempo de atividade (tanto a via humoral como a saída neuronal) e a temperatura do corpo que independentemente arrasta e sincroniza os relógios periféricos. FEO e MASCO sincronizam os osciladores periféricos, apesar dos mecanismos serem desconhecidos (linha tracejada vermelha). Adaptada de Menaker et al., 2013.

1.2. Mecanismo molecular circadiano

Os relógios circadianos são osciladores moleculares autossustentáveis, robustos e reguláveis. Os núcleos de ambos os relógios, centrais e periféricos, têm dois circuitos de feedback de transcrição/pós-translacionais interligados (Figura 7) (Yang, 2010).

A nível molecular, o relógio circadiano dos mamíferos é controlado por um circuito de feedback negativo de transcrição/tradução, ou seja, as proteínas relógio do núcleo afetam a própria transcrição, bem como os genes *clock* (Kondratov, 2007; Richards & Gumz, 2012).

Os genes que codificam os mecanismos do relógio nuclear incluem o CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*), BMAL1 (*brain and muscle-Arnt-like 1*), Per1-3 (Período 1-3), Cry1-2 (Criptocromo 1-2), Rev-erba ou NR1D1 (receptor nuclear) e ROR α (receptor órfão relacionados com retinoide alfa) (Froy, 2010; Paschos, Baggs, Hogenesch, & FitzGerald, 2010). No circuito de feedback negativo, os heterodímeros BMAL1/CLOCK ativam a transcrição dos genes Per1, Per2 e Per3 e genes Cry1 e Cry2, que reconhecem elementos E-box *cis* nos seus promotores (Yang, 2010). Tanto o CLOCK como o BMAL1 são dois fatores de transcrição básicos helix-loop-helix-PAS que ativam os elementos E-box. O BMAL1 também pode dimerizar com outros homólogos de CLOCK, tais como proteína 2 de domínio PAS neuronal (NPAS2), para ativar a transcrição e sustentar a ritmicidade (Froy, 2010). Os fatores de transcrição básicos BMAL1, CLOCK e NPAS2 formam os heterodímeros CLOCK:BMAL1 e NPAS2:BMAL1 e dirigem a transcrição através de E-boxes (Paschos et al., 2010). As proteínas Per e Cry traduzidas heterodimerizam e, quando alcançam uma determinada concentração, movimentam-se posteriormente para o núcleo e inibem os heterodímeros CLOCK/NPAS2:BMAL1 (Paschos et al., 2010). Após a transcrição e tradução, estas proteínas acumulam-se gradualmente no citoplasma e então várias isoformas da caseína quinase I (CKI), incluindo a delta e a épsilon, fosforilam o Per e o Cry citoplasmático, regulando a sua estabilidade de uma forma complexa (Paschos et al., 2010; Toh, 2008). Os heterodímeros Per e Cry são progressivamente degradados, permitindo que o circuito recomece de novo, conduzindo a um ciclo de expressão de gene que leva cerca de vinte e quatro horas para completar (Paschos et al., 2010). RORs agem como ativadores de transcrição, contrariamente os Rev-Erbs são repressores (Toh, 2008). Como tal, o Rev-erba reprime a transcrição do BMAL1 através da ligação a um elemento de ROR no promotor de BMAL1. Por outro lado, ROR α compete com Rev-Erba para a mesma ligação e ativa a transcrição (Paschos et al., 2010). A interação entre os circuitos de feedback negativo e positivo adiciona mais complexidade à via do ritmo circadiano (Paschos et al., 2010; Toh, 2008).

Contudo, os elementos positivos e negativos desta via funcionam para coordenar a transcrição e assim permitir ciclos de vinte e quatro horas na expressão génica. Os genes do relógio circadiano são fundamentais para o funcionamento normal do mecanismo oscilatório circadiano (Kondratov, 2007).

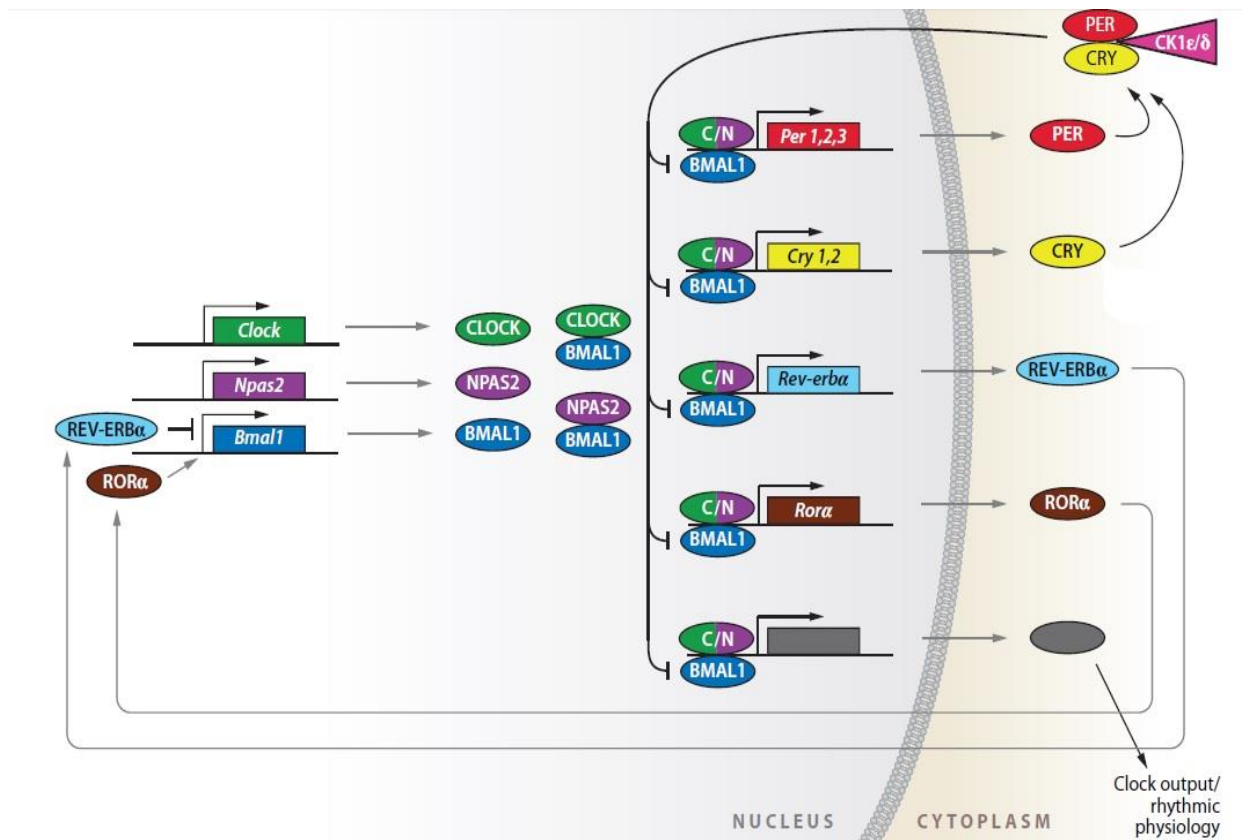


Figura 7. Mecanismo molecular nos mamíferos.

A geração dos ritmos circadianos na expressão dos genes baseia-se numa rede complexa de feedbacks de transcrição-tradução. BMAL1 forma heterodímeros com o CLOCK e o seu parálogo NPAS2. Estes heterodímeros de ligação de E-box ativam a transcrição de genes tais como *Per1-3*, *Cry1* e *2*, *Rev-erba* e *Rora*. As proteínas *Per* e *Cry* heterodimerizam e deslocam-se para o núcleo onde interagem com os heterodímeros BMAL1: CLOCK/NPAS2 para inibir a sua transcrição. Posteriormente, o complexo *Per* e *Cry* degrada-se e os heterodímeros BMAL1: CLOCK/NPAS2 iniciam um novo ciclo de transcrição. REV-ERB α inibe, enquanto ROR α ativa a transcrição de *Bmal1*. A modificação pós-tradução e a degradação de proteínas relógio são passos cruciais no ciclo circadiano. A fosforilação do heterodímero *Per:Cry* por CK1 ϵ/δ permite que o circuito recomece de novo. Adaptada de Paschos et al., 2010.

1.3. Efeitos das hormonas sexuais

Está documentado que o SCN controla a secreção das hormonas sexuais (Karatsoreos & Silver, 2007). Para além disso, os efeitos das hormonas sexuais sobre a ritmicidade circadiana estão bem definidos, mas falta compreender como é que o SCN integra esses estímulos hormonais (Mong et al., 2011). O facto das hormonas esteroides sexuais controlarem a estrutura e função do SCN pode ter implicações importantes para a regulação do comportamento e fisiologia, porque os níveis de hormonas sofrem alterações ao longo do dia, ao longo da vida e, em algumas espécies, sazonalmente (Karatsoreos, Butler, LeSauter, & Silver, 2011).

Os esteroides sexuais no SCN parecem agir através de diferentes mecanismos em fêmeas e machos (Figura 8) (Mong et al., 2011). Trabalhos anteriores sugeriram que muitos dos efeitos circadianos do estradiol e da testosterona ocorreriam fora do SCN, quer por vias aferentes ou eferentes. Esta suposição foi apoiada, em parte, pelo facto dos recetores de estrogénios (ERs) serem escassos no SCN. Em contraste, verificou-se que os recetores de androgénios (ARs) são expressos na região do núcleo do SCN (Iwahana, Karatsoreos, Shibata, & Silver, 2008). Os recetores de androgénios foram descritos no SCN de numerosas espécies, incluído ratinho, rato e humanos (Karatsoreos, Bhagat, et al., 2011).

Visto que, o SCN expressa pouco mRNA ou proteína do ER, a ação dos esteroides em fêmeas tem-se centrado principalmente em locais extra-SCN, que são ricos em ERs e que se projetam para o SCN. Como os ARs são predominantes no SCN, estudos confirmaram que os androgénios agem diretamente no SCN para modular o ritmo circadiano nos ratos (Mong et al., 2011).

A gonadectomia (GDX) de ratinhos machos altera vários parâmetros da ritmicidade circadiana, dependente do SCN. É importante salientar que a reposição androgénica, nos machos gonadectomizados, restaura os níveis hormonais verificados na pré-castração e reestabelece os ritmos. Uma vez que, as hormonas esteroides sexuais controlam a estrutura e a função do SCN podem ter implicações importantes na regulação do comportamento e da fisiologia, por se alterarem ao longo do dia, ao longo da vida e, em algumas espécies, sazonalmente (Karatsoreos, Butler, et al., 2011).

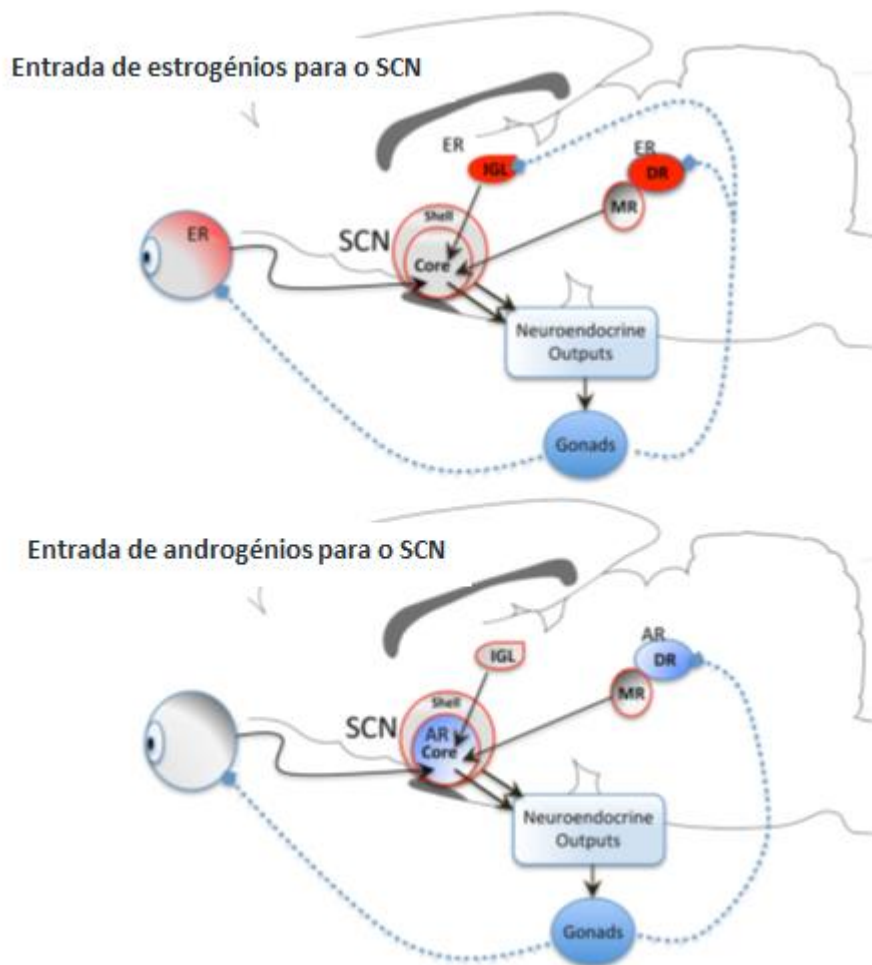


Figura 8. Diferenças entre o local de ação de hormonas estrogénicas e androgénicas no núcleo supraquiasmático (SCN).

Os núcleos ricos em recetores de estrogénios (vermelho) incluindo a retina, folheto intergeniculado (IGL) e a dorsal da rafe (DR), via o mediano da rafe (MR), projetam para o SCN a informação hormonal, visto que este oscilador não contém recetores de estrogénios. Contudo, contrariamente aos recetores de estrogénios, os recetores de androgénios são densamente localizados no SCN. A dorsal de rafe como contém recetores de androgénios também projeta para o SCN. O SCN regula a temporização/sincronização circadiana da fisiologia e do comportamento enviando informações para os sistemas neuroendócrinos (Mong et al., 2011).

2. Plexo coroideu

2.1. Organização estrutural

O CNS (sistema nervoso central) forma-se a partir de um tubo oco que pode ser bastante reduzido em algumas áreas e expandido noutras. O interior deste tubo é constituído por uma única camada de células epiteliais designadas por células endimárias (Tate, Kennedy, & Seeley, 2003). O encéfalo humano possui quatro cavidades ventriculares, os dois ventrículos laterais que têm uma localização central em cada um dos hemisférios cerebrais, e o terceiro e quarto ventrículos, uma localização inferior à dos ventrículos laterais (Redzic & Segal, 2004).

Os ventrículos laterais estão separados por finos septos que se dispõem na linha media logo abaixo do corpo caloso e habitualmente fundidos um com o outro constituem o septo pelúcido (parte transparente) (Tate et al., 2003). Cada ventrículo lateral conecta com o 3º ventrículo, através de um estrutura denominada de *Foramen* interventricular ou de *Monro* (Standring, 2010; Tate et al., 2003). O 3º ventrículo é uma cavidade mediana mais pequena, localizada no centro do diencéfalo, entre os dois tálamos. A comunicação entre o 3º e 4º ventrículo é realizada por um canal estreito, denominado aqueduto de *Sylvius* ou mesencefálico (Standring, 2010). O 4º ventrículo prolonga-se inferiormente e é contínuo com o canal central da medula espinal, que se estende em quase todo o comprimento da medula espinal (Figura 9) (Tate et al., 2003).

Ao longo de cada ventrículo cerebral aloja-se um plexo coroideu (CP) na sua superfície interna (Emerich, Skinner, Borlongan, Vasconcellos, & Thanos, 2005; Tate et al., 2003). Os CPs estão localizados em todo o sistema ventricular do cérebro e formam extensões de células epiteliais em toda a superfície ventricular (Figura 9) (Emerich et al., 2005). Este tecido flutua no líquido cefalorraquidiano (CSF) e está ligado ao epêndima ventricular por uma haste fina (Redzic & Segal, 2004).

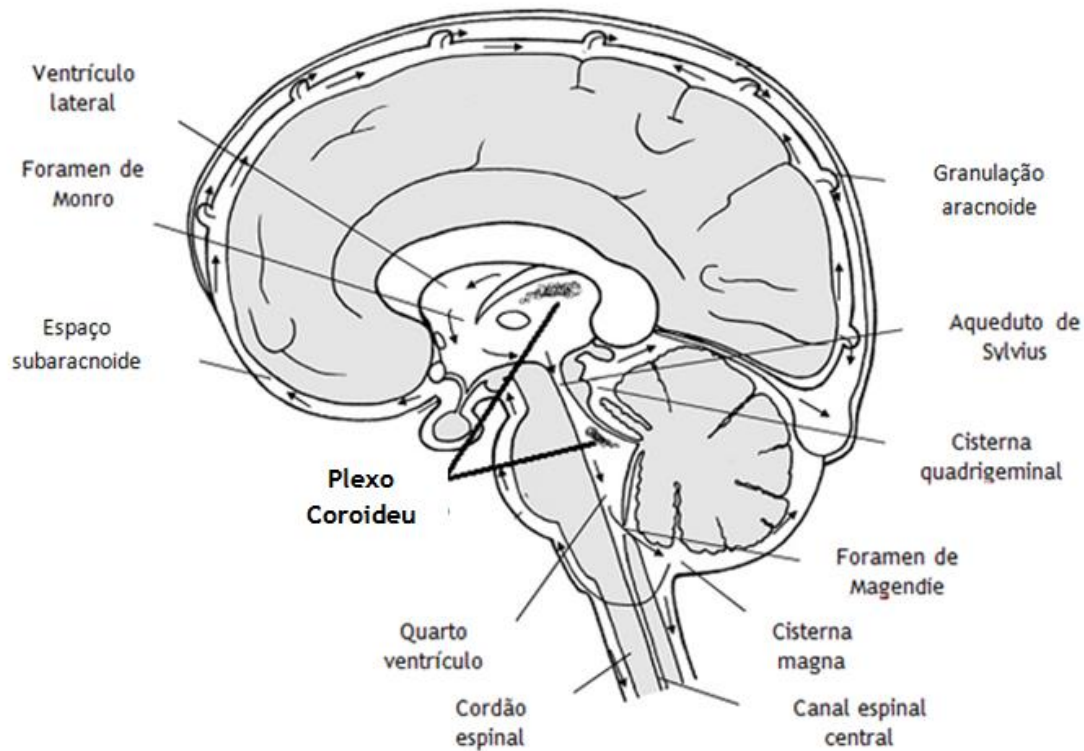


Figura 9. Localização dos plexos coroídeos (CPs) e a distribuição de líquido cefalorraquidiano (CSF) no sistema nervoso central humano.

O CSF é identificado pela área cinzenta, e as setas indicam o sentido de circulação e os locais de absorção do CSF (Orešković & Klarica, 2010).

Os CPs são estruturas ramificadas, altamente vascularizadas, com uma camada de células epiteliais secretoras (Damkier, Brown, & Praetorius, 2010) unidas por tecido conjuntivo, que através de invaginações originam numerosas vilosidades que se projetam ao longo de todo o sistema ventricular (Figura 10). Entre as células epiteliais do CP existem “tight junctions” (TJs) que previnem a difusão passiva de moléculas para o CSF (Zappaterra & Lehtinen, 2012). A membrana apical das células epiteliais está em contato com o CSF, e a membrana basolateral localiza-se sob a lâmina basal e mais internamente sob o estroma de tecido conjuntivo composto por uma rede de fibras de colagénio que incorpora grandes capilares fenestrados e as células leptomeningiais especializadas (Damkier et al., 2010; Thouvenot et al., 2006).

Os CPs presentes nos ventrículos laterais apresentam uma estrutura característica em forma de folha, enquanto que no 3º e 4º ventrículo, este tecido é caracterizado estruturalmente por ser bastante lobulado e possuir numerosas vilosidades (Skipor & Thiery, 2008). No entanto, ambos os tipos estruturais consistem numa única camada contínua de células epiteliais (Figura 10) (Thouvenot et al., 2006). O plexo possui no seu epêndima capilares fenestrados e várias células associadas (macrófagos, fibroblastos e células dendríticas) (Emerich et al., 2005).

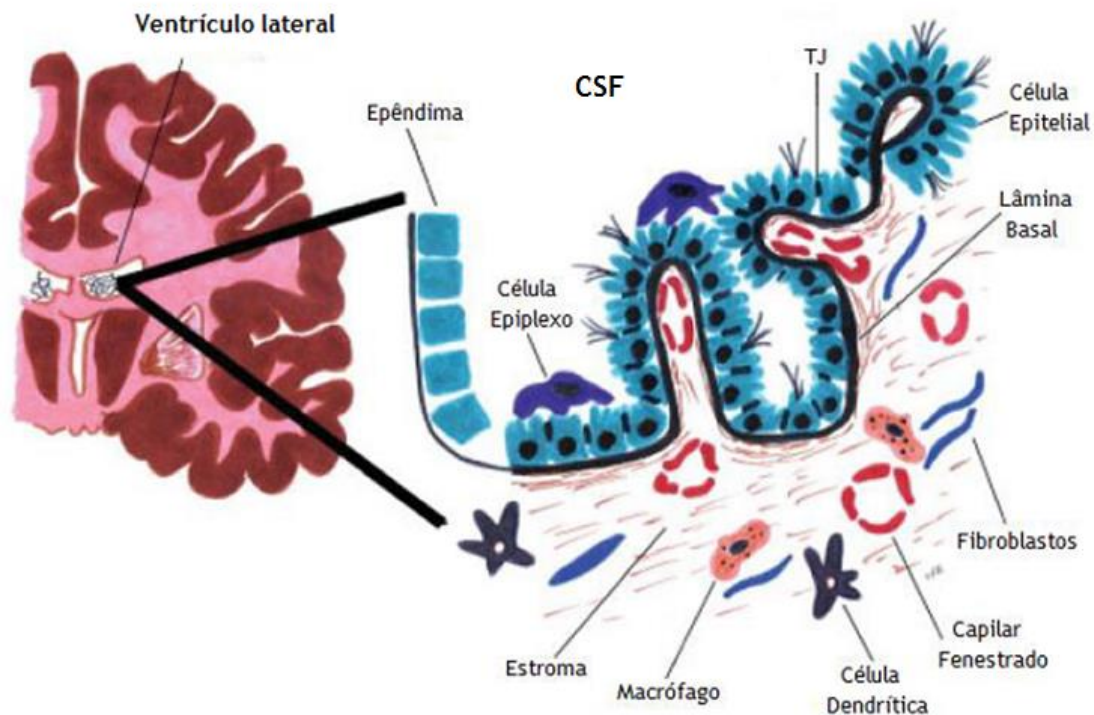


Figura 10. Morfologia do plexo coroideu (CP) do ventrículo lateral cerebral.

As células epiteliais do CP são unidas por “tight-junctions” (TJs) criando uma barreira física à passagem de íões e moléculas do sangue para o CSF. Estas células possuem microvilosidades e pequenos tufos de cílios na sua face apical e invaginações na membrana basolateral. Esta membrana apresenta uma superfície lisa, permitindo um contato íntimo com os capilares, que preenche o interior dos ventrículos. Este tecido possui no seu epêndima capilares fenestrados e várias células associadas como por exemplo, macrófagos e células dendríticas. Adaptada de Emerich et al., 2005.

As análises de microscopia eletrónica mostram que as células epiteliais coroides expõem superfícies celulares altamente diferenciadas. A superfície apical é caracterizada pelas numerosas microvilosidades (Redzic & Segal, 2004; Skipor & Thiery, 2008). Estas microvilosidades aumentam a área da superfície de contato entre o CSF e a face luminal das células do CP. A superfície basal possui um aspeto liso e uma grande área de superfície, sendo responsável pelas trocas entre o sangue e o CP (Skipor & Thiery, 2008).

2.2. Funções

Os CPs estão envolvidos em muitas funções devido à sua arquitetura e localização na interface entre o sangue e os compartimentos onde circula o CSF. As principais funções deste tecido são: produção e secreção de CSF; síntese de moléculas; transporte de nutrientes do sangue para o CSF; reabsorção e eliminação de produtos tóxicos; participação na imunovigilância do cérebro (Emerich et al., 2005). Além disso, os CPs desempenham um papel essencial na depuração de catabolitos neurotransmissores e produtos celulares do CSF. A localização dos CPs facilita também a distribuição de moléculas para o cérebro, tanto ao nível local como global, através do próprio fluxo do CSF. Alguns nutrientes como vitamina C, ácido fólico e vitamina B12 são secretados no CSF por mecanismos específicos de transporte (Thouvenot et al., 2006).

2.2.1. Produção e secreção de Líquido Cefalorraquidiano

O tecido conjuntivo do epitélio coroide fornece uma base anatômica à barreira sangue-CSF que constitui a barreira sangue-cérebro ao nível do CP. Este é responsável pela produção do CSF, um líquido claro, ligeiramente viscoso e com pouca quantidade de células e proteínas. Tem um pH baixo e uma concentração de glucose, proteínas, potássio, cálcio, bicarbonato, fosfato e aminoácidos mais baixa relativamente ao plasma (Emerich et al., 2005; Redzic & Segal, 2004; Skipor & Thiery, 2008). Os níveis de folato são duas a três vezes mais elevados no CSF do que no plasma e a quantidade de transtirretina (TTR) corresponde a 25% do volume total deste fluido (Emerich et al., 2005). O proteoma do CSF consiste em centenas de proteínas da matriz extracelular, reguladores da pressão osmótica, transportadores de iões, proteínas de ligação a hormonas, reguladores do metabolismo dos lípidos, várias enzimas e seus reguladores (Zappaterra & Lehtinen, 2012). A composição do CSF é diferente da composição do ultrafiltrado do plasma, mas bastante similar ao fluido intersticial do cérebro (Skipor & Thiery, 2008).

O CSF pode promover o desenvolvimento e crescimento de células estaminais neuronais. Embora os fatores responsáveis pelos efeitos favoráveis do CSF embrionário estejam ainda por descobrir. Contudo, já são conhecidos alguns desses fatores, que são ativos no CSF durante o desenvolvimento embrionário do cérebro, incluindo os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs), “sonic hedgehog” (Shh), o ácido retinoico (RA), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), e outros (Zappaterra & Lehtinen, 2012).

O CSF desloca-se a partir dos locais de formação para os locais de reabsorção, com um fluxo unidirecional nas cavidades ventriculares e com um fluxo multidirecional nos espaços

aracnoideus (Skipor & Thiery, 2008; Zappaterra & Lehtinen, 2012). Este fluido flui dos ventrículos laterais para o 3º ventrículo, através do *Foramen de Monro*, e deste para o 4º ventrículo através do Aqueduto de *Sylvius*. Depois o CSF passa para o espaço subaracnoideu através dos *Foramens Luschka e Magendie* (Skipor & Thiery, 2008).

O fluxo do CSF é impulsionado por três forças principais: pulsações arteriais do CP; gradiente de pressão hidrostática; movimento ciliar das células ependimárias dos ventrículos (Zappaterra & Lehtinen, 2012).

O CP é dotado de uma distribuição única dos seus transportadores e canais iónicos entre a membrana apical e a membrana basolateral das células epiteliais (Redzic & Segal, 2004). As células epiteliais coroides renovam o CSF, movendo primeiramente os iões Na^+ , Cl^- e HCO_3^- do sangue para os ventrículos, para se gerar um gradiente osmótico que impulsiona a secreção de H_2O (Emerich et al., 2005). A bomba sódio-potássio ATPase, localizada apenas na face apical das células desempenha um papel na produção de CSF, através da hidrólise do ATP, que fornece a energia necessária para criar o gradiente de iões Na^+ que direta ou indiretamente dirige vários processos de transporte (Redzic & Segal, 2004).

2.2.2. Síntese proteica

Para além da secreção de CSF, as células epiteliais do CP sintetizam um grande número de péptidos bioativos, fatores de crescimento e citocinas (Tabela 1), que são responsáveis pelo desenvolvimento do CNS e pela manutenção da sua homeostasia (Redzic, Preston, Duncan, Chodobski, & Szmydynger-Chodobska, 2005). Muitos polipeptídeos e proteínas com localização extracelular conhecida são também sintetizados pelas células epiteliais coroides e libertados por uma via secretora vesicular. Como é o caso da TTR, o maior transportador da hormona tiroide. No cérebro, a TTR é sintetizada pelo epitélio do CP e representa mais de 20% das novas proteínas sintetizadas e 50% das novas proteínas secretadas por este órgão (Redzic & Segal, 2004).

O epitélio do CP também secreta um número de factores de crescimento importantes para o crescimento da célula, orientação dos axónios e migração dos neurónios. Por exemplo, os CPs são a principal fonte de fatores de crescimento semelhante à insulina, como por exemplo, IGF-II (II) no CNS (Redzic & Segal, 2004; Zappaterra & Lehtinen, 2012). Para além da produção dos neuropéptidos, o CP expressa os recetores específicos destes, sugerindo que, desenvolve ações autócrinas e parácrinas sobre as suas células epiteliais. Contudo, o CP pode ainda promover efeitos do tipo endócrino, uma vez que os neuropéptidos libertados para o CSF podem causar efeitos sobre células alvo no encéfalo (Chodobski & Szmydynger-Chodobska, 2001; Emerich et al., 2005).

Tabela 1. Alguns polipéptidos e proteínas sintetizadas no plexo coroideu.
Adaptada de Chodobski & Szmydynger-Chodobska, 2001; Redzic et al., 2005.

Péptidos bioativos	Fatores de crescimento	Citocinas
Acido retinoico	Factor de crescimento transformador B	TNF α
Angiotensina II	Fator de crescimento de fibroblastos básico/2	Interleucina 1
Insulina	Factor neurotrófico derivado das células do cérebro	Interleucina 6
Péptido natriurético arterial	Factor de crescimento derivado da insulina	Interleucina 1B
Prolactina	Factor de crescimento vascular endotelial	
Transtirretina	Fator de crescimento de hepatócitos	
Vasopressina		

2.2.3. Função imunológica

O CP também realiza funções neuroimunológicas, uma vez que possui células linfoides induzíveis que, após a administração sistémica de lipossacarídeos ou de interleucina 6 (IL-6), levam rapidamente à indução de interleucina 1B (IL-1B) e factor de necrose tumoral α (TNF α) (Emerich et al., 2005). Como está alojado no sistema ventricular cerebral, o CP tem uma posição ideal para monitorizar a presença de compostos potencialmente tóxicos no CSF, servindo assim como primeira linha de defesa para o parênquima cerebral (Emerich et al., 2005).

O CP possui altas concentrações de glutathiona, cisteína e metalotioneínas, que têm a capacidade de sequestrar agentes tóxicos em circulação no CSF; enzimas de proteção contra radicais livres e stress oxidativo; sistemas de transporte de iões orgânicos e proteínas resistentes a várias drogas que permitem a exportação de compostos tóxicos do CSF (Gao & Meier, 2001). Um vasto conjunto de enzimas envolvidas no metabolismo de drogas (de fase I, II e III), é também produzido pelo CP, sendo responsáveis pela desintoxicação do CNS e

proteção de agressões neurotóxicas agudas (Emerich et al., 2005; Gherzi-Egea & Strazielle, 2001). As reações de oxidação-redução, que ocorrem durante fase I, podem levar à formação de metabólitos reativos, como epóxidos e radicais livres de oxigênio que são inativados, por enzimas como a epóxido hidrólase e pelas enzimas de fase II como as glutatona peroxidase, redutase e transferase e o superperóxido dismutase, que desempenham um papel antioxidante na proteção do encéfalo (Gherzi-Egea & Strazielle, 2001).

Recentemente tem sido demonstrado que o CP possui fatores neurogênicos e neuroprotetivos estimulando efeitos terapêuticos. Uma lesão no CP pode por sua vez alterar a composição e a secreção do CSF, levando a um aumento do número de leucócitos no CSF e no cérebro, uma diminuição da depuração de toxinas e portanto uma diminuição do fornecimento de nutrientes e fatores de crescimento no cérebro. A recuperação da lesão cerebral envolve a correção gradual desses mecanismos, a fim de repor a homeostasia do sistema CP-CSF promovendo a neuroregeneração e neuroproteção (Zappaterra & Lehtinen, 2012).

2.3. O plexo coroideu no envelhecimento

O CP sofre diversas modificações anatômicas com o aumento da idade. A atrofia do epitélio do CP é uma das alterações mais relevantes (Emerich et al., 2005; Redzic & Segal, 2004). Com o envelhecimento, o CP não consegue manter a produção normal de energia, alterando as suas funções (Emerich et al., 2005). Para além disso, a altura das células epiteliais coroides diminui em cerca de 10%, nos humanos, e cerca de 15%, nos ratos. A membrana basal epitelial fica mais espessa, assim como o estroma, que contém fibras de colagénio, corpos hialinos e calcificações (Emerich et al., 2005; Serot, Béné, & Faure, 2003). As paredes das artérias também aumentam a sua espessura e as fibras elásticas começam a fragmentar-se (Serot et al. 2003). Também com o envelhecimento, um maior número de células epiteliais torna-se deficiente em citocromo-C oxigenase levando a alterações da cadeia respiratória que por sua vez conduzem a uma diminuição da quantidade de ATP produzido (Emerich et al., 2005; Serot et al., 2003). Ao nível metabólico, a síntese de enzimas essenciais para manter o metabolismo da respiração anaeróbia e fosforilação oxidativa diminui drasticamente, onde por exemplo as enzimas lactato desidrogenase e a succinato desidrogenase sofrem uma diminuição de 9% e 26% respectivamente. Todas estas modificações anatômicas e enzimáticas têm como consequência a diminuição da produção e da renovação de CSF. A distribuição de substâncias nutritivas para o encéfalo e a remoção dos compostos tóxicos do metabolismo cerebral, pode assim, tornar-se inadequada, comprometendo a correta atividade do CNS (Emerich et al., 2005).

II. Objetivo

Alguns genes associados à regulação dos ritmos circadianos foram identificados no CP de ratos fêmeas e machos num estudo de *microarrays* de cDNA (Quintela et al., 2013). O mesmo estudo mostrou que alguns destes genes são expressos diferencialmente entre animais gonadectomizados e sham. A partir destes resultados delineou-se este trabalho, que consiste em provar que o CP é um tecido com funções de relógio circadiano e qual a influência das hormonas sexuais nesta maquinaria relógio.

Assim pretendeu-se confirmar a presença dos genes circadianos no CP de rato, nomeadamente BMAL1, CLOCK, Cry1, Cry2, Per 1, Per2 e Per3, por PCR convencional e a expressão das proteínas codificadas por alguns destes genes, particularmente BMAL1, CLOCK, Cry1, Per1 e Per2 por imunohistoquímica em cortes de CP de rato, por imunocitoquímica em culturas primárias de células de CP de rato e por Western blot em extratos proteicos de CP de rato.

Para além disso pretendeu-se analisar a expressão diferencial destes genes relógio por PCR em tempo real comparando CPs de ratos fêmea/macho gonadectomizados com ratos sham. A expressão dos genes *clock* no ritmo circadiano em diferentes tempos de *zeitgebers* foi analisada por PCR em tempo real.

III. Metodologia

1. Animais

No presente trabalho foram usados ratos (*Rattus Norvegicus*) da estirpe Wistar recém-nascidos (com 3 a 5 dias) para culturas primárias de células epiteliais do plexo coroideu (CPEC) e ratos com aproximadamente 2 meses. Alguns CPs destes ratos destinaram-se à extração de RNA e proteína, portanto foram congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C até se utilizar; outros destinaram-se para imunohistoquímica (IHC) e para tal foram fixados em PFA 4%/PBS 1x para posterior processamento das lâminas histológicas (Figura 11).

1.2. Animais utilizados na experiência gonadectomizados vs sham

Para esta experiência foram utilizados ratos com aproximadamente 2 meses que foram divididos em 4 grupos: 10 ratos fêmeas controlo (Sham), que foram cirurgicamente abertas sem remoção das gónadas; 10 ratos fêmeas ovariectomizadas (OVX); 10 machos controlo (Sham), 10 machos orquidectomizados (OOX) (Figura 11).

Duas semanas após a cirurgia, os animais foram decapitados, tendo sido previamente anestesiados com uma mistura injetável de cetamina (Clorketam 1000; Vetoquinol, França) e de xilazina, (Vetoxilase 20, Dopharma, Portugal) via peritonial. Posteriormente, procedeu-se à recolha de CPs que foram congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C até serem processados.

1.3. Animais utilizados no estudo do ritmo circadiano no plexo coroideu

Nesta experiência foram utilizados ratos, 24 fêmeas e 24 machos, com 2 meses de idade que foram divididos em 4 grupos, cada um constituído por 6 ratos fêmeas e 6 ratos machos que foram sacrificados de 6 horas em 6 horas. Os animais foram sujeitos a um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, em que a luz acendia às 7 horas e desligava às 19 horas. Os ratos foram decapitados em tempos de *Zeitgebers* (ZT) diferentes: ZT1, ZT7, ZT13 e ZT19, sendo esses tempos correspondentes às 8 horas, 14 horas, 20 horas e 2 horas, respetivamente (Figura 10). Os animais foram anestesiados do mesmo modo que os animais utilizados na experiência anterior. Os CPs foram recolhidos e imediatamente congelados em azoto líquido.

Todos os procedimentos de manutenção de animais de laboratório, manuseamento e amostragem obedeceram às regras da União Europeia (Diretiva 2010/63/EU).

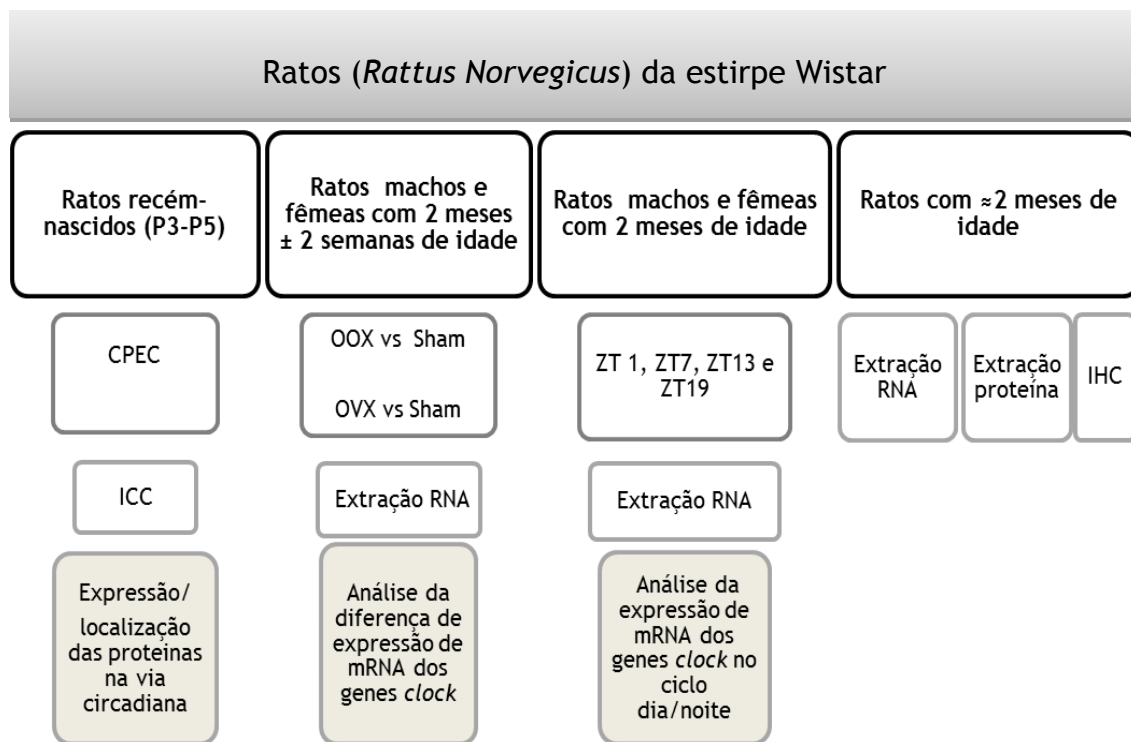


Figura 11. Modelo esquemático dos animais usados ao longo deste trabalho.

2. Extração de RNA total

As sequências de RNA devem estar puras e na forma mais íntegra possível, uma vez que estas moléculas fragmentadas originam resultados de baixa qualidade e pouco confiáveis. Neste sentido, uma das preocupações na extração de RNA é a degradação por ação de ribonucleases (RNases). A extração foi efetuada a 4°C por causa da sensibilidade térmica do RNA.

Para uma melhor eficiência, utilizou-se fortes agentes desnaturantes, tais como os fenóis e sais de guanidina que efetuam a lise celular e também, água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) que é um potente inibidor de RNases. O Trizol ou reagente TRI (Sigma-Aldrich, Inc), consiste numa solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que durante a extração, rompe as células e mantém a integridade do RNA. Para extrair o RNA total do CP de rato adicionou-se 300 µL deste reagente a cada par de CPs que estavam armazenados a -80 °C e homogeneizou-se manualmente com o auxílio de um minipilão. Após a homogeneização do tecido, incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se 60 µL de clorofórmio (VWR). Agitou-se por inversão e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 4°C a 12000g durante 15 minutos, permitindo a separação da solução em três fases: no fundo do tubo obteve-se a fase orgânica (rosa) que contém as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio, a interfase (esbranquiçada)

que contém o DNA e a fase aquosa (transparente), onde está contido o RNA. Assim, a fase de interesse foi cuidadosamente transferida para um novo microtubo e o RNA presente foi precipitado, com adição 150 μL de isopropanol (Fisher). Após uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a 4°C, 12000g durante 10 minutos e rejeitou-se o sobrenadante. Lavou-se o precipitado com etanol 75% em água DEPC a -20°C e centrifugou-se novamente a 4°C, 7500g durante 5 minutos. Para finalizar, o precipitado de RNA total foi reidratado em 10 μL de água DEPC e guardado a -80°C.

Para verificar a integridade do RNA total extraído, as amostras foram analisadas com luz ultra violeta em gel de agarose a 1% corado com *Green Safe* (NzyTech, Portugal), agente intercalador com os ácidos nucleicos. A integridade do RNA foi comprovada pela existência de 2 bandas de rRNA distintas, 18S e 28S, onde a última banda deve apresentar o dobro da intensidade da primeira. Se o RNA não estiver íntegro esta proporção de 2:1 não se verifica e poderá haver arrastamento.

De forma a determinar a qualidade e a concentração do RNAt extraído efetuaram-se leituras espectrofotométricas a 260nm (Nanophotometer™, Implén, Germany). Este equipamento fornece diretamente a concentração de RNAt ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e o rácio entre a A260/A280, que indica o grau de pureza do RNAt com base na absorvância a 260nm, comprimento de onda ao qual os ácidos nucleicos têm pico de absorção, e a 280nm, comprimento de onda ao qual as proteínas têm pico de absorção. Para determinar uma boa qualidade e pureza de RNAt, o rácio em causa deverá estar no intervalo de 1,8 a 2,1. Os rácios inferiores a 1,8 indicam contaminação com proteínas ou com fenol, e os rácios superiores a 2,1 indicam contaminação com DNA.

3. Síntese de DNA complementar

O cDNA é um DNA sintetizado a partir da transcrição reversa do mRNA, por ação da enzima transcriptase reversa, obtendo assim uma cópia exata do gene sem intrões. Para atuação desta enzima, é necessário a presença de iniciadores de síntese cuja sequência vai condicionar a especificidade do fragmento amplificado. A enzima usada para a transcrição reversa das amostras no presente trabalho foi a do Kit SMART™ MMLV Reverse Transcriptase (NzyTech, Portugal), seguindo o protocolo do fabricante. Preparam-se as misturas com volumes de reagentes para n+1 reações. Assim, para cada reação de síntese de cDNA de volume final 20 μL adicionou-se o volume adequado para 500 ng de RNAt, 2 μL de Random primers (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 2 μL de dNTP's (10 mM) e perpez-se o volume de 13 μL com água estéril livre de nucleases (Fermentas). Esta mistura foi incubada a 70°C durante 3 minutos, e de seguida arrefecida em gelo. Posteriormente, adicionou-se outra mistura com os seguintes reagentes: 4 μL de 5x Buffer, 2 μL de DTT (100 mM) e 1 μL de MMLV RT. Seguiu-se uma incubação a 37°C durante 2 minutos e posteriormente a 25°C durante 10 minutos e por último

a 37°C durante 50 minutos. Por fim, as amostras foram incubadas a 70°C durante 15 minutos e guardou-se o cDNA a -20°C.

4. PCR convencional

A expressão dos genes do ritmo circadiano nomeadamente o BMAL1, CLOCK, Cry 1, Cry 2, Per1, Per2 e Per3, no CP de rato, foi analisada através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional. Para amplificar as sequências correspondentes aos mRNAs dos genes em estudo utilizou-se a Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e seguiu-se o recomendado no protocolo do fabricante. Por cada reação adicionou-se 2.5 µL de 10x Buffer, 1.5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP's (10 mM), 0.1 µL de Taq DNA polimerase, 0.3 µL de *primer Fw* (25 µmol) e de *primer Rv* (25 µmol) respetivo a cada gene e para finalizar perfez-se com água estéril até um volume final de 24 µL. O desenho dos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) (Tabela 2) foi efetuada através do programa Primer-BLAST-NCBI-NIH. A cada reação adicionou-se 1 µL de cDNA, à exceção do negativo, ao qual se adicionou água estéril. A amplificação dos genes ocorreu num termociclador TProfessional Basic Gradient (Biometra). Primeiro, as amostras foram colocadas a 95°C durante 5 minutos, seguindo-se 40 ciclos, a 95°C durante 30 segundos para ocorrer a desnaturação da molécula de DNA, à temperatura ótima de emparelhamento de cada *primer* (Tabela 2) durante 1 minuto e a 72°C durante 1 minuto, para ocorrer a fase da amplificação, e no final as amostras foram colocadas a 72°C durante 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% na presença de *Green Safe*. Depois de visualizar o gel no transiluminador e confirmar o peso molecular de cada banda, os produtos de PCR foram enviados para a empresa Stab Vida para sequenciação confirmando a identidade das amplificações.

Tabela 2. *Primers* dos genes da via do ritmo circadiano.

Genes	Sequência de <i>primers</i> (5'- 3')	Fragmento (pB)	Temperatura (°C)	Nº gene bank
BMAL1	FW 5'- ACACTGCACCTCGGGAGCGA- 3'	203	62	NM_024362
	RV 5'-CGCCGAGCTCCAGAGCACAA- 3'			
CLOCK	FW 5'- ATGTCAGCACAGGCCAGCACA- 3'	100	62	NM_021856
	RV 5'- TGCTCGGCGTCTGGTTTGGGA- 3'			
Cry1	FW 5'- AAGGGACTCCGGCTGCACGA- 3'	190	60	NM_198750
	RV 5'- CCCC GGATCACAAACAGGCGA- 3'			
Cry2	FW 5'- GCCCAGGAGCCACCAAGCAA- 3'	123	60	NM_133405
	RV 5'- GCATGCACACGCAAACGGCA- 3'			
Per1	FW 5'- AGCAGAGGGCGGGTCCAGTT- 3'	133	62	NM_001034 125
	RV 5'- TTATTGGCCAGGGCGAGCGG- 3'			
Per2	FW 5'- CGCACACGCAACGGGGAGTA - 3'	177	62	NM_031678
	RV 5'- AACGCTGGGGTGCGGAGTCT- 3'			
Per3	FW 5'- GAGACGTGCACGGAACCGCA - 3'	121	62	NM_023978
	RV 5'- AGCTATGCTGCTCTGGCCGC- 3'			

5. PCR em tempo real

5.1. Experiência gonadectomizados vs sham

A quantificação da expressão dos genes da via do ritmo circadiano, nomeadamente BMAL1, Per2 e Per3 foi efetuada por PCR em tempo real, utilizando o kit Maxima SYBR®Green/ROX (Fermentas), nos 4 grupos em estudo (fêmeas controlo vs OVX e machos controlo vs OOX). Para a otimização desta técnica foi feita uma série de 4 diluições para cada gene. O gene endógeno usado foi a ciclofilina A para normalizar os níveis de expressão. Todas as experiências de PCR em tempo real foram efetuadas em duplicado, com 6 amostras de cada grupo de animais e foi realizado utilizando o termociclador iCycler Iq™ (Bio-Rad).

As reações de amplificação dos genes da via do ritmo circadiano e da ciclofilina A foram preparadas para um volume final de 20 µL, para tal adicionou-se 10 µL de *Syber green*, 0.8 µL

de *Primer Fw* e de *Primer Rv* diluídos de 1:20, 1 µl de cDNA e por fim fez-se até ao volume final com água estéril (Fermentas). As amostras foram expostas às seguintes condições de amplificação: 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 56°C ou 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos. A formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto amplificado foram avaliadas através da análise das curvas *melting* do PCR em tempo real. Os níveis relativos de expressão das enzimas em estudo nos diferentes grupos foram calculados pelo método $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001).

A avaliação estatística dos resultados foi avaliada pelo teste não paramétrico *Mann-Whitney U* usando o software GraphPad. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

5.2. Estudo da regulação do ritmo circadiano

A expressão de alguns genes, nomeadamente, BMAL1, CLOCK, Cry2, Per1 e Per2, no ritmo circadiano foi analisada por PCR em tempo real, utilizando o kit Maxima SYBR®Green/ROX (Fermentas), nos 4 grupos em estudo (ZT1, ZT7, ZT13 e ZT19), com $n=12$ (6 ratos fêmeas e 6 ratos machos) para cada grupo de animais. As experiências de PCR em tempo real foram efetuadas nas mesmas condições da experiência anterior.

Para a avaliação estatística dos resultados realizou-se o teste não paramétrico *Mann-Whitney U* usando o software GraphPad. Os grupos foram considerados significativamente diferentes a $p < 0.05$, e os dados são apresentados como médias \pm SEM de 4 a 6 animais por grupo.

6. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IHC) consiste na deteção de proteínas, neste caso de BMAL1, CLOCK, Cry1, Per1 e Per2, em secções de CP de rato usando anticorpos específicos. Os cortes de CP de rato com aproximadamente 2 meses de idade foram fixados numa solução de formol e impregnados em parafina durante o processamento das lâminas histológicas. Os cortes foram desparafinados em xileno 2 vezes durante 10 minutos e reidratados em etanol absoluto 2 vezes durante 10 minutos, etanol a 95% durante 10 minutos, etanol a 80% durante 10 minutos e por fim foram lavados em água corrente durante 5 minutos. As lâminas foram colocadas numa solução de citrato de 10 mM durante 20 minutos a uma temperatura constante de 90°C promovendo a recuperação antigénica. Após o arrefecimento das lâminas à temperatura ambiente, cada corte de CP foi incubado com peróxido de oxigénio (H_2O_2), durante 10 minutos à temperatura ambiente, permitindo a inibição das peroxidases endógenas.

Posteriormente, efetuaram-se 2 lavagens de 5 minutos com tampão de fosfato salino - tween (PBST) 0,1% com agitação suave. De seguida, os cortes foram incubados com albumina de soro bovino (BSA) 1% em PBS, durante 30 minutos à temperatura ambiente, para bloquear as reações inespecíficas. Após as lavagens, as secções de CP foram incubadas com o respetivo anticorpo primário, anti-Per1 (Santa Cruz Biothecnology), anti-Per2 (Santa Cruz Biothecnology), anti-BMAL1 (Santa Cruz Biothecnology), anti-Cry1 (Santa Cruz Biothecnology) e anti-CLOCK (Santa Cruz Biothecnology) diluídos de 1:50 em PBS com BSA 1%, *overnight* a 4°C, em câmara húmida. Posteriormente, colocaram-se as lâminas à temperatura ambiente durante uma hora e no fim procedeu-se as lavagens. De seguida, incubou-se com o anticorpo secundário biotilado anti-rabbit IgG (Sigma Life Science) diluído de 1:20 em PBS com BSA 1%, durante 1 hora à temperatura ambiente em câmara húmida. Após novas lavagens, os cortes foram incubados com o complexo estreptavina-biotina-peroxidase recorrendo a HRP streptavidin (0.5 mg/ml, Sigma Life Science) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Concluído o tempo de incubação, efetuou-se lavagens com PBST 0,1% seguida da incubação com o revelador, uma solução de diaminobenzidina (DAB 50X Dako REAL, Dako) até se verificar uma coloração acastanhada em cada secção de tecido. Após a interrupção desta reação com água, as lâminas foram coradas com hematoxilina durante 5 segundos e lavadas em água corrente. De seguida, os cortes de CP foram desidratados por passagens consecutivas durante 30 segundos em etanol a 95%, etanol absoluto e em xileno. Por fim, procedeu-se à montagem das lâminas com meio de montagem *Entellan* (Merck), que depois de secas foram observadas e fotografadas ao microscópio (Axio Imager A1) na ampliação 100x.

O controlo negativo foi obtido através da omissão do anticorpo primário. Na marcação positiva, as zonas alvo das células aparecem coradas de castanho, devido à ação da peroxidase sobre o DAB, o qual forma polímeros na presença do peróxido de hidrogénio.

7. Extração e quantificação de proteína

Os CPs obtidos a partir de ratos *Wistar* foram lisados com 200 µL de meio de lise completo (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.1% Triton X-100 e cocktail de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich)) e mecanicamente homogeneizados com um minipilão. De seguida, centrifugou-se 5 minutos a 1400g a 4°C e recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo de 1.5 mL.

A quantificação de extrato de proteína total de CP foi realizada pelo método de Bradford numa placa de 96 poços, usando uma reta de calibração calculada com base na absorvância dos padrões de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) (Tabela 3). O ensaio de Bradford baseia-se na alteração de absorvância do corante Azul Brilhante *Coomassie* que, em condições ácidas, liga-se aos resíduos positivos das proteínas passando à sua forma aniónica. A 595nm a

forma aniônica do corante tem absorvância máxima, sendo esta proporcional à quantidade de proteína presente na amostra.

O extrato de proteína total de CP foi quantificado e guardado a -20°C até se submeter à técnica de Western blot.

Tabela 3. Reagentes e respectivas quantidades para a quantificação de proteína total em placa de 96 poços, pelo método de Bradford.

	[Proteína] μg	Água (μL)	BSA / Amostra (μL)	Reagente BioRad (μL)
A	0	160	0	40
B	0,2	159,8	0,2	40
C	0,5	159,5	0,5	40
D	1	159	1	40
E	2	158	2	40
F	4	156	4	40
G	8	152	8	40
H	10	150	10	40
Amostra	-	159	1	40

8. Western Blot

A técnica de Western blot é utilizada na detecção de uma proteína específica a partir de extratos de proteína total, neste caso de CP. Na primeira parte desta técnica procedeu-se a uma eletroforese em gel de poliacrilamida para separar proteínas, segundo o seu tamanho utilizando um gel de separação com 10% de acrilamida. Para tal, as amostras foram solubilizadas num tampão de deposição contendo agentes redutores e desnaturadas a 95°C durante 10 minutos. Paralelamente às amostras, correu-se um marcador de pesos moleculares com proteínas de peso molecular conhecido (Kaleidoscope Prestained Standads, BioRad). Posteriormente, sob a ação da corrente elétrica, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de polivinildieno difluorido - PVDF (Amersham Biosciences) que possui uma forte afinidade para as proteínas. Cada proteína tem um tempo específico de transferência que depende do seu peso molecular. Para a BMAL1, a CLOCK e a Cry1 a transferência foi efetuada a 750mA durante 1 hora, enquanto que para as proteínas Per1 e Per2 a

eletrotransferência foi realizada 600mA durante uma hora e 40 minutos. Na transferência usou-se tampão de eletrotransferência, CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico), que flui entre o gel e a membrana levando à passagem das proteínas para a membrana. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com uma solução de BSA 3% durante 2h à temperatura ambiente, para impedir ligações inespecíficas do anticorpo primário e/ou secundário.

A membrana foi incubada com o anticorpo primário específico, nomeadamente anti-BMAL1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-CLOCK (Santa Cruz Biotechnology), anti-Cry1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-Per1 (Santa Cruz Biotechnology) e anti-Per2 (Santa Cruz Biotechnology), diluídos 1:100 em solução de lavagem, *overnight* a 4°C. Concluído o tempo de incubação com o anticorpo primário procedeu-se às lavagens com TBS_{SDS} 0.1% (tampão salino Tris - dodecil sulfato de sódio) para remover o anticorpo primário ligado inespecificamente. Depois, incubou-se com o anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado à fosfatase alcalina (GE Healthcare), diluído de 1:10000 TBS_{SDS} 0.1% durante 1hora à temperatura ambiente. Esta enzima converte o substrato ECF num produto que emite fluorescência, quando excitado por uma fonte de luz adequada. Após as lavagens com TBS_{SDS} 0.1% a membrana foi incubada com o agente revelador (ECF Western Blotting Reagent Packs, GE Healthcare) durante 3 minutos.

A deteção das bandas foi efetuada no Molecular Imager FX (FX Pro Plus, Bio-Rad). A fluorescência da banda é diretamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. A imagem é visualizada utilizando o software Quantity One™ (Bio-Rad). As experiências foram repetidas pelo menos três vezes.

9. Cultura primária de células epiteliais do plexo coróideu de rato - CPEC

Os ratos recém-nascidos (P3-P5) foram utilizados para a obtenção de CPEC. Primeiro, foram recolhidos os CPs dos ventrículos laterais dos ratos e mantidos em PBS até à digestão destes em PBS com 0,2 % de pronase durante 5 minutos a 37°C. Após a centrifugação dos CPs a 410xg durante 2 minutos, rejeitou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) completo, que contém 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). Depois das células sofrerem dissociação, estas foram lavadas com DMEM e depois foram ressuscitadas em DMEM suplementado com fator de crescimento epidérmico (EGF), insulina e citosina arabinosine C. Posteriormente, semeou-se as células em placas de 12 poços com cerca de 1 mL de DMEM suplementado em cada poço.

Depois de semeadas, o meio de cultura das células foi mudado no dia seguinte. Quando as células se apresentaram numa monocamada procedeu-se à sua manipulação para a realização da imunocitoquímica.

10. Imunocitoquímica por fluorescência

A imunocitoquímica (ICC), à semelhança da técnica de imunohistoquímica, permite avaliar o nível de expressão de componentes celulares como proteínas e conhecer a sua localização e distribuição celular. Esta técnica foi realizada em células de culturas primárias de CP e com moléculas fluorescentes que permitiram a marcação dos componentes celulares em estudo. Para a marcação das proteínas do ritmo circadiano, nomeadamente BMAL1, CLOCK, Cry1, Per1 e Per2, as CPEC foram lavadas com PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com PFA 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente. Para a permeabilização das células, incubou-se as CPEC com uma solução de 1% Triton X-100 em PBS durante 5 minutos. Após as lavagens com PBS, as células permeabilizadas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com uma solução de bloqueio, constituída por PBST 0.1% e 20% de FBS. As células foram lavadas com PBST 0.1% e de seguida incubadas com o anticorpo primário respetivo anti-BMAL1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-CLOCK (Santa Cruz Biotechnology), anti-Cry1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-Per1 (Santa Cruz Biotechnology) e anti-Per2 (Santa Cruz Biotechnology), diluídos de 1:50 em PBST com 1% de FBS, *overnight* a 4°C. Findo o tempo de incubação, lavou-se 6 vezes com PBST a 0,1% e incubou-se as células com anticorpo secundário *Alexa fluor 488 goat anti-rabbit* (H+L, Molecular Probes) diluído de 1:1000 em PBST com 1% de FBS durante 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Depois de lavar novamente com PBST, as células foram incubadas com o *Hoescht 33342 dye do kit Image-iT™ Plasma Membrane and Nuclear Labeling kit (I34406)* numa diluição de 1:1000 durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro, permitindo a marcação do núcleo. Após as lavagens, procedeu-se à montagem das lamelas utilizando o meio de montagem *Entellan* (Merck). As imagens de fluorescência foram obtidas por microscópio confocal LSM 710 (Axio Imager) e as imagens foram processadas no programa Zen 2011 (Zeiss).

IV. Resultados

1. Expressão de mRNA dos genes da via do ritmo circadiano no Plexo Coroideu de rato

1.1. PCR convencional

A expressão do mRNA de alguns dos genes da via circadiana, BMAL1, CLOCK, Cry 1, Cry 2, Per 1, Per 2 e Per 3, foi detetada por PCR convencional (RT-PCR). Este método possibilitou a amplificação de sequências específicas destes genes a partir de cDNA. Os produtos da reação de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% com *Green Safe* (NzyTech, Portugal) e confirmou-se que o tamanho era igual ao esperado. Na figura 12 está representado o marcador (M), o controlo negativo (N) juntamente com o fragmento de cada gene em análise: a banda do fragmento representativo do gene BMAL1 tem um peso molecular de 100 pB, seguindo-se o CLOCK com 123 pB, o Cry 1 com 203 pB, o Cry 2 com 190 pB, o Per 1 com 133 pB, o Per 2 com 177 pB e por fim o Per 3 com 121 pB.

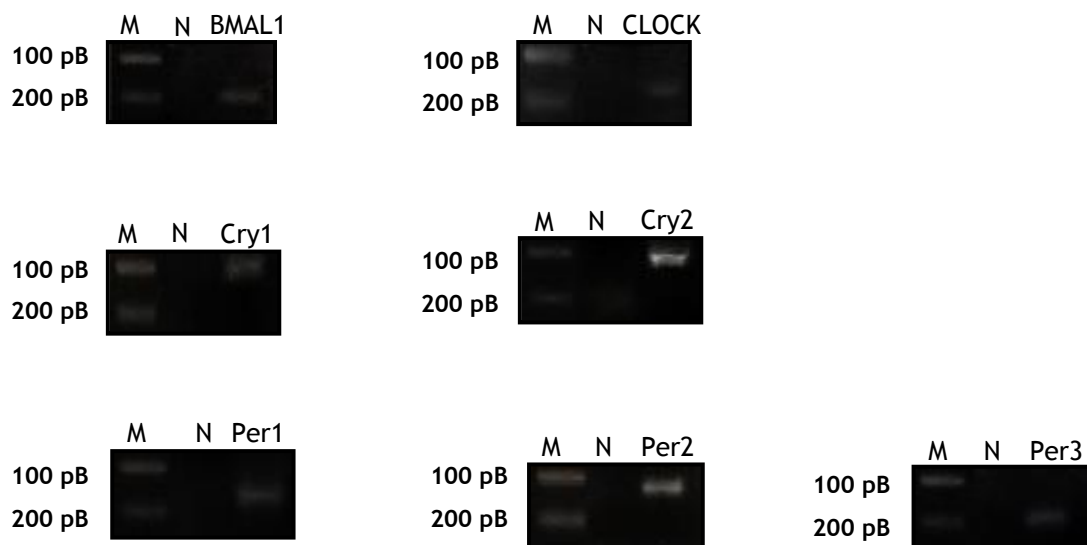


Figura 12. Expressão de mRNA dos genes da via circadiana no plexo coroideu de rato.

Marcador (M), o controlo negativo (N): o gene BMAL1 tem um peso molecular de 100 pB, seguindo-se o CLOCK com 123 pB, o Cry 1 com 203 pB, o Cry 2 com 190 pB, o Per 1 com 133 pB, o Per 2 com 177 pB e por fim o Per 3 com 121 pB.

Os produtos de PCR foram sequenciados pela empresa Stab vida, e analisados no programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) confirmando a identidade das sequências correspondentes aos genes em estudo. Observou-se a homologia para cada gene, descrita na Tabela 4, relativamente à sequência da base de dados de ratos *Wistar*. Com esta abordagem comprovou-se a expressão de mRNA destes genes no CP de rato.

Tabela 4. Genes do ritmo circadiano identificados no plexo coroideu de rato.

Percentagem de homologia entre os fragmentos sequenciados e as sequências arquivadas no gene bank.

Gene	Homologia (%)	Nº gene bank
CLOCK	98	NM_021856
BMAL1	97	NM_024362
Cry 1	99	NM_198750
Cry 2	99	NM_133405
Per 1	96	NM_001034125
Per 2	100	NM_031678
Per 3	96	NM_023978

1.2. PCR em tempo real - Experiência gonadectomizados vs sham

A expressão de mRNA de BMAL1, Per 2 e Per 3 foi comparada entre fêmeas controlo (sham), fêmeas OVX, machos controlo (sham) e machos OOX por PCR em tempo real. Para a normalização dos níveis de expressão usou-se um gene endógeno, a ciclofilina A.

Os níveis de expressão de mRNA de BMAL1, nas fêmeas, são mais elevados no grupo controlo relativamente ao grupo OVX, enquanto que nos machos, os controlos têm uma expressão de BMAL1 mais baixa que os animais do grupo OOX (Figura 13).

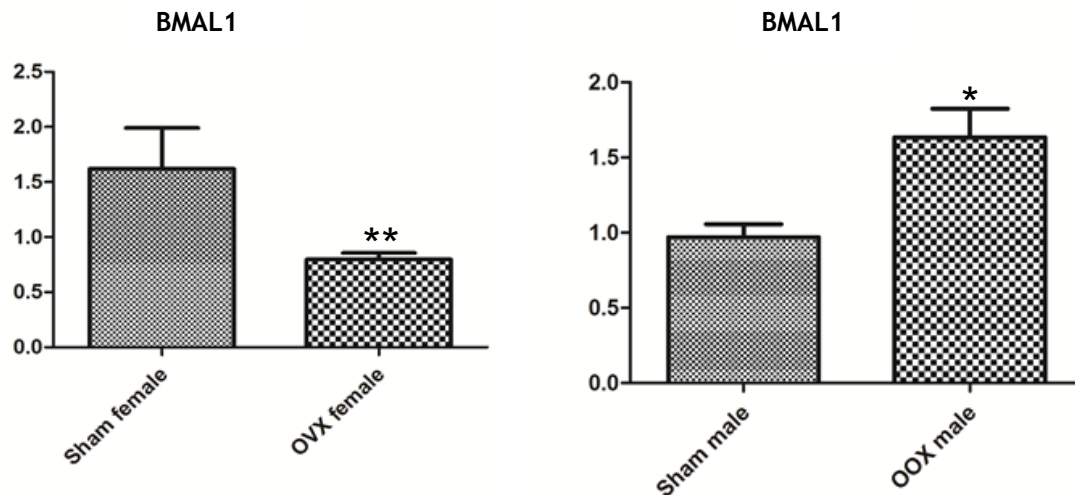


Figura 13. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de BMAL1 em plexo coroideu de rato.

Nas fêmeas, os níveis de expressão são mais elevados no grupo controle relativamente ao grupo OVX, enquanto que nos machos, os controles têm uma expressão de BMAL1 mais baixa que nos animais do grupo OOX.

Os níveis de expressão de mRNA do gene Per2, nas fêmeas, são menores no grupo controle em comparação ao grupo OVX, enquanto que nos machos, os controles têm uma expressão de mRNA de Per2 maior que os animais do grupo OOX (Figura 14).

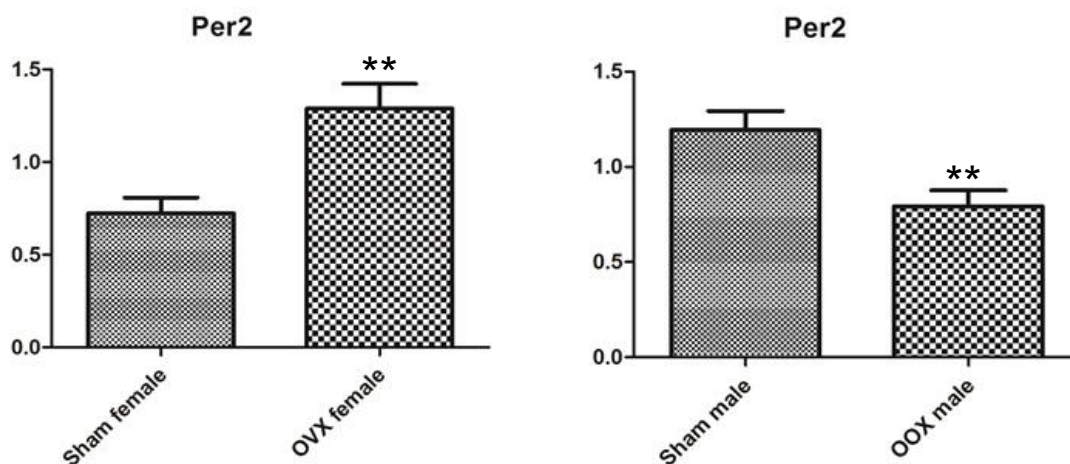


Figura 14. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per 2 em plexo coroideu de rato.

Nas fêmeas, os níveis de expressão de mRNA são mais baixos no grupo controle em relação ao grupo OVX, enquanto nos machos, os controles têm uma expressão de mRNA de Per2 mais elevada que os animais do grupo OOX.

Os níveis de expressão de mRNA de Per3 nas fêmeas, são mais reduzidos no grupo controle relativamente ao grupo OVX, enquanto nos machos, não há diferenças com significado estatístico entre o grupo controle e o tratado ($p = 0.6126$) (Figura 15).

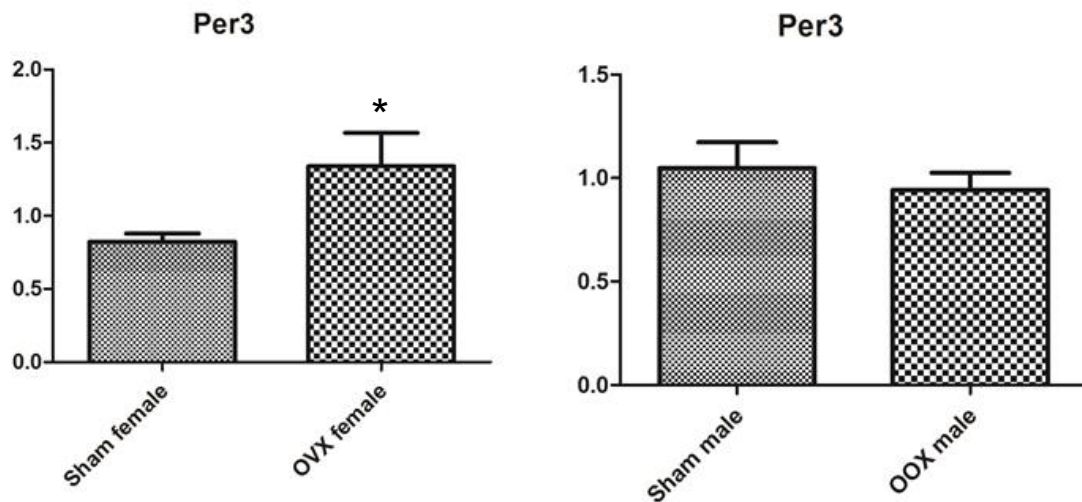


Figura 15. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per 3 em plexo coroideu de rato. Nas fêmeas, os níveis de expressão de mRNA são mais baixos no grupo controlo relativamente ao grupo OVX, enquanto nos machos, não há diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e o tratado.

1.3. PCR em tempo real - Estudo do ritmo circadiano

A expressão dos genes *clock* no ritmo circadiano foi analisada por PCR em tempo real, comprovando a existência de oscilações na expressão de mRNA ao longo do dia. Cada grupo de animais incluídos na experiência era constituído por 6 ratos machos e 6 ratos fêmeas, para se poder comparar as diferenças entre géneros nos diferentes *zeitgebers*, ZT1, ZT7, ZT13 e ZT19.

Os níveis de mRNA de BMAL1 variaram ao longo do ciclo circadiano nas fêmeas; estes níveis são mais elevados na presença de luz, verificando-se diferenças com significado estatístico entre ZT7 e ZT13 e também entre ZT13 e ZT19. Relativamente aos machos, os níveis de expressão de mRNA de BMAL1 mantiveram praticamente constantes ao longo de todo o ciclo, portanto não se verificaram diferenças significativas a nível estatístico na expressão deste gene (Figura 16).

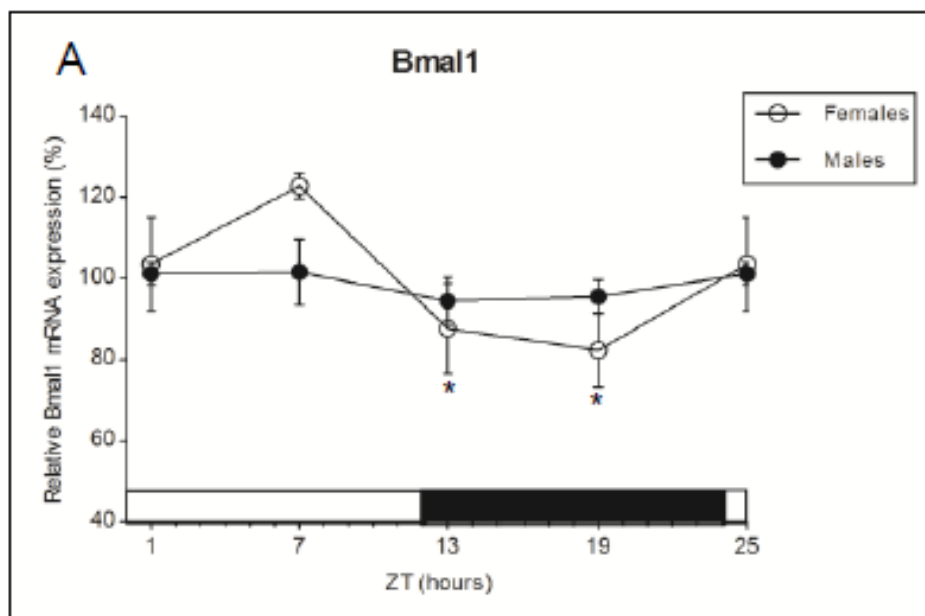


Figura 16. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de BMAL1 no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.

A barra a vazia e a cheia no eixo do x representa as 12 horas de luz e 12 horas de escuro, respectivamente. Cada ponto de dados representa a média \pm SEM de 4-6 ratos por ponto. * denota a diferença significativa estatisticamente entre os diferentes ZTs ($p < 0.05$).

Os níveis de mRNA no CP de ratos fêmea e macho do gene CLOCK no ciclo dia-noite, tiveram pequenas oscilações sem qualquer significado estatístico (Figura 17).

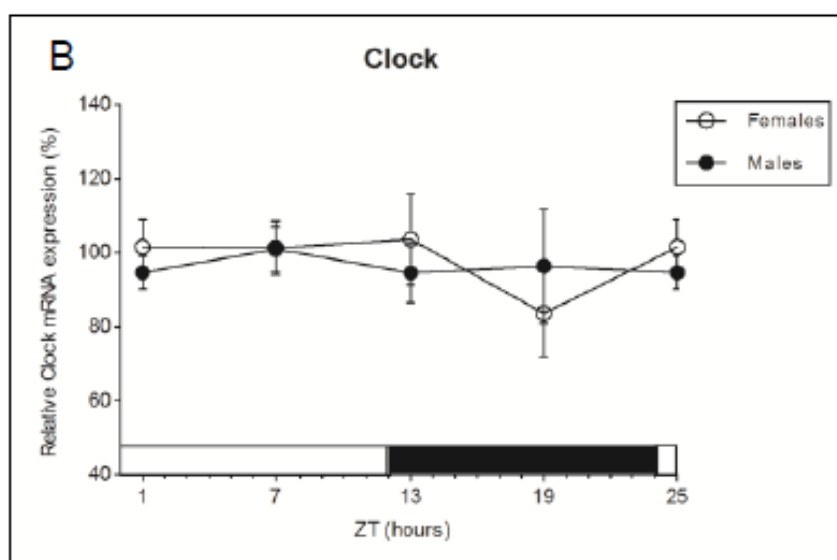


Figura 17. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de CLOCK no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.

A barra a vazia e a cheia no eixo do x representa as 12 horas de luz e 12 horas de escuro, respectivamente. Cada ponto de dados representa a média \pm SEM de 4-6 ratos por ponto.

Os níveis de mRNA de Cry2 apresentaram um padrão de oscilação muito semelhante entre machos e fêmeas (Figura 18). Em ambos os casos, há redução dos níveis de mRNA ao longo do período de luz, atingindo assim a expressão mínima em ZT13 ($p < 0.05$). Ao longo do período de escuro, há um aumento de expressão de mRNA do Cry2.

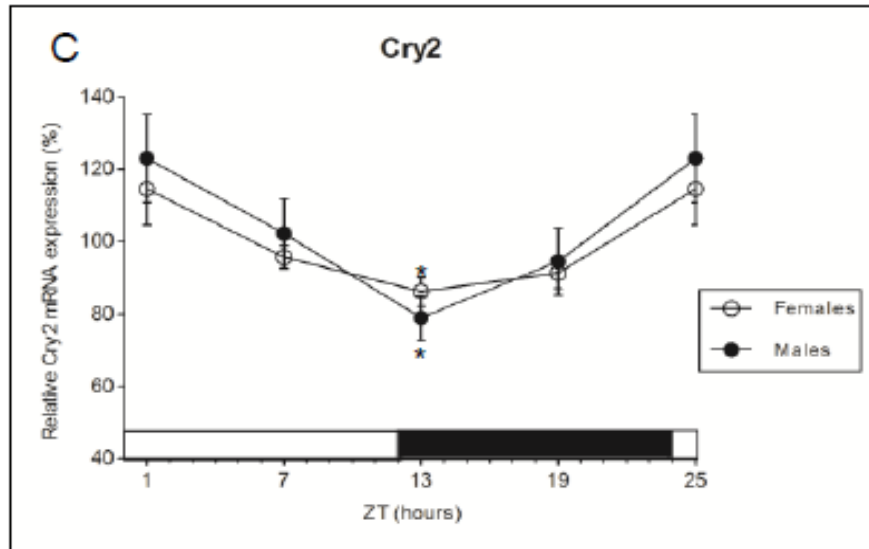


Figura 18. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de Cry2 no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.

A barra a vazia e a cheia no eixo do x representa as 12 horas de luz e 12 horas de escuro, respectivamente. Cada ponto de dados representa a média \pm SEM de 4-6 ratos por ponto. * denota a diferença estatisticamente significativa entre os diferentes ZTs ($p < 0.05$).

Os níveis de mRNA do gene *Per1* oscilam de modo inverso entre machos e fêmeas ao longo do ciclo luz/escuro, contudo estas variações não têm significado estatístico entre os diferentes ZTs (Figura 19). Por outro lado, comparando machos e fêmeas, verifica-se uma diferença de expressão estatisticamente significativa no ZT19 que corresponde às 2 horas da madrugada, sendo a expressão de mRNA deste gene *clock* é maior nas fêmeas que nos machos.

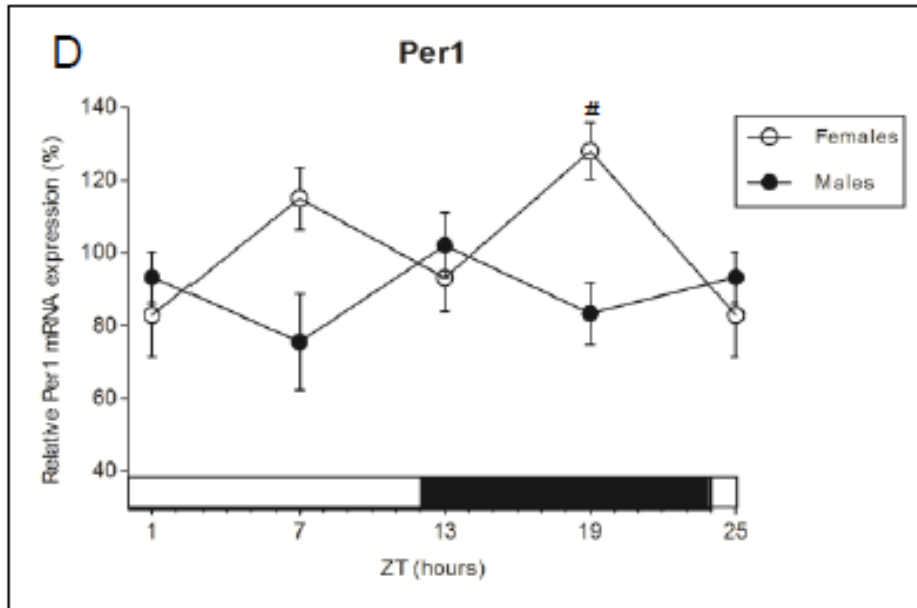


Figura 19. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de Per1 no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.

A barra a vazia e a cheia no eixo do x representa as 12 horas de luz e 12 horas de escuro, respectivamente. Cada ponto de dados representa a média \pm SEM de 4-6 ratos por ponto. # denota a diferença com significado estatístico entre fêmeas e machos ($p < 0.05$).

Os níveis de mRNA do gene Per2 oscilam ao longo do ciclo circadiano tanto nos machos como nas fêmeas (Figura 20). A expressão de mRNA nos machos, exibe um pico em ZT7, e apresenta variações com significado estatístico entre ZT7 - ZT1, e ZT13 - ZT19. No entanto, as fêmeas apresentam um pico de expressão em ZT13 e têm significado estatístico entre ZT13 - ZT1, e ZT7 - ZT19. As oscilações dos níveis de mRNA de Per2 em ambos os gêneros segue a mesma tendência, no entanto apresentam um desfase de 6 horas. Relativamente, às diferenças de expressão do Per2 entre machos e fêmeas, há significado estatístico em ZT7 e ZT13. A expressão de mRNA é maior em ZT7 nos machos e em ZT13 nas fêmeas.

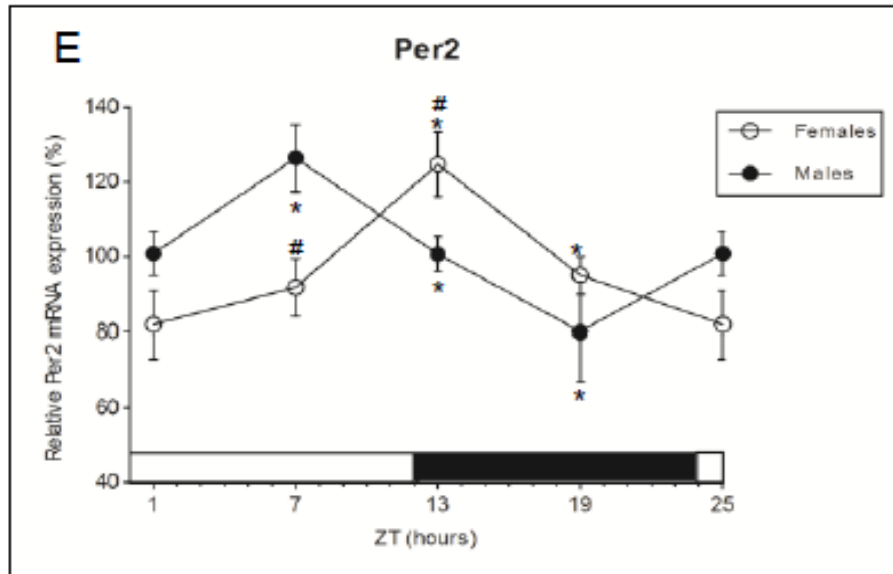


Figura 20. Ritmo circadiano da expressão de mRNA de BMAL1 no plexo coroideu de ratos fêmea e macho.

A barra a vazia e a cheia no eixo do x representa as 12 horas de luz e 12 horas de escuro, respectivamente. Cada ponto de dados representa a média \pm SEM de 4-6 ratos por ponto. * denota a diferença estatisticamente significativa entre os diferentes ZTs ($p < 0.05$) e # denota a diferença significativa a nível estatístico entre fêmeas e machos ($p < 0.05$).

2. Localização das proteínas na via do ritmo circadiano no Plexo Coroideu de rato

2.1. Imunohistoquímica

A identificação das proteínas BMAL1, CLOCK, Cry1, Per 1 e Per 2 em cortes histológicos de CP de rato foi realizada por IHC. Os cortes foram incubados com os respetivos anticorpos primários, exceto o corte para o controlo negativo, e posteriormente incubados com o revelador, DAB.

Os cortes incubados com o anticorpo primário anti-BMAL1 apresentaram uma marcação acastanhada indicando a localização desta proteína a nível citoplasmático e também nuclear apesar de a marcação nuclear ser muito ténue (Figura 21A). As secções incubadas com o anticorpo primário anti-CLOCK apresentaram uma marcação acastanhada indicando a localização desta proteína a nível citoplasmático e nuclear (Figura 21B), tal como os cortes incubados com o anticorpo primário anti-Cry 1 (Figura 21C). Os cortes incubados com o anticorpo primário anti-Per 1 apresentaram uma marcação acastanhada indicando a localização desta proteína a nível citoplasmático e também nuclear (Figura 21D), tal como com o anticorpo anti-Per 2 (Figura 21E). Esta marcação apareceu mais ténue quando comparada com a incubação com o anticorpo anti-Per 1. No controlo negativo não se verificou qualquer marcação, uma vez que se omitiu a incubação do corte histológico com anticorpo primário (Figura 21F).

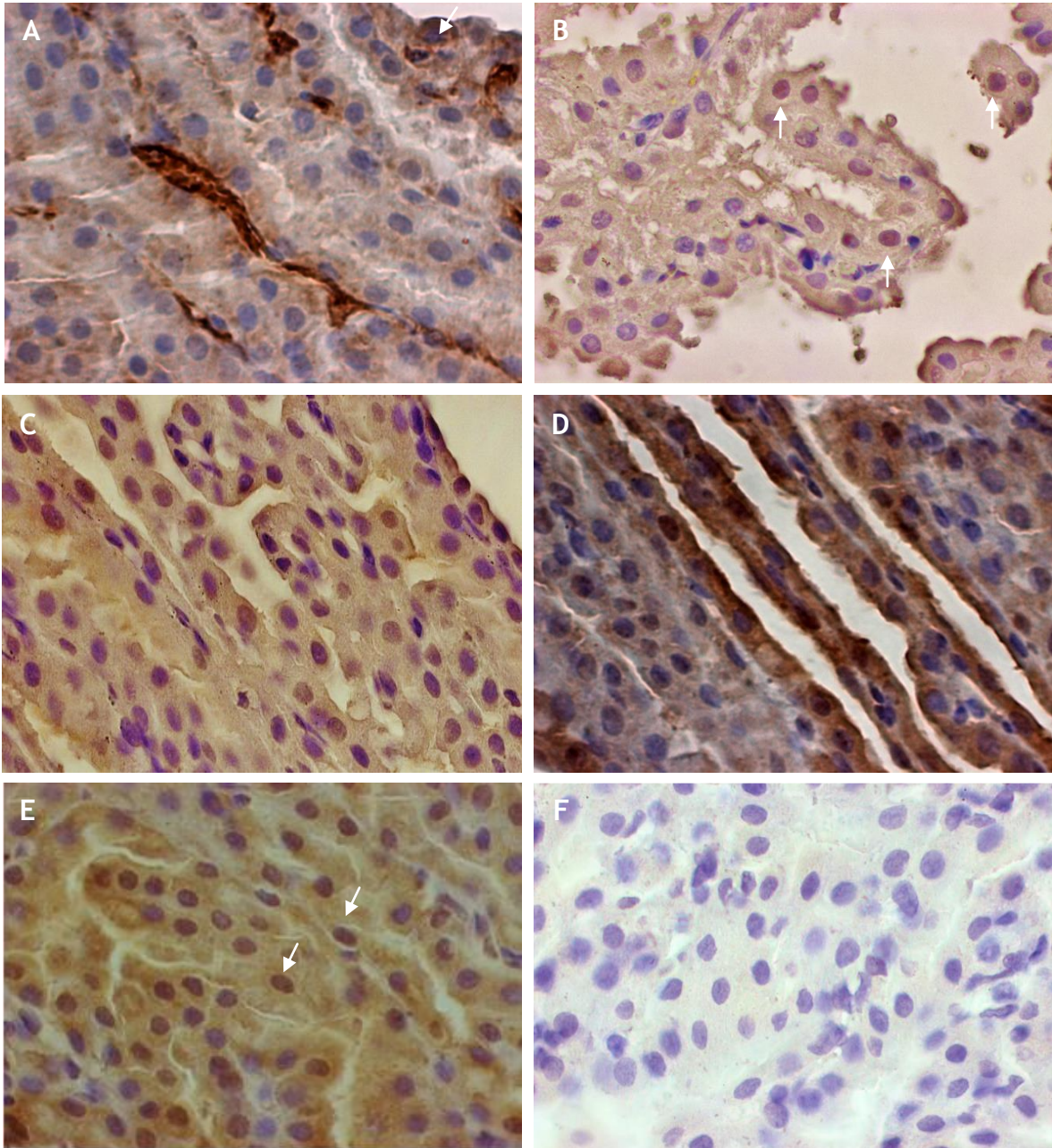


Figura 21. Imunohistoquímica em cortes histológicos de plexo coroideu de rato.

As imagens representam IHC de cortes histológicos de CP de rato incubados com os respectivos anticorpos primários, exceto o controlo negativo no qual se omite esta incubação. Nas figuras 11A, B,C,D e E foi observada a presença da proteína BMAL1,CLOCK, Cry1, Per1 e Per2 respetivamente, usando o anticorpo específico diluído de 1:50. A figura 11F apresenta o controlo negativo em que se verifica ausência de marcação. Imagens obtidas com uma ampliação 100x.

2.2. Western blot

A análise da expressão das proteínas em causa por Western blot foi realizada com extratos de proteína total de CP posteriormente incubados com os respetivos anticorpos primários. Esta técnica mostrou a presença das proteínas BMAL1, CLOCK, Cry1, Per1 e Per2 no CP de rato, apresentando uma banda com um peso molecular aproximado de 69 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 140 kDa e 140 kDa, respetivamente (Figura 22).

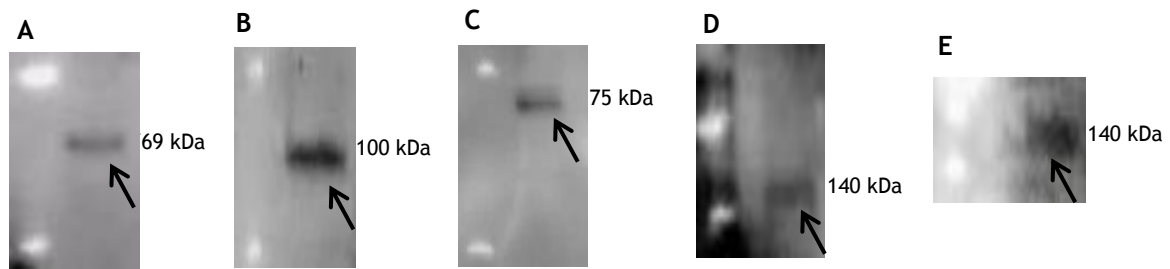


Figura 22. Western blot de extratos de proteína total de plexo coroideu de rato.

Incubação com os anticorpos anti- BMAL1 (A), anti-CLOCK 1 (B), anti-Cry1 (C), anti-Per1 (D) e anti-Per 2 (E).

2.3. Imunocitoquímica por fluorescência

As culturas primárias de células epiteliais de CP de rato foram marcadas com anticorpos específicos das proteínas da via do ritmo circadiano, BMAL1, CLOCK, Cry 1, Per 1 e Per 2. Posteriormente foram marcadas com DAPI corando os núcleos de azul enquanto a cor verde corresponde à marcação com o anticorpo específico das proteínas em estudo. Para comprovar a especificidade e a não existência de autofluorescência das células, fez-se um controlo negativo onde se omitiu a incubação com o anticorpo primário, e um outro controlo negativo em que se omitiu tanto o anticorpo primário como o secundário. Nestes dois controlos não se verificou qualquer marcação como se pode observar nas imagens apresentadas (Figura 23 K e L). Contrariamente, as CPEC incubadas com os anticorpos específicos das proteínas em estudo apresentaram marcação, indicando assim, a sua localização tanto no núcleo como no citoplasma (Figura 23 A-J). O BMAL1 (Figura 23 A,B) e Per1 (Figura 23 G,H) foram detetados no núcleo, de forma mais evidente, e no citoplasma das CPEC. O Cry1 (Figura 22 E,F) e Per2 (Figura 23 I,J) apresentam uma marcação mais ténue e difusa no núcleo e no citoplasma, opondo-se à marcação verificada no CLOCK (Figura 23 C,D).

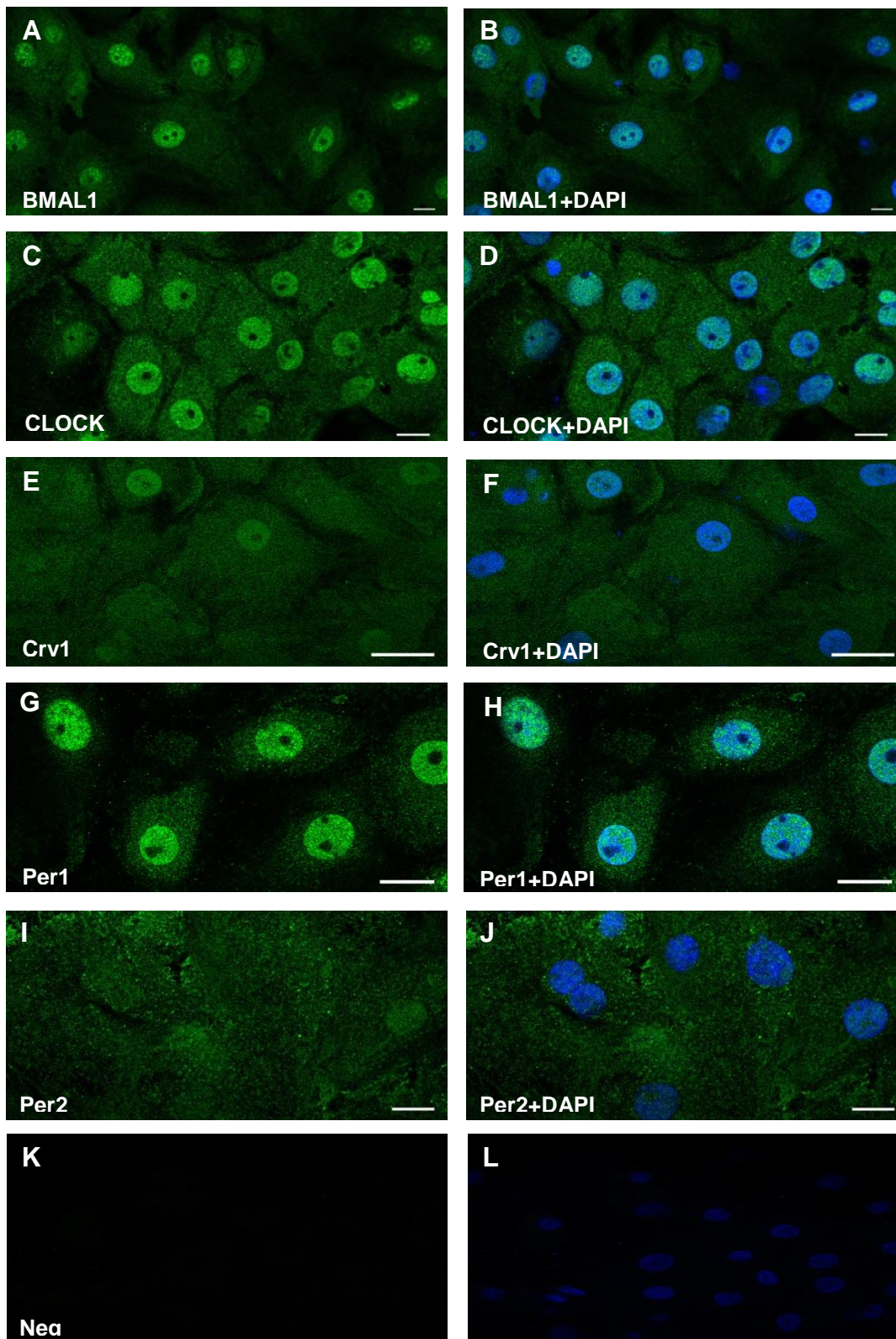


Figura 23. Imunocitoquímica das CPEC de rato com os anticorpos BMAL1, CLOCK, Cry 1, Per 1 e Per 2.

A última imagem (K e L) representa o controlo negativo apenas com omissão do anticorpo primário. A primeira coluna mostra a marcação com o anticorpo primário específico; a segunda coluna apresenta a

marcação dos núcleos com DAPI e a marcação com o anticorpo primário. As barras de escala indicam uma distância de 50 μm .

V. Discussão

Um estudo de *microarrays* de cDNA, realizado anteriormente pelo nosso grupo de investigação, teve por finalidade estudar o efeito das hormonas sexuais em diversas vias de sinalização celular no CP de rato, nomeadamente na via do ritmo circadiano (Quintela et al., 2013). Este estudo, sugeriu que o CP poderia funcionar como um oscilador circadiano do cérebro, tal como outros locais do sistema nervoso central (Guilding & Piggins, 2007). Para confirmar a presença de alguns genes da via do ritmo circadiano, particularmente BMAL1, CLOCK, Cry 1, Cry 2, Per 1, Per 2 e Per 3 no CP de rato analisaram-se os níveis de expressão de mRNA destes genes por RT-PCR.

Para caracterizar a expressão das proteínas da via do ritmo circadiano foram realizados ensaios de imunohistoquímica em secções de CP de rato, imunocitoquímica em culturas primárias de células epiteliais de CP e Western blot a partir de extrato proteico de CP. Os resultados de imunohistoquímica comprovaram a presença das proteínas BMAL1, CLOCK, Cry 1, Per 1 e Per 2 nas células epiteliais de CP de rato.

Para determinar a localização detalhada destas proteínas fez-se ICC em CPEC de rato. A proteína BMAL1 apresenta uma localização nucleocitoplasmática, ou seja, pode se encontrar tanto no núcleo como no citoplasma, ou simultaneamente em ambos, dependendo da altura do dia, como referido anteriormente por outros autores (Tamaru et al., 2003). A localização da proteína CLOCK é semelhante à da BMAL1, também nucleocitoplasmática, provavelmente por terem um mecanismo de ação semelhante na via do ritmo circadiano (Kondratov et al., 2003). Apesar de na IHC se verificar uma marcação nuclear pouco evidente da CLOCK, esta pode resultar da translocação desta proteína do núcleo para o citoplasma. Em relação à proteína Per1, pode verificar-se por ICC que esta também está presente tanto no núcleo, de forma mais evidente, como no citoplasma. Isto deve-se ao facto desta proteína se movimentar do citoplasma para o núcleo (J Fahrenkrug, Hannibal, & Georg, 2008). O padrão de ICC do Per2 é semelhante à do Per1 (Jan Fahrenkrug, Georg, Hannibal, Hindersson, & Gräs, 2006), no entanto a proteína Per2, em ICC, apresenta uma expressão mais difusa no núcleo e no citoplasma. Por sua vez as proteínas Per têm um padrão de ICC idêntico às proteínas Cry. Assim sendo, o resultado da ICC relativo à proteína Cry1 está de acordo com o mecanismo molecular do ritmo circadiano (descrito anteriormente na introdução), uma vez que as proteínas Per e Cry são sintetizadas no citoplasma e posteriormente deslocadas para o núcleo (J Fahrenkrug et al., 2008).

A análise da expressão das proteínas em estudo foi ainda efectuada por Western blot. Esta técnica também permitiu comprovar a sua presença no CP de rato e caracterizar quanto ao peso molecular. O anticorpo anti-BMAL1 reconheceu uma banda, representativa da BMAL1, com um peso molecular de ~70kDa, como descrito na bibliografia (Von Gall, Noton, Lee, & Weaver, 2003). O anticorpo anti-CLOCK reconheceu uma banda a ~100kDa (Tamaru et al., 2003). O anticorpo anti-Cry1 detectou uma banda com um peso molecular de 75kDa (Karman & Tischkau, 2006). O Western blot de extrato proteico de CP de rato revelou também a

expressão da proteína Per1 e Per2 com ~140kDa (Borgs et al., 2009; CHILOV, HOFER, BAUER, WENGER, & GASSMANN, 2001).

O estudo de *microarrays* de cDNA que serviu de base a este trabalho revelou que alguns genes são expressos diferencialmente entre ratos fêmeas gonadectomizadas e sham, e ratos machos gonadectomizados e sham (Quintela et al., 2013). Então analisaram-se as diferenças dos níveis de expressão de mRNA de BMAL1, Per2 e Per3 nos quatro grupos de estudo já mencionados, por PCR em tempo real. Estudos anteriores propuseram que a ovariectomia reduz a expressão dos genes da via do ritmo circadiano nos ratos fêmeas e quando tratados com estradiol restabelecem os níveis de expressão destes genes voltando aos valores normais, reduzindo assim, a dessincronização rítmica nos animais (Karatsoreos & Silver, 2007). Com a experiência dos animais gonadectomizados, observou-se que a expressão de mRNA de Per2 e Per3 aumentou no grupo OVX relativamente ao grupo sham, enquanto que a expressão de mRNA de BMAL1 decresce no grupo OVX quando comparado com os ratos sham. Como Per e CRY quando deslocadas para o núcleo inibem a transcrição do BMAL1 (Paschos et al., 2010), pelo que o aumento de Per2 registado poderá ter originado a diminuição de BMAL1. Nos animais do grupo OOX, a expressão de mRNA de Per2 foi menor quando comparado com os ratos machos sham. Este resultado, no CP de rato, está de acordo com a expressão mRNA de Per2 no SCN (Karatsoreos, Butler, et al., 2011). Apesar de não se verificar significado estatístico, a expressão de mRNA de Per3 também foi menor nos ratos OOX do que nos ratos machos sham; provavelmente, se o número de amostras fosse maior, o resultado já poderia ter significado estatístico. Tendo em conta o mecanismo molecular do ritmo circadiano, as proteínas Per e Cry quando migram para o núcleo inibem a transcrição do BMAL1 e do CLOCK, reduzindo assim a sua expressão de mRNA. O facto da expressão de Per2 ter sido menor nos ratos OOX, poderá assim explicar a maior expressão de mRNA de BMAL1 nesse grupo, exatamente o oposto do que se verificou nas fêmeas.

O padrão diário da expressão de mRNA de BMAL1, CLOCK, Cry2, Per1 e Per2 no CP de rato foi estudada por PCR em tempo real, em diferentes tempos de *zeitgebers*, nomeadamente ZT1, ZT7, ZT13 e ZT19 que correspondem às 8 horas, 14 horas, 20 horas e 2 horas, respetivamente. O ZT0 corresponde ao momento em que se ligam as luzes, neste caso às 7 horas, contudo a primeira amostragem ocorreu ao ZT1 para o sistema circadiano se adaptar à alteração em causa. O ZT12 é o momento em que as luzes foram desligadas (19 horas), no nosso caso apenas se analisou a expressão dos genes após uma hora. O ritmo da expressão de mRNA de BMAL1 no CP de ratos fêmeas mostrou um padrão claramente circadiano: observou-se um pico de expressão no ZT7, contrariamente ao SCN, que tem uma maior expressão de mRNA em ZT18 (Girotti, Weinberg, & Spencer, 2009; Guilding & Piggins, 2007); são mais elevados durante o período de luz, opondo-se ao oscilador central, SCN, onde se verifica maior expressão de mRNA durante o período de escuro. A expressão de mRNA de CLOCK não apresentou oscilações ritmicamente circadianas no CP de ratos machos, mas nas fêmeas, no período de escuro houve uma diminuição dos níveis de expressão de mRNA de CLOCK no CP. Este

resultado vai de encontro ao descrito no SCN de hamsters, onde também há diminuição dos níveis de expressão deste gene após o desligar das luzes (Tournier et al., 2003). A expressão de mRNA de Cry2 exibiu um padrão circadiano semelhante tanto no CP de ratos fêmeas como no CP de ratos machos. No CP, a expressão deste gene diminuiu na presença de luz e aumentou na ausência desta, tendo menor nível de expressão de mRNA em ZT13. No entanto, no SCN acontece o oposto, ou seja, a expressão aumenta durante o período de luz e diminui durante o período de escuro (Caldelas, Poirel, Sicard, Pvet, & Challet, 2003) apresentando um pico de expressão máximo no início do período de ausência de luz (Guilding & Piggins, 2007). A expressão de mRNA de Per1 apesar de apresentar oscilações circadianas nos diferentes *zeitgebers* tanto nas fêmeas como nos machos, não teve significado estatístico. O padrão circadiano exibido no CP de ratos fêmeas é oposto ao CP de ratos machos. Nas fêmeas, a expressão de mRNA de Per1 aumenta até ZT7, diminui até ZT13 e aumenta novamente durante o período de escuro. Contrariamente, nos machos, a expressão de Per1 diminui até ZT7, aumenta até ZT13 e diminui durante o período de escuro. No SCN, a expressão de mRNA de Per1 aumenta durante a presença de luz e diminui durante a ausência desta (Caldelas et al., 2003), apresentando um pico de expressão a ZT4 (Guilding & Piggins, 2007). O padrão de expressão do mRNA de Per1 no SCN, durante a presença de luz, é similar aos níveis de expressão no CP de fêmeas, contrariamente, durante a ausência de luz, este padrão é idêntico ao do CP nos machos. Os níveis de expressão de mRNA de Per2 também exibem oscilações circadianas tanto no CP de fêmeas como nos machos. Nas fêmeas, a expressão de mRNA aumentou durante a presença de luz e diminuiu no escuro, apresentando um pico de expressão máximo em ZT13, enquanto nos ratos machos apresentou um pico de expressão máximo em ZT7. No SCN, apresentou um pico máximo de expressão em ZT10 (Guilding & Piggins, 2007), ou seja, também aumenta durante o período de luz e diminui durante o período de escuro (Caldelas et al., 2003). No SCN, a expressão de mRNA de BMAL1 é paralela com o CLOCK, em anti-fase à expressão de mRNA de Per1 e Per2 (Caldelas et al., 2003; Guilding & Piggins, 2007), provavelmente as proteínas Per e Cry traduzidas, formam heterodímeros e migram para o núcleo onde reprimem os heterodímeros formados pelo BMAL1 e pelo CLOCK (Froy, 2010; Paschos et al., 2010). Contudo no CP de rato, este contraste da expressão entre BMAL1 e PER não se verifica, assim como não se verifica o paralelismo entre a expressão temporal de mRNA entre BMAL1 e CLOCK, sugerindo que o relógio do CP funciona de modo independente do SCN.

A expressão dos genes do ritmo circadiano no CP de rato mostrou que há oscilações nos níveis de mRNA num ritmo de vinte e quatro horas, e que esta difere entre machos e fêmeas para o BMAL1, CLOCK, Per1 e Per2. Pensa-se que muitos dos efeitos circadianos do estradiol e da testosterona atuam noutros osciladores extra-SCN quer por vias eferentes ou aferentes. Esta hipótese foi apoiada pelo facto de no SCN haver poucos recetores de estrogénios, contrariamente, aos recetores de androgénios que estão localizados no núcleo do SCN de forma mais abundante (Iwahana, Karatsoreos, Shibata, & Silver, 2008). Como no SCN não

existem praticamente recetores de estrogénios, e visto que as hormonas regulam a ritmicidade circadiana tanto por via indireta como direta (Karatsoreos & Silver, 2007), pode-se sugerir que o CP seja um possível intermediário na passagem desta informação hormonal para o SCN. Esta suposição tem por base o facto das hormonas sexuais influenciarem a regulação do ritmo circadiano no CP, e este pode ser um local extra-SCN que envia a informação para o oscilador central, SCN.

VI. Conclusões e Perspetivas Futuras

Com a realização deste trabalho confirmamos a existência de mRNA dos genes do ritmo circadiano no CP de rato, assim como comprovamos a presença e a localização no núcleo e no citoplasma das proteínas BMAL1, CLOCK, Cry 1, Per 1 e Per 2 em CP de rato.

Verificou-se também que as hormonas sexuais modulam a expressão dos genes do ritmo circadiano, principalmente os estrogénios, uma vez que a gonadectomia nos ratos fêmeas diminuiu a expressão do gene BMAL1, tendo o efeito oposto no Per, devido aos circuitos de feedback positivo e negativo.

Como as hormonas sexuais regulam a ritmicidade circadiana no CP, e o SCN tem uma expressão baixa de recetores estrogénicos, este pode via indireta de veiculação de informação hormonal para o SCN, funcionando como um relógio circadiano cerebral.

Posteriormente, poderão ser feitas outras experiências para verificar se o CP é um oscilador autónomo ou dependente do oscilador central, como este estudo parece sugerir. Para estudar esta hipótese pode-se fazer uma experiência com um grupo de ratos com uma lesão no SCN e outro grupo será o controlo. Também se pode estudar a adaptação do CP ao ciclo de escuridão constante como num ciclo de luz constante, verificando as diferenças dos níveis de expressão dos genes circadianos. Para aprofundar o papel das hormonas sexuais no ritmo circadiano pode-se comparar as diferenças de expressão dos genes entre os ratos fêmeas gonadectomizadas, em tratamento de substituição hormonal e sham e os machos gonadectomizados, em tratamento de substituição hormonal e sham.

VII. Bibliografia

- Albrecht, U. (2012). Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*, 74(2), 246-260.
- Alves, C. H., Gonçalves, I., Socorro, S., Baltazar, G., Quintela, T., & Santos, C. R. (2009). Androgen Receptor is Expressed in Murine Choroid Plexus and Downregulated by 5 α -Dihydrotestosterone in Male and Female Mice. *Journal of molecular neuroscience*, 38(1), 41-49.
- Antle, M. C., & Silver, R. (2005). Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends in neurosciences*, 28(3), 145-151.
- Borgs, L., Beukelaers, P., Vandenbosch, R., Nguyen, L., Moonen, G., Maquet, P., . . . Malgrange, B. (2009). Period 2 regulates neural stem/progenitor cell proliferation in the adult hippocampus. *BMC neuroscience*, 10(1), 30.
- Caldelas, I., Poirel, V., Sicard, B., Pvet, P., & Challet, E. (2003). Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicanthhis ansorgei*. *Neuroscience*, 116(2), 583-592.
- CHILOV, D., HOFER, T., BAUER, C., WENGER, R. H., & GASSMANN, M. (2001). Hypoxia affects expression of circadian genes PER1 and CLOCK in mouse brain. *The FASEB Journal*, 15(14), 2613-2622.
- Chodobski, A., & Szmydynger-Chodobska, J. (2001). Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microscopy research and technique*, 52(1), 65-82.
- Damkier, H. H., Brown, P. D., & Praetorius, J. (2010). Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. *Physiology*, 25(4), 239-249.
- Dardente, H., Dardente, H., & Cermakian, N. (2007). Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiology international*, 24(2), 195-213.
- Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology*, 72, 517-549.
- Emerich, D. F., Skinner, S. J., Borlongan, C. V., Vasconcellos, A. V., & Thanos, C. G. (2005). The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *Bioessays*, 27(3), 262-274.
- Fahrenkrug, J., Georg, B., Hannibal, J., Hindersson, P., & Gräs, S. (2006). Diurnal rhythmicity of the clock genes Per1 and Per2 in the rat ovary. *Endocrinology*, 147(8), 3769-3776.

- Fahrenkrug, J., Hannibal, J., & Georg, B. (2008). Diurnal rhythmicity of the canonical clock genes *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in the rat adrenal gland is unaltered after hypophysectomy. *Journal of neuroendocrinology*, *20*(3), 323-329.
- Froy, O. (2010). Metabolism and circadian rhythms—implications for obesity. *Endocrine reviews*, *31*(1), 1-24.
- Gao, B., & Meier, P. J. (2001). Organic anion transport across the choroid plexus. *Microscopy research and technique*, *52*(1), 60-64.
- Gerstner, J. R., & Yin, J. C. (2010). Circadian rhythms and memory formation. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(8), 577-588.
- Gherzi-Egea, J. F., & Strazielle, N. (2001). Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus. *Microscopy research and technique*, *52*(1), 83-88.
- Girotti, M., Weinberg, M. S., & Spencer, R. L. (2009). Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *296*(4), E888-E897.
- Guilding, C., & Piggins, H. D. (2007). Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *European Journal of Neuroscience*, *25*(11), 3195-3216.
- Iwahana, E., Karatsoreos, I., Shibata, S., & Silver, R. (2008). Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. *Hormones and behavior*, *53*(3), 422-430.
- Karatsoreos, I. N., Bhagat, S., Bloss, E. B., Morrison, J. H., & McEwen, B. S. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(4), 1657-1662.
- Karatsoreos, I. N., Butler, M. P., LeSauter, J., & Silver, R. (2011). Androgens modulate structure and function of the suprachiasmatic nucleus brain clock. *Endocrinology*, *152*(5), 1970-1978.
- Karatsoreos, I. N., & Silver, R. (2007). Minireview: The neuroendocrinology of the suprachiasmatic nucleus as a conductor of body time in mammals. *Endocrinology*, *148*(12), 5640-5647.

- Karman, B. N., & Tischkau, S. A. (2006). Circadian clock gene expression in the ovary: effects of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*, *75*(4), 624-632.
- King, D. P., Zhao, Y., Sangoram, A. M., Wilsbacher, L. D., Tanaka, M., Antoch, M. P., . . . Lowrey, P. L. (1997). Positional Cloning of the Mouse Circadian Clock Gene. *Cell*, *89*(4), 641-653.
- Kondratov, R. V. (2007). A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing research reviews*, *6*(1), 12-27.
- Kondratov, R. V., Chernov, M. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Gudkov, A. V., & Antoch, M. P. (2003). BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes & development*, *17*(15), 1921-1932.
- Kwon, I., Choe, H. K., Son, G. H., & Kim, K. (2011). Mammalian molecular clocks. *Experimental neurobiology*, *20*(1), 18-28.
- Menaker, M., Murphy, Z. C., & Sellix, M. T. (2013). Central control of peripheral circadian oscillators. *Current Opinion in Neurobiology*.
- Mohawk, J. A., & Menaker, M. (2009). Beyond the suprachiasmatic nucleus: Other circadian clocks in the brain. *Communicative & Integrative Biology*, *2*(6), 520-522.
- Mohawk, J. A., & Takahashi, J. S. (2011). Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in neurosciences*, *34*(7), 349-358.
- Mong, J. A., Baker, F. C., Mahoney, M. M., Paul, K. N., Schwartz, M. D., Semba, K., & Silver, R. (2011). Sleep, rhythms, and the endocrine brain: influence of sex and gonadal hormones. *The Journal of Neuroscience*, *31*(45), 16107-16116.
- Morin, L., & Allen, C. (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain research reviews*, *51*(1), 1-60.
- Nyberg, F. (2000). Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. *Frontiers in neuroendocrinology*, *21*(4), 330-348.
- Orešković, D., & Klarica, M. (2010). The formation of cerebrospinal fluid: nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain research reviews*, *64*(2), 241-262.
- Paschos, G. K., Baggs, J. E., Hogenesch, J. B., & FitzGerald, G. A. (2010). The role of clock genes in pharmacology. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *50*, 187-214.

- Pendergast, J. S., Oda, G. A., Niswender, K. D., & Yamazaki, S. (2012). Period determination in the food-entrainable and methamphetamine-sensitive circadian oscillator (s). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), 14218-14223.
- Pevet, P., & Challet, E. (2011). Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *Journal of Physiology-Paris*, 105(4), 170-182.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Quintela, T., Gonçalves, I., Carreto, L. C., Santos, M. A., Marcelino, H., Patriarca, F. M., & Santos, C. R. (2013). Analysis of the Effects of Sex Hormone Background on the Rat Choroid Plexus Transcriptome by cDNA Microarrays. *PLoS one*, 8(4), e60199.
- Rana, S., & Mahmood, S. (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms*, 8(3).
- Redzic, Z. B., Preston, J. E., Duncan, J. A., Chodobski, A., & Szmydynger-Chodobska, J. (2005). The Choroid Plexus-Cerebrospinal Fluid System: From Development to Aging. *Current topics in developmental biology*, 71, 1-52.
- Redzic, Z. B., & Segal, M. B. (2004). The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Advanced drug delivery reviews*, 56(12), 1695-1716.
- Richards, J., & Gumz, M. L. (2012). Advances in understanding the peripheral circadian clocks. *The FASEB Journal*, 26(9), 3602-3613.
- Rosenwasser, A. M. (2009). Functional neuroanatomy of sleep and circadian rhythms. *Brain research reviews*, 61(2), 281-306.
- Saini, C., Suter, D., Liani, A., Gos, P., & Schibler, U. (2011). *The mammalian circadian timing system: Synchronization of peripheral clocks*. Paper presented at the Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.
- Serot, J.-M., Béné, M.-C., & Faure, G. C. (2003). Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Front Biosci*, 8(suppl), s515-521.
- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski Jr, L. F., & Reppert, S. M. (1997). Two period homologs: Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. *Neuron*, 19(6), 1261-1269.
- Skipor, J., & Thiery, J.-C. (2008). The choroid plexus & cerebrospinal fluid system: Undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta Neurobiol Exp*, 68, 414-428.

- Standring, S. (2010). *Gray's anatomy*: Elsevier Editora Ltda.
- Sun, Z. S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G., & Lee, C. C. (1997). RIGUI, a Putative Mammalian Ortholog of the *Drosophila* period Gene. *Cell*, *90*(6), 1003-1011.
- Tamaru, T., Isojima, Y., Van Der Horst, G. T., Takei, K., Nagai, K., & Takamatsu, K. (2003). Nucleocytoplasmic shuttling and phosphorylation of BMAL1 are regulated by circadian clock in cultured fibroblasts. *Genes to Cells*, *8*(12), 973-983.
- Tate, P., Kennedy, J., & Seeley, R. (2003). *Anatomia e Fisiologia: 6ª Edição*. Loures, Lusociência.
- Thouvenot, E., Lafon-Cazal, M., Demette, E., Jouin, P., Bockaert, J., & Marin, P. (2006). The proteomic analysis of mouse choroid plexus secretome reveals a high protein secretion capacity of choroidal epithelial cells. *Proteomics*, *6*(22), 5941-5952.
- Toh, K. L. (2008). Basic science review on circadian rhythm biology and circadian sleep disorders (Vol. 37, pp. 662-668).
- Tournier, B., Menet, J., Dardente, H., Poirel, V., Malan, A., Masson-Pevet, M., . . . Vuillez, P. (2003). Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience*, *118*(2), 317-322.
- Von Gall, C., Noton, E., Lee, C., & Weaver, D. R. (2003). Light does not degrade the constitutively expressed BMAL1 protein in the mouse suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, *18*(1), 125-133.
- Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual review of physiology*, *72*, 551-577.
- Yang, X. (2010). A wheel of time: the circadian clock, nuclear receptors, and physiology. *Genes & development*, *24*(8), 741-747.
- Zappaterra, M. W., & Lehtinen, M. K. (2012). The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(17), 2863-2878.
- Zhao, H., & Rusak, B. (2005). Circadian firing-rate rhythms and light responses of rat habenular nucleus neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience*, *132*(2), 519-528.