



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# O que será que o plexo coroide pode cheirar?

**Sandra Cristina Santos Caria**

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

Orientador: Prof. Doutora Isabel Gonçalves  
Coorientador: Prof. Doutora Cecília Santos

Covilhã, outubro de 2014



# Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus avós, à minha mãe e à minha irmã por todo amor, carinho, compreensão e apoio ao longo da minha vida. Sem eles não teria chegado até aqui. Obrigada por acreditarem em mim.

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Gonçalves pela oportunidade de desenvolver este projeto, pelo apoio e dedicação, pela disponibilidade constante e por todos os conhecimentos transmitidos, que me ajudaram a crescer como cientista e como pessoa.

À minha coorientadora Professora Doutora Cecília Santos pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de investigação e pela orientação científica e conhecimentos transmitidos.

À Joana Tomás pela disponibilidade, ajuda, simpatia e paciência prestados ao longo deste ano e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Carla Gomes por todo o carinho, amizade, ajuda e apoio que demonstrou desde que cheguei e por todos os conhecimentos que me transmitiu.

À Doutora Helena Marcelino pela disponibilidade, pelo apoio e por todos os ensinamentos a nível laboratorial.

À Doutora Telma Quintela por todos os ensinamentos a nível laboratorial.

Um muito obrigada a todos os meus colegas de laboratório, Nádía Morete, Ana Costa, Ana Catarina, Flávio Neves, Daniela Talhada, Tânia Albuquerque e Andreia Domingos, com quem partilhei este percurso. Aprendemos muitas coisas juntos e partilhamos bons momentos, de trabalho e de diversão também.

A todas as pessoas do CICS que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

A todos os meus amigos, por todos os bons momentos e grande apoio durante este percurso académico. Obrigada pela paciência e amizade que demonstraram.



## Resumo

O plexo coroideu (CP) é uma estrutura altamente vascularizada localizada nas cavidades ventriculares cerebrais, que está envolvido na produção do líquido cefalorraquidiano (CSF) bem como na manutenção da sua composição química. Um estudo prévio, de *microarrays* de cDNA, no CP de rato, mostrou que existem uma série de vias de sinalização reguladas pelas hormonas sexuais, no CP de rato, entre as quais, a via de transdução olfativa. Um estudo subsequente revelou também que o CP expressa alguns receptores olfativos (ORs) e as proteínas da via de transdução olfativa, a adenil ciclase tipo 3 (AC3) e a subunidade  $\alpha$  da proteína G específica do olfato (G $\alpha$ olf). Assim, uma vez que a presença da via de sinalização olfativa já foi descrita noutros tecidos e dado que a sua função no CP pode ser extremamente relevante na manutenção da homeostasia cerebral, este trabalho teve como objetivo prosseguir com o estudo da sua expressão e funcionalização. Os resultados obtidos mostraram a expressão de um conjunto variado de ORs, nomeadamente o OR522, OR476, OR19, OR540, OR806, OR1382 e OR227 e da subunidade do canal nucleótido cíclico CNG2 nas células epiteliais do CP, concluindo-se assim que toda a maquinaria da via de transdução olfativa está presente no CP. Com o objetivo de analisar a resposta do CP a estímulos “olfativos”, estabeleceu-se um modelo *in vitro*, por otimização da técnica de  $Ca^{2+}$  *imaging* em culturas primárias de células epiteliais de CP (CPEC). Neste momento temos todas as condições otimizadas para prosseguir com os estudos funcionais, por forma a esclarecer a relevância funcional da via de transdução olfativa neste tecido. Um estudo realizado no nosso grupo de investigação, em paralelo com o presente trabalho, revelou que o CP responde eletrofisiologicamente às poliaminas, uma família de compostos químicos com um papel fundamental numa série de mecanismos celulares e bioquímicos, em todos os organismos vivos. Dada a importância fisiológica das poliaminas, impôs-se o estudo do seu metabolismo, no CP de rato. Começámos por analisar a expressão de vários genes da via biossintética e da via catabólica das poliaminas (OCD, SPMS, SPDS, AMD1, Azin1, SSAT e Oaz1), por RT-PCR, confirmando-se a sua expressão no CP. Além disso, por imunohistoquímica em explantes de CP, observou-se também expressão das proteínas OCD e SPSY, no citoplasma das células epiteliais do CP de rato. Com os resultados do presente trabalho, podemos então concluir que toda a maquinaria de transdução olfativa está presente no CP, e que este, para além de responder eletrofisiologicamente às poliaminas, está também envolvido no seu metabolismo.

# Palavras-chave

Plexo coroideu, Líquido cefalorraquidiano, Recetores olfativos, Transdução olfativa, Poliaminas

# Abstract

The choroid plexus (CP) are highly vascularized structures, located in the brain ventricles, involved in the production of cerebrospinal fluid (CSF) as well as in the surveillance of its chemical composition. Previous studies, of cDNA microarrays in rat CP, allowed the identification of several signaling pathways regulated by sex hormones, including the olfactory transduction pathway. A subsequent study also revealed that CP expresses some olfactory receptors (ORs) and proteins of olfactory transduction pathway, namely the adenylate cyclase type 3 (AC3) and the subunit alpha of a smell specific G protein (G $\alpha$ olf). As the presence of the olfactory signaling pathway has been described in other tissues, and because their function in CP should be extremely important in brain homeostasis sustenance, this project aimed to complete the study of their expression and functionalization. Our results showed the expression of a wide range of ORs, namely OR522, OR476, OR19, OR540, OR806, OR227 and OR1382 and the subunit of the cyclic nucleotide channel 2 (CNG2), in the epithelial cells of the CP, thus concluding that the whole machinery of the olfactory pathway is present in this structure. With the propose to analyze the responses of CP to “olfactory” stimuli, we optimized an *in vitro* model in CP epithelial cells (CPEC), for Ca<sup>2+</sup> *imaging*. Right now, we have optimized the technique to proceed with the studies, in order to clarify the functional relevance of the olfactory transduction in this tissue. A study conducted in our research group, in parallel with the present work, revealed that the CP responds electrophysiologically to polyamines, a group of chemical compounds with a key role in a number of cellular and biochemical mechanisms in all living organisms. Due to the physiologic importance of polyamines we started the study of its metabolism in CP. The expression analysis of several genes of the biosynthetic and catabolic pathways of polyamines (OCD, SPMS, SPDS, AMD1, Azin1, SSAT and Oaz1) was performed by RT-PCR, and the results confirmed its expression in CP. Furthermore, by immunohistochemistry in CP explants, we also observed the presence of DCO and SPSY proteins in the cytoplasm of epithelial cells of rat CP. With all the results of this study, we conclude that the whole machinery of olfactory transduction is present in CP. Besides its electrophysiological response to polyamines, CP is also involved in polyamine metabolism.

# Keywords

Choroid plexus, Cerebrospinal fluid, Olfactory receptors, Olfactory transduction, Polyamines

# Índice

1.	Introdução .....	3
1.1.	Sistema olfativo.....	3
1.1.1.	Anatomia e fisiologia .....	3
1.1.2.	Componentes chave da via da transdução olfativa.....	5
1.1.2.1.	Recetores olfativos.....	5
1.1.2.2.	Proteína G específica do olfato.....	6
1.1.2.3.	Adenilato ciclase tipo 3 .....	7
1.1.2.4.	Canais nucleotídicos cíclicos .....	8
1.1.3.	Transdução quimiossensorial olfativa.....	9
1.1.4.	Outra via de transdução olfativa .....	11
1.1.5.	Transdução Olfativa fora do sistema olfativo .....	12
1.2.	Plexo Coroideu .....	14
1.2.1.	Funções.....	16
1.2.1.1.	Produção e secreção de CSF.....	16
1.2.1.2.	Outras funções.....	17
1.3.	Poliaminas .....	18
1.3.1.	Biossíntese das poliaminas.....	18
1.3.2.	Catabolismo das poliaminas .....	19
1.3.3.	Funções .....	19
2.	Objetivos .....	23

3.	Materiais e Métodos .....	27
3.1.	Animais .....	27
3.2.	Cultura primária de células epiteliais do plexo coroideu (CPEC) .....	27
3.3.	Extração de RNA total .....	28
3.3.1.	Quantificação do RNA total.....	28
3.3.2.	Determinação da integridade do RNA total.....	29
3.4.	Síntese de cDNA .....	29
3.5.	Amplificação enzimática de DNA (PCR) .....	30
3.5.1.	Purificação dos Produtos de PCR dos ORs.....	31
3.5.2.	Clonagem dos produtos de PCR (ORs) no vetor pNZY28 .....	31
3.5.3.	Transformação de <i>E.Coli</i> com o plasmídeo recombinante .....	32
3.5.4.	Cultura, em meio líquido, dos clones recombinantes .....	33
3.5.5.	Purificação dos plasmídeos recombinantes.....	33
3.5.6.	Digestão do plasmídeos recombinantes .....	34
3.6.	Imunofluorescência .....	34
3.6.1.	Imunohistoquímica - <i>whole-mount</i> .....	34
3.6.2.	Imunocitoquímica .....	35
3.7.	Western Blot.....	36
3.8.	<i>Single Cell Calcium Imaging</i> .....	37
4.	Resultados .....	41
I)	Estudo da expressão de alguns dos componentes da via de transdução olfativa no CP de rato .....	41
1.	Análise da expressão génica dos ORs (RT-PCR).....	41

2.	Análise da expressão do CNG2 em CP de rato .....	42
2.1.	Expressão génica de CNG2 (RT-PCR) .....	42
2.2.	Expressão proteica de CNG2 ( <i>western blot</i> ) .....	43
3.	Imunofluorescência de alguns dos componentes da via de transdução olfativa em CP de rato.....	43
3.1.	Expressão da proteína OR19 em CPEC.....	43
3.2.	Expressão das proteínas OR227 e CNG2 em explantes de CP .....	45
3.3.	Localização celular de CNG2 em explantes de CP .....	46
3.4.	Co-localização das proteínas OR227 e OR19 em explantes de CP.....	46
II)	Estudo da “resposta olfativa” em CPEC ( <i>Single cell calcium imaging</i> ) .....	47
III)	Estudo da via biossintética e da via catabólica das poliaminas no plexo coroideu de rato .....	49
1.	Via biossintética das poliaminas .....	49
1.1.	Análise da expressão dos genes da via biossintética das poliaminas por RT-PCR em CP de rato .....	49
1.2.	Análise da expressão proteica da via biossintética das poliaminas.....	50
1.2.1.	Caracterização da proteína OCD ( <i>western blot</i> ).....	50
1.2.2.	Imunohistoquímica por fluorescência das proteínas OCD e SPSY .....	50
2.	Via catabólica das poliaminas .....	52
2.1	Análise da expressão dos genes da via catabólica das poliaminas por RT-PCR .....	52
5.	Discussão .....	55
6.	Conclusões e perspectivas futuras .....	63
7.	Referências Bibliográficas.....	67



# Lista de Figuras

Figura 1 - Constituição do epitélio olfativo e o trajeto dos axónios dos neurónios sensoriais olfativos

Figura 2 - Cascata de sinalização intracelular implicada na transdução quimiossensorial olfativa, nas membranas ciliares dos neurónios sensoriais olfativos

Figura 3 - Estrutura do sistema olfativo humano

Figura 4 - Mecanismos de adaptação do sistema olfativo

Figura 5 - Outra via de transdução olfativa

Figura 6 - Sistema ventricular cerebral

Figura 7 - Representação morfológica do plexo coroideu

Figura 8 - Via biossintética e catabólica das poliaminas

Figura 9 - Mapa físico do vetor pNZY28

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR dos ORs

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR do CNG2

Figura 12 - *Western blot* de extratos de proteína total de CP de rato com o anticorpo anti-CNG2

Figura 13 - Expressão do OR19 em CPEC

Figura 14 - Co-localização do OR19 com o RE em CPEC

Figura 15 - Expressão do OR227 em explantes de CP

Figura 16 - Expressão do CNG2 em explantes de CP

Figura 17 - Co-localização do CNG2 com Wheat germ agglutinin

Figura 18 - Co-localização do OR227 com o OR19

Figura 19 - Variação no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular nas CPEC após estímulo com putrescina 5mM, 10mM e 15mM.

Figura 20 - Células carregadas com Fura-2AM sob diferentes condições

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR das enzimas via biossintética das poliaminas

Figura 22- Western blot de extratos de proteína total de CP de rato com o anticorpo anti-OCD

Figura 23 - Expressão de OCD em explantes de CP

Figura 24 - Expressão de SPSY em explantes de CP

Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR das enzimas via catabólica das poliaminas.

# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Componentes da via de transdução olfativa fora do epitélio olfativo

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados e condições de PCR

Tabela 3 - Anticorpos primários e anticorpos secundários utilizados na imunohistoquímica por fluorescência em *whole-mount*

Tabela 4 - Diferentes condições testadas para a otimização do modelo de estudo:  $\text{Ca}^{2+}$  *imaging* em culturas primárias de CPEC

Tabela 5 - Recetores olfativos identificados no plexo coroideu de rato



# Lista de Abreviaturas

AC	Adenilato Ciclase
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
AM	Grupo Acetoximetilo
AMD	S-adenosilmetionina descarboxilase
aCSF	Líquido Cefalorraquidiano artificial
AraC	Citosina arabinosine C
ATP	Adenosina Trifosfato
Azin 1	Antienzima
BSA	Albumina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	ião cálcio
Ca <sup>2+</sup> -caM	Complexo Cálcio Calmodulina
caM	Calmodulina
caMKII	Calmodulina cinase II
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
Cl <sup>-</sup>	ião cloreto
CNG	Canal Nucleotído Cíclico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CP	Plexo Coroideu
CPEC	Células epiteliais do plexo coroideu
CSF	Líquido Cefalorraquidiano
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNase I	Desoxiribonuclease I
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EO	Epitélio Olfativo
FBS	Soro Fetal de Bovino
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ião bicarbonato
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
K <sup>+</sup>	Potássio
LCR	Local de clonagem múltipla
Mg <sup>2+</sup>	ião magnésio
MHC	Complexo major de histocompatibilidade

Na <sup>+</sup>	lão sódio
OCD	Ornitina descarboxilase
ORs	Recetores olfativos
ORI	Origem de replicação
OSNs	Neurónios sensoriais olfativos
PAO	Poliamina oxidase
PBS	Tampão fosfato-salino
PDE 1C	Fosfodiesterase 1C
PLC	Fosfolipase C
RE	Reticulo endoplasmático
RNases	Ribonucleases
sAC	Adenilato Ciclase solúvel
SNC	Sistema nervoso central
SPDS	Espermidina sintase
SPMS	Espermina sintase
SSAT	Espermidina/espermina acetiltransferase
TBS	Tampão salino Tris

# **Capítulo 1**

## **Introdução**



# 1. Introdução

## 1.1. Sistema olfativo

O olfato está relacionado com processos de reconhecimento, comunicação, aprendizagem, proteção e defesa do ser vivo, uma vez que funciona como um sistema de alerta acerca do meio envolvente (Marieb & Hoeh 2007), desempenhando um papel fundamental na vida da maioria dos organismos (Du et al. 2013).

Nos humanos, o olfato é considerado do ponto de vista evolutivo, um dos sentidos mais antigos e menos desenvolvido (Marieb & Hoeh 2007), desempenhando um papel menos relevante em comparação com a visão, audição, e até mesmo com a perceção tátil (Stockhorst & Pietrowsky 2004). O sistema olfativo fornece informações sobre nós próprios, sobre outras pessoas, sobre plantas e animais, e sobre aspetos do meio ambiente, nomeadamente a deteção de potenciais perigos como a identificação de alimentos e substâncias nocivas ou irritantes (Purves et al 2005; Huart et al. 2013), podendo assim, influenciar interações sociais, comportamentos alimentares e respostas defensivas (Purves et al 2005).

O sistema olfativo possui uma enorme capacidade de reconhecimento molecular para detetar e distinguir com elevada sensibilidade e especificidade, milhares de compostos orgânicos com estruturas químicas e propriedades distintas, designados odores (Ronnnett & Moon 2002; Purves et al 2005; Du et al. 2013).

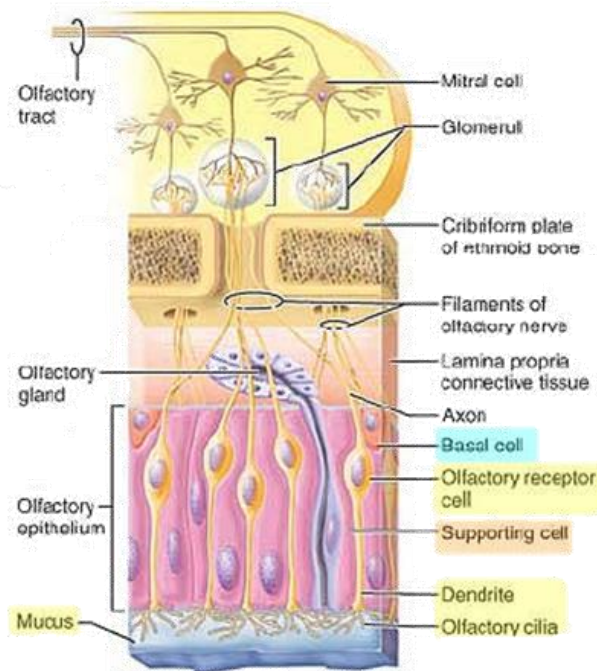
### 1.1.1. Anatomia e fisiologia

A maior parte da cavidade nasal está envolvida na respiração, sendo apenas uma pequena parte superior dedicada ao olfato. Durante a respiração normal, o ar passa através da cavidade nasal sem que grande parte dele entre em contato com o epitélio olfativo (EO) (Seeley 2008).

O EO localiza-se na porção superior da cavidade nasal e é caracterizado como um epitélio pseudo-estratificado (Marieb & Hoeh 2007). É constituído por células morfológica e fisiologicamente distintas, como neurónios sensoriais olfativos (OSNs-*olfactory sensory neurons*), células de suporte ou de sustentação e células basais (figura 1) (Mombaerts et al., 1996; Goodenough 1998; Stockhorst & Pietrowsky, 2004).

Um OSN é um neurónio bipolar, com uma única dendrite que possui uma protuberância na porção terminal, da qual se irradiam vários cílios longos (Marieb & Hoeh 2007). Estes cílios olfativos são ricos em recetores olfativos responsáveis pelos eventos iniciais da via de transdução olfativa (Ronnnett & Moon, 2002; Stockhorst & Pietrowsky 2004). Na outra

extremidade do OSN, um único axônio desmielinizado e não ramificado projeta-se através da lâmina própria e agrupa-se a axônios semelhantes, formando os filamentos do nervo olfativo. Estes projetam-se através de aberturas na placa cribiforme do osso etmóide do nariz até ao bulbo olfativo no cérebro (figura 1) (Marieb & Hoeh 2007; Ronnett & Moon, 2002).



**Figura 1 - Constituição do epitélio olfativo e o trajeto dos axônios dos neurónios sensoriais olfativos.** Adaptada de Marieb & Hoeh 2007.

Os OSNs possuem um tempo de vida curto, devido à sua localização na interface com o meio externo, encontrando-se por isso, muitas vezes expostos a danos contínuos devido por exemplo ao contato com substâncias tóxicas (Marieb & Hoeh 2007; Purves et al 2005; Ronnett & Moon, 2002). Assim, as células basais diferenciam-se e substituem os OSNs ao longo de toda a vida (Mombaerts et al., 1996; Ennis, Hamilton, & Hayar, 2007; Shipley et al, 2008). Os novos OSNs projetam o seu axônio para o bulbo olfativo onde formam novas conexões sinápticas (Shipley et al, 2008).

As células de suporte ou sustentação são células que suportam, nutrem e isolam eletricamente os OSNs. Também secretam moléculas e enzimas desintoxicantes para o muco nasal, como enzimas do tipo citocromo P450, que se pensa serem responsáveis por modificações conformacionais de moléculas, de forma a torná-las menos permeáveis ou até mesmo inativando-as, evitando assim o início da via de transdução olfativa (Ronnett & Moon 2002; Ennis et al. 2007).

A lâmina própria da mucosa nasal contém especializações secretórias, as glândulas de Bowman, que são responsáveis pela secreção do componente seroso do muco que reveste o EO (Shiple et al, 2008).

A mucosa nasal possui ainda macrófagos que isolam e removem o material nocivo, bem como os restos dos OSNs degenerados. Além disso o muco liga e neutraliza agentes químicos potencialmente perigosos e nele são secretados imunoglobulinas que funcionam como uma defesa inicial contra antígenos perigosos (Purves et al 2005).

## **1.1.2. Componentes chave da via da transdução olfativa**

### **1.1.2.1. Recetores olfativos**

Os recetores olfativos (ORs-olfactory receptors) desempenham um papel crucial na deteção dos odores inalados a partir do ar inspirado. Também são importantes no direcionamento dos axónios dos OSNs para o seu correto glomérulo, no bulbo olfativo (Buck 2000; Itakura et al. 2006; DeMaria & Ngai 2010). Como os OSNs sofrem um ciclo de degeneração/regeneração, a organização do sistema olfativo precisa de ser reconstruída com frequência, onde os ORs participam de forma fundamental (Reed 2003; Menini et al. 2004).

A família génica que codifica os ORs nos vertebrados foi descoberta por Buck e Axel em 1991 (Buck & Axel 1991) e desde então a pesquisa sobre os mecanismos moleculares olfativos e as vias de transdução de sinal têm progredido bastante.

Os ORs são uma família de recetores acoplados à proteína G (Buck & Axel 1991). Estima-se que existam mais de 1000 genes que codificam um número equivalente de ORs, o que corresponde à maior família génica do genoma dos mamíferos (Zhang & Firestein 2002; Ronnett & Moon 2002; Kang & Koo 2012), conferindo ao sistema olfativo a capacidade de distinguir uma elevada variedade de moléculas (Young & Trask 2002; Pluznick et al. 2009). Na maior parte dos mamíferos, a maioria destes genes são funcionais (Mombaerts 1999; Ronnett & Moon 2002), mas o genoma humano apresenta um grande número de pseudogenes (Rouquier et al. 1998), pelo que apenas um terço dos ORs parecem ser funcionais, sugerindo que o olfato se tornou menos importante no curso da evolução dos primatas (Zozulya et al. 2001; Ronnett & Moon 2002).

Localizam-se ao longo da superfície ciliar que se estende desde as dendrites apicais dos OSNs até ao muco que reveste a cavidade nasal (Buck & Axel 1991; Lucero 2013). Quando os odores são expostos à cavidade nasal, são reconhecidos seletivamente pelos ORs, o que desencadeia cascatas intracelulares de transdução de sinal, que levam à perceção do olfato no cérebro (Kang & Koo 2012).

Estruturalmente, os ORs são constituídos por 7 subunidades peptídicas transmembranares hidrofóbicas (Fleischer et al. 2009). Diferem entre si apenas em algumas sequências de aminoácidos, principalmente nas que formam os domínios III, IV e V, sugerindo que estes sejam os domínios responsáveis pela discriminação dos diferentes odores (Menini et al. 2004; Mombaerts 2004; Menini 2010).

Tem sido estabelecido que cada OSN possui apenas um tipo de OR e cada recetor é específico para a ligação de um pequeno número de moléculas de odor. Por sua vez, um determinado odor poderá ser detetado por diferentes ORs (Buck & Axel 1991; Malnic et al. 1999; Huart et al. 2013).

Com base na sequência de aminoácidos e na distribuição filogenética, os genes que codificam os ORs podem ser classificados em duas classes distintas: classe I e classe II (Mezler et al. 2001). Esta classificação é baseada na descoberta inicial de que os animais semiaquáticos, como os sapos possuem tanto genes de classe I como de classe II, sugerindo que os ORs de classe I sejam especializados no reconhecimento de odores solúveis na água, enquanto os de classe II sejam ativados por compostos voláteis (Mezler et al. 2001; Ronnett & Moon 2002; Hoover 2013).

Inicialmente pensava-se que os mamíferos não codificassem ORs de classe I; no entanto, verificou-se a existência de genes dessa classe no genoma humano (Glusman et al. 2001), no genoma de ratos e ratinhos (Zhang & Firestein 2002) e noutros mamíferos, sugerindo o seu envolvimento no olfato dos mamíferos (Nimura & Nei 2007).

Uma hipótese defendida por alguns autores sugere que os ORs de classe I nos mamíferos pode ter evoluído para reconhecer compostos voláteis, embora ainda sejam mais sensíveis aos compostos relativamente hidrofílicos, enquanto a classe II reconhece compostos mais hidrofóbicos (Zhang & Firestein 2002).

Na espécie humana, os ORs que pertencem à classe II localizam-se em mais do que um cromossoma, enquanto que todos os ORs de classe I pertencem a uma única família génica, onde apenas metade destes ORs parecem ser funcionais (Glusman et al. 2001).

#### **1.1.2.2. Proteína G específica do olfato**

A primeira evidência do envolvimento das proteínas G na via de transdução olfativa surgiu da demonstração que a estimulação induzida por odores nos cílios olfativos dependia da presença de guanosina trifosfato (GTP) (Rhein & Cagan 1983).

A proteína de ligação à Guanina, também conhecida como proteína G, é um complexo proteico membranar (Hurowitz et al. 2000) que se localiza na face interna da membrana

celular (Morales et al. 1998). Desempenha um papel importante na transdução de sinal em diferentes vias de sinalização (Hurowitz et al. 2000; Wackym et al. 2005).

A proteína G é constituída por 3 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), onde  $\beta\gamma$  funcionam como um único componente, que só se dissocia em condições de desnaturação, representando assim, um monómero funcional (Wackym et al. 2005). A forma inativa da proteína G trimérica possui guanosina difosfato (GDP) ligado à subunidade  $\alpha$  que por sua vez está ligada à subunidade  $\beta\gamma$ . Nesta forma o trímico pode interagir com um recetor na superfície da célula (como um OR). Após a ligação do ligando, o recetor fica ativo e catalisa a troca de GDP por GTP na subunidade  $\alpha$ , conduzindo à dissociação de  $\alpha$ GTP do dímero  $\beta\gamma$  (Morales et al. 1998; Wilkinson et al. 1999). Assim,  $\alpha$ GTP está livre para modular a atividade de uma variedade de efetores, como canais de iões ou enzimas (Wettschureck & Offermanns 2005).

A subunidade  $\alpha$  é considerada o componente funcional do complexo proteico da proteína G porque interage tanto com o recetor que lhe está acoplado como com as moléculas efetoras da cascata de sinalização (Wackym et al. 2005).

Resumindo, a proteína G tem como função a transdução de sinal de recetores membranares específicos (como os ORs) para moléculas efetoras como a adenilato ciclase 3, a fosfolipase C e canais iónicos. Esta proteína regula a formação de adenosina monofosfato cíclico (*cAMP-Cyclic adenosine monophosphate*), a mobilização de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular e a indução de potenciais de membrana (Wackym et al. 2005).

De acordo com a função da sua subunidade  $\alpha$ , as proteínas G são classificadas em 4 subfamílias: *Gas*, *Gai/o*, *Gaq*, *G $\alpha$ 12* (Wackym et al. 2005; Hurowitz et al. 2000), onde a *Gas* é responsável pela ativação da adenilato ciclase, a *Gai/o* pela inibição da adenilato ciclase, a *Gaq* pela da ativação da fosfolipase C e a *G $\alpha$ 12* pela ativação da fosfolipase D (Milligan & Kostenis 2006).

A proteína *G $\alpha$ olf* ou proteína G específica do olfato é uma isoforma da subunidade  $\alpha$  da proteína G, específica da transdução olfativa. É considerada um membro da família da *Gas* pois partilha 88% da homologia dos aminoácidos com a *Gas* (Wackym et al. 2005). Na via de transdução olfativa é responsável pela ativação da adenilato ciclase 3.

### **1.1.2.3. Adenilato ciclase tipo 3**

A adenilato ciclase (AC) é uma proteína responsável pela conversão da adenosina trifosfato (ATP) em cAMP, um importante segundo mensageiro na sinalização celular (Hanoune & Defer 2001; Sadana & Dessauer 2009; Brand et al. 2013).

Nos mamíferos existem pelo menos nove isoformas conhecidas da AC (AC1 - AC9), expressas apenas em alguns tecidos e com capacidade de receber sinais de uma variedade de fontes, incluindo proteínas G, cinases e fosfatases (Hanoune & Defer 2001).

Foi também descrito um tipo de AC solúvel (sAC- *soluble adenylyl cyclase*), presente no citoplasma e em alguns organelos celulares, cuja atividade é regulada por  $Ca^{2+}$  e por bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) (Chen et al. 2000; Litvin et al. 2003; Sadana & Dessauer 2009).

No EO é expresso a AC3 que se encontra predominantemente nos OSNs (Wei et al. 1998) (figura 2). É uma proteína integral de membrana com 12 domínios transmembranares e com ambas as extremidades (C- e N-terminal) do lado intracelular (viradas para o citoplasma). O domínio catalítico está localizado entre os domínios transmembranares 6 e 7, sendo responsável pela conversão do ATP em cAMP, uma molécula que desempenha um papel fundamental no olfato como segundo mensageiro e medeia a transdução de sinal para uma grande variedade de odores (Menini 2010).

#### **1.1.2.4. Canais nucleotídicos cíclicos**

Nakamura e Gold em 1987 descobriram que a membrana ciliar olfativa possuía canais nucleótidos cíclicos (CNGs - cyclic nucleotide-gated channels), posteriormente verificaram que estes canais são necessários para a transdução olfativa (Nakamura & Gold 1987; Kleene 2008).

Os CNGs são um grupo de canais permeáveis ao  $Ca^{2+}$  ativados pelo cAMP (Kaupp & Seifert 2002).

Ao nível da membrana ciliar, a informação resultante da interação do odor com um OR é transmitida sob a forma de sinal químico que ao nível do CNG é convertida num sinal elétrico, pela ativação do fluxo iónico através da membrana plasmática (Menini 2010). O cAMP ao ligar-se ao CNG ativa-o, promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  e sódio ( $Na^+$ ) para o interior do OSN provocando a sua despolarização (Ennis et al. 2007; Menini 2010; DeMaria & Ngai 2010).

Estruturalmente, os CNGs são proteínas membranares constituídas por quatro subunidades: duas subunidades CNGA2, uma CNGA4 e uma CNGB1b (Zheng & Zagotta 2004; Menini 2010; Podda & Grassi 2013). Cada subunidade possui 6 domínios transmembranares (S1-S6) e uma região que forma o poro, entre os domínios S5 e S6 (Menini 2010; Podda & Grassi 2013). Do ponto de vista funcional, podem ser considerados canais iónicos dependentes de ligandos, sendo que esta ligação ao cAMP ocorre do lado citoplasmático da membrana celular (Podda & Grassi 2013).

### 1.1.3. Transdução quimiossensorial olfativa

As moléculas transportadas no ar entram na cavidade nasal e dissolvem-se no muco que reveste o EO (Seeley 2008). Algumas destas moléculas ligam-se aos ORs, dando início à transdução olfativa (Kang & Koo 2012).

A interação entre um odor e um OR induz a ativação da subunidade  $\alpha$ , a  $G_{olf}$ , que se encontra acoplada ao OR. Esta subunidade proteica liga-se e ativa a AC3, que catalisa a conversão do ATP em cAMP. Por sua vez, o cAMP liga-se ao CNG e ativa-o (Ennis et al. 2007; Menini 2010; Kang & Koo 2012; Lucero 2013; Foster et al. 2014). Esta ativação promove o influxo de  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$  para o interior do OSN provocando a sua despolarização (Menini 1999; Ennis et al. 2007; Menini 2010; DeMaria & Ngai 2010; Kang & Koo 2012). Induzida pelo aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ , esta despolarização pode ser amplificada pela abertura dos canais de cloreto ( $Cl^-$ ), que promovem um efluxo de  $Cl^-$  (Ennis et al. 2007; DeMaria & Ngai 2010; Menini 2010) (figura 2). A despolarização propaga-se dos cílios para o cone de implantação do OSN, onde são gerados potenciais de ação e propagados ao longo do axónio até aos terminais sinápticos no glómulo do bulbo olfativo (Menini 1999; Purves et al 2005).

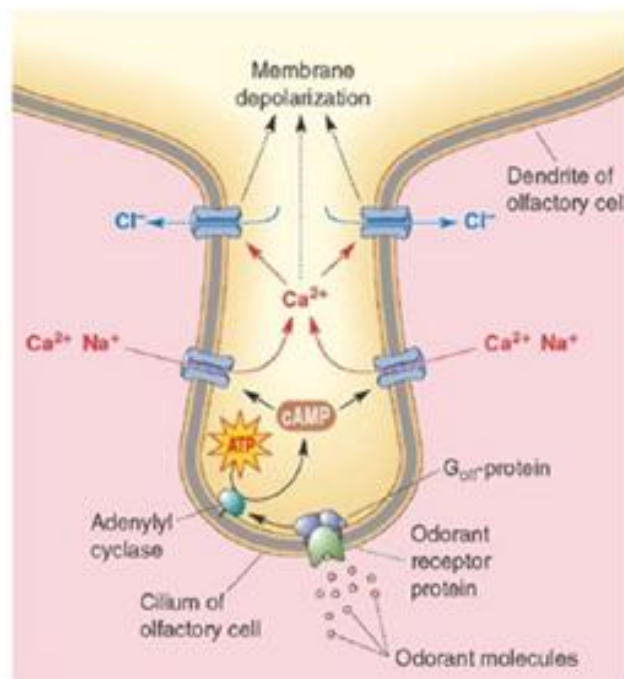


Figura 2 - Cascata de sinalização intracelular implicada na transdução quimiossensorial olfativa, nas membranas ciliares dos neurónios sensoriais olfativos. Retirada de Du et al. 2013.

No bulbo olfativo ocorrem sinapses com as células mitraes. Quando estas são ativadas, os impulsos propagam-se do bulbo olfativo pelos tratos olfativos para duas vias. A primeira termina no córtex piriforme e córtex orbito-frontal onde os cheiros são conscientemente interpretados e identificados e a segunda no hipotálamo, amígdala e outras regiões do

sistema límbico, os quais desencadeiam respostas emocionais aos odores (Buck 2000; Marieb & Hoeh 2007) (figura 3).

Um princípio fundamental da organização funcional do sistema olfativo é que cada glomérulo recebe estímulos sensoriais de OSNs que têm perfis de resposta a odores idênticos (Menini et al. 2004; Shipley et al 2008).

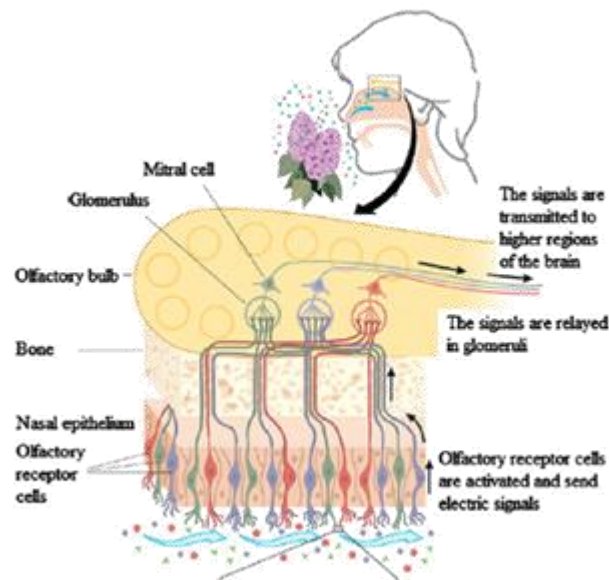


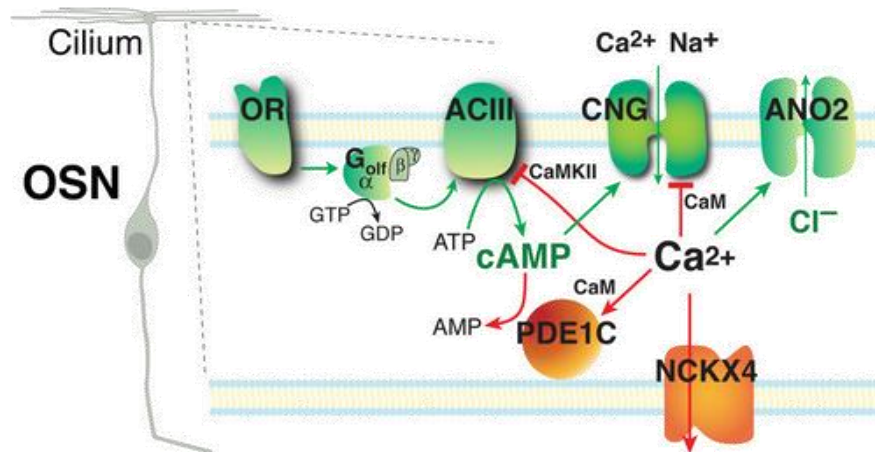
Figura 3 - Estrutura do sistema olfativo humano. Retirada de Rinaldi 2007.

Estudos em ratinhos *knockout* mostraram que a inativação de qualquer um dos principais elementos da transdução de sinal da via olfativa (Golf, AC3 ou CNG) resulta num fenótipo anósmico, ou seja, existe uma perda da resposta comportamental a odores (Brunet et al. 1996; Belluscio et al. 1998; Wong et al. 2000).

Na presença de um cheiro persistente no ambiente, o sistema olfativo sofre adaptação, ou seja, redução da percepção do odor (Shipley et al 2008). Alguns autores defendem que esses mecanismos de inativação da via olfativa compreendem (figura 4):

- a) Por feedback negativo, o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular ativa a calmodulina (CaM), e este complexo  $Ca^{2+}$ -CaM liga-se ao CNG, reduzindo a sua afinidade pelo cAMP, resultando na inativação do canal e conseqüentemente da via olfativa (Bradley et al. 2001; Ronnett & Moon 2002; Bradley et al. 2005);
- b) O complexo  $Ca^{2+}$ -CaM pode também ativar a CaM cinase II (CaMKII), que conduz à fosforilação de AC3, o que reduz a produção de cAMP (Wei et al. 1998; Leinders-Zufall et al. 1999; Bradley et al. 2005);

- c) A fosfodiesterase 1C (PDE1C- phosphodiesterase 1C) ligada ao complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (PDE1C/ $\text{Ca}^{2+}$ -CaM) realiza hidrólise do cAMP impedindo assim que este se ligue ao CNG (Borisy et al. 1992; Yan et al. 1995; Ronnett & Moon 2002; Bradley et al. 2005);
- d) A existência de um permutador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCKX4) que medeia a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  dos OSNs. NCKX4 é uma proteína transmembranar que aproveita a energia armazenada pelo gradiente eletroquímico da passagem de  $\text{Na}^+$  através da membrana plasmática e transfere ativamente o  $\text{Ca}^{2+}$  contra o gradiente eletroquímico (Reisert & Matthews 1998; Stephan et al. 2011).



**Figura 4 - Mecanismos de adaptação do sistema olfativo.** As setas verdes representam os passos da via de transdução olfativa e as setas vermelhas representam mecanismos de inativação da via. OSN- neurónio sensorial olfativo; OR- recetor olfativo;  $G_{olf}$ - proteína G específica do olfato; GTP- Guanosina trifosfato; GDP- Guanosina difosfato; ACIII- Adenilato Ciclase 3; ATP- Adenosina Trifosfato; AMP- Adenosina Monofosfato; cAMP- Adenosina Monofosfato Cíclico;  $\text{Ca}^{2+}$ - íon cálcio; CaM- Calmodulina; CaMKII- Calmodulina cinase II; PDE1C- Fosfodiesterase 1C; CNG2- Canal Nucleotídeo Cíclico;  $\text{Cl}^-$ - íon cloreto;  $\text{Na}^+$ - íon sódio; ANO<sub>2</sub>- canal de cloreto; NCKX4- um permutador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Adaptada de Bradley et al. 2005.

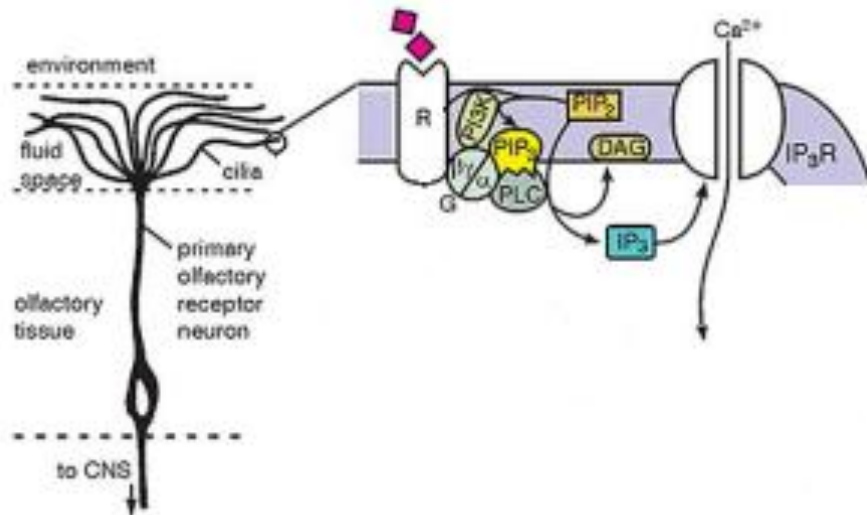
#### 1.1.4. Outra via de transdução olfativa

Alguns estudos demonstraram o envolvimento de um segundo mensageiro, que não o cAMP, mas sim o inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) na transdução olfativa em meio aquoso.

Huque e Bruch identificaram em peixes-gato que em resposta a certos odores ocorria um aumento na conversão de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), um fosfolípido que se encontra na membrana plasmática, a  $\text{IP}_3$  e diacilglicerol (DAG). Essa reação era catalisada pela fosfolipase C (PLC) (Huque & Bruch 1986). Posteriormente, esta via de transdução olfativa foi também identificada em lagostas. Além disso, foi também identificado um recetor de  $\text{IP}_3$  na membrana ciliar de peixes-gato e lagostas, posicionando o  $\text{IP}_3$  para desencadear o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Restrepo et al. 1990; Fadool & Ache 1992). As moléculas de  $\text{IP}_3$  desempenham também um papel na libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado, a partir do retículo

endoplasmático (RE), devido à ligação do  $IP_3$  aos seus recetores presentes na membrana do retículo (Ronnnett & Moon 2002).

Assim, a PLC hidrolisa o  $PIP_2$ , que dá origem ao DAG e ao  $IP_3$ . O DAG permanece na membrana e o  $IP_3$  é libertado e desencadeia a libertação de  $Ca^{2+}$  e posterior despolarização da membrana do OSN (Ronnnett & Moon 2002) (figura 5).



**Figura 5 - Outra via de transdução olfativa.** R- recetor olfativo; PLC- fosfolipase C;  $PIP_2$ - fosfatidilinositol 4,5-bifosfato;  $IP_3$ - inositol trifosfato; DAG- diacilglicerol;  $Ca^{2+}$ - íon cálcio;  $IP_3R$ - recetor de  $IP_3$ . Adaptado de (Ache & Young 2005).

### 1.1.5. Transdução Olfativa fora do sistema olfativo

Inicialmente, a expressão dos componentes da via de transdução olfativa, só foi identificada nos OSNs do EO, mas vários estudos posteriores têm vindo a demonstrar a sua expressão em diferentes tecidos e tipos celulares. A relevância funcional da ativação desta via de transdução fora do EO não está ainda esclarecida, mas têm sido propostas funções sensoriais em diferentes órgãos/sistemas, como o rim, placenta, a língua ou o intestino (Feldmesser et al. 2006) (Tabela 1).

Tabela 1 - Componentes da via de transdução olfativa fora do epitélio olfativo.

Local	Espécie	Componentes da via de transdução olfativa	Referência
Testículo Espermatozoide	Humano Rato Ratinho	AC3 Gaolf hOR17-4 OR1D2 OR7A5 OR4D1 MOR23 MOR171-31 MOR244-3 MOR248-11 MOR31-2 MOR139-3	(Vanderhaeghen et al. 1997) (Gautier-Courteille et al. 1998) (Defer et al. 1998) (Spehr et al. 2003) (Fukuda et al. 2004) (Vosshall 2004) (Fukuda & Touhara 2006) (Veitinger et al. 2011)
Placenta	Rato Ratinho	Gaolf MOR125-1 MOR126-1 MOR140-1 MOR263-9 MOR145-5 MOR216-1 Olfr154 Olfr433 Olfr520 Olfr1381	(Itakura et al. 2006) (Mao et al. 2010)
Rim	Rato	AC3 Gaolf Olfr78 Olfr90 Olfr1373 Olfr1392 Olfr1393	(Pluznick et al. 2009) (Pluznick et al. 2013)
Língua	Ratinho Humano	OR10A4 OR2K2 OR5P2 OR1E1 OR8B8 OR5P3 OR8D1 OR8D2 OR10A5	(Gaudin et al. 2006)
Musculo	Ratinho	AC3 Gaolf MOR23	(Griffin et al. 2009)
Intestino	Humano	OR73 hOR17-7/11 OR1G1 hOR17-210	(Braun et al. 2007)

## 1.2. Plexo Coroideu

O sistema ventricular encefálico é constituído por dois ventrículos laterais, o 3º e o 4º ventrículo, que são contínuos entre si e com o canal central da medula espinal (Marieb & Hoeh 2007), preenchidos por líquido cefalorraquidiano (CSF - cerebrospinal fluid) (Redzic & Segal 2004).

Os ventrículos laterais estão localizados profundamente em cada hemisfério cerebral e separados entre si por finos septos que se fundem e constituem o septo pelúcido. Cada ventrículo lateral comunica com o 3º ventrículo no diencéfalo através do forâmen interventricular ou de Monro e é contínuo com o 4º ventrículo por um canal denominado aqueduto mesencefálico ou de Sylvius. O 4º ventrículo atravessa o mesencéfalo e estende-se até à protuberância e bolbo raquidiano, sendo contínuo inferiormente com o canal central da medula espinal (Marieb & Hoeh 2007; Seeley 2008). O 4º ventrículo está também em continuidade com o espaço subaracnoideu (espaço amplo entre duas meninges encefálicas: a aracnóideia e a pia-máter) por três orifícios: os forâmens de Lushka e o forâmen de Magendie (Seeley 2008).

O sistema ventricular é revestido internamente por um epitélio denominado epêndima e cada um dos ventrículos aloja no seu interior uma estrutura vascularizada, em franja, conhecida como plexo coroideu (CP - choroid plexus) (figura 6) (Redzic & Segal 2004).

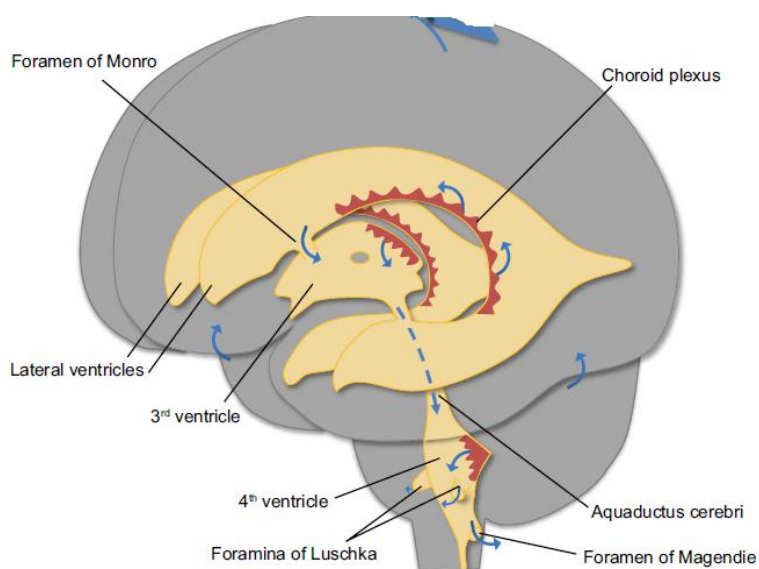


Figura 6 - Sistema ventricular cerebral. Adaptada de Damkier et al. 2013.

Os CPs são estruturas membranares finas que comunicam com o epêndima e flutuam no CSF que preenche os quatro ventrículos (Redzic & Segal 2004). São compostos por uma única

camada de células epiteliais coróides (CPEC - *Choroid Plexus Epithelial Cells*) que derivam das células endodimárias da parede dos ventrículos. A camada de CPEC reveste o estroma que possui numerosas fibras de colagénio, fibroblastos, células do sistema imunológico, tais como células dendríticas e macrófagos e uma rede de capilares com endotélio fenestrado altamente permeáveis (Brown et al. 2004; Thouvenot et al. 2006; Skipor & Thiery 2008; Falcão et al. 2012) (figura 7).

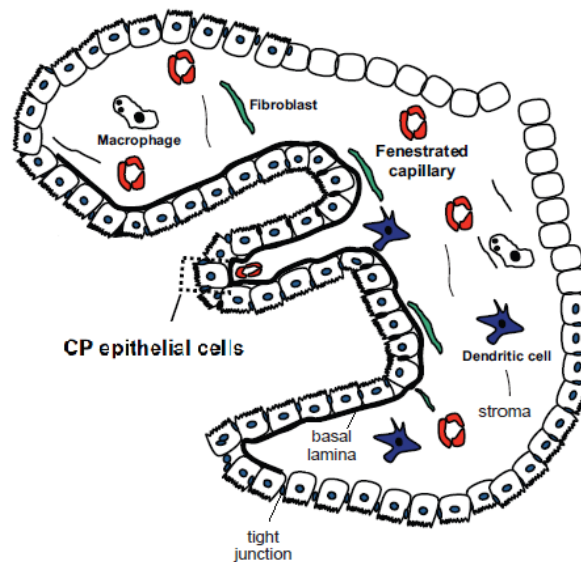


Figura 7 - Representação morfológica do CP. Adaptada de Falcão et al. 2012.

Esta estrutura é fortemente irrigada, o que lhe proporciona uma cor rosada. Possui também um aspeto rendilhado devido às suas inúmeras vilosidades, o que lhe permite ser facilmente distinguido dos capilares sanguíneos cerebrais (Redzic & Segal 2004; Emerich et al. 2005).

As CPEC possuem um grande núcleo esférico e um citoplasma abundante com numerosas mitocôndrias, fundamentais para a sua alta taxa metabólica e exigências de energia (Dohrmann 1970; Cornford et al. 1997). Exibem uma morfologia celular polarizada, pois possuem: 1) uma superfície apical (de frente para os ventrículos e, conseqüentemente, para o CSF), composta por um grande número de microvilosidades que aumentam a área de contato com o CSF; 2) uma membrana basal (virada para o tecido conjuntivo e, portanto, do lado do sangue) com aspeto liso e uma grande área de superfície, sendo responsável pelas trocas entre o sangue e o CP; e 3) as membranas laterais, a superfície de contato entre células epiteliais adjacentes (Falcão et al. 2012). Na porção mais apical das membranas laterais, as células epiteliais coróides estão unidas por *tight junctions* que limitam a passagem de iões e moléculas entre o sangue e o CSF (Vorbrot & Dobrogowska 2003; Emerich et al. 2004; Redzic & Segal 2004).

O CP constitui a barreira sangue-CSF, formada pela única camada de CPEC que separa o sangue do CSF. Esta barreira epitelial possui grande importância funcional, pois, o endotélio

fenestrado dos capilares do CP é bastante permeável a moléculas transportadas no sangue (Vorbrodt & Dobrogowska 2003).

### **1.2.1. Funções**

Devido à sua localização, o CP constitui a interface entre o sangue e o CSF, estando envolvido em vários processos que visam a monitorização e manutenção da homeostasia do sistema nervoso central (SNC) (Emerich et al. 2005; Thouvenot et al. 2006).

Possui como principais funções: a produção e secreção do CSF; produção de vários peptídeos que podem ter propriedades nutritivas e neuroprotetoras e desempenha um papel essencial na remoção de catabolitos de neurotransmissores e substâncias tóxicas do CSF para a corrente sanguínea, bem como transporte de nutrientes do sangue para o CSF (Chodobski & Szmydynger-Chodobska 2001; Serot et al. 2003; Emerich et al. 2005; Thouvenot et al. 2006). Além disso, as CPEC possuem vários transportadores e recetores para diferentes tipos de moléculas, tanto do lado basal como apical, tais como neurotransmissores, citocinas e hormonas esteroides sexuais (Falcão et al. 2012).

#### **1.2.1.1. Produção e secreção de CSF**

Uma das funções mais bem caracterizada e estudada do CP é a produção e secreção do CSF.

Num homem, as células epiteliais do CP são responsáveis pela produção do CSF, a uma taxa de ~0,4ml/min (Redzic & Segal 2004; Wolburg & Paulus 2010; Damkier et al. 2013). O volume total de CSF que circula em todo o SNC é em média de 150ml, sendo que cerca de 25% se encontra dentro dos ventrículos e o restante preenche o espaço subaracnoideu e flui em torno do canal central da medula espinhal. Estima-se que sejam produzidos cerca de 500 a 600 ml em 24 horas, sugerindo que o CSF é substituído 3 a 4 vezes por dia (Segal 2000; Redzic & Segal 2004; Emerich et al. 2005; Damkier et al. 2013).

O CSF é produzido por secreção ativa e requer energia na forma de ATP. O CP regula a composição do CSF através de processos de transporte ativo e seletivo (Gao & Meier 2001). ATPases ( $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ ), canais iónicos, transportadores e aquaporinas (proteínas que medeiam o movimento de  $\text{H}_2\text{O}$  através das membranas celulares), distribuídos de modo desigual no lado apical e basal das células epiteliais, medeiam este processo (Ronnelt & Moon 2002; Emerich et al. 2005; Mortazavi et al. 2014). Ocorre o transporte unidirecional de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$  do sangue para os ventrículos, enquanto o potássio ( $\text{K}^+$ ) se move na direção oposta. O movimento destes iões cria um gradiente osmótico que impulsiona a secreção de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  na direção dos ventrículos (Emerich et al. 2004; Brown et al. 2004; Mortazavi et al. 2014). O  $\text{HCO}_3^-$  pode também ser sintetizado nas células epiteliais, por

hidratação do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), pela enzima anidrase carbônica (Speake et al. 2001; Redzic & Segal 2004).

O CSF é um líquido incolor, ligeiramente viscoso e com pouca quantidade de células e proteínas. Tem um pH ligeiramente ácido e uma concentração de glucose, proteínas, aminoácidos, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> mais baixa quando comparado com o plasma (Segal 2000; Emerich et al. 2005; Skipor & Thiery 2008).

Uma vez produzido, o CSF circula dos ventrículos laterais, através dos forâmen de Monro para o 3º ventrículo, a partir do qual passa pelo estreito Aqueduto de Sylvius para o 4º ventrículo. Do 4º ventrículo flui para o espaço subaracnoideu através dos forâmen de Luschka e forâmen de Magendie. Uma vez no espaço subaracnoideu, por via das granulações de Pacchioni (granulações aracnóideias) no seio longitudinal superior, pode ser reciclado para a circulação venosa. Uma pequena parte do CSF circula no canal central da medula espinhal (Emerich et al. 2004; Marieb & Hoeh 2007; Seeley 2008; Zappaterra & Lehtinen 2012). Este fluxo contínuo do CSF é impulsionado por 3 forças: pulsações arteriais do CP, gradiente de pressão hidrostática e movimento ciliar das células endimárias dos ventrículos (Emerich et al. 2004; Zappaterra & Lehtinen 2012).

Uma das funções mais importantes do CSF é a proteção mecânica e redução do peso encefálico bem como o fornecimento de nutrientes essenciais ao SNC (Marieb & Hoeh 2007; Skipor & Thiery 2008). É também responsável pela regulação do ambiente bioquímico extracelular prevenindo a acumulação de produtos tóxicos resultantes do metabolismo cerebral (Redzic & Segal 2004; Emerich et al. 2005).

#### 1.2.1.2. Outras funções

Além da produção e secreção do CSF, o CP sintetiza e secreta vários peptídeos para o CSF que podem ter efeitos autócrinos e/ou parácrinos, pois as CPEC possuem recetores para alguns desses peptídeos. Por outro lado, pode promover efeitos do tipo endócrino, pois os peptídeos podem ser libertados no CSF, alcançando células-alvo distantes no tecido cerebral (Chodobski & Szmydynger-Chodobska 2001).

O CP protege o cérebro de compostos nocivos utilizando um sistema de desintoxicação e monitorização do CSF. Possui altas concentrações de glutatona, cisteína e metalotioneínas que removem agentes tóxicos que circulam no CSF; possui superóxidos dismutase, glutatona peroxidase, redutase e transferase que protegem contra o stress oxidativo e radicais livres; possui ainda sistemas de transporte de iões orgânicos e proteínas resistentes a multidrogas que permitem a exportação de compostos nocivos do CSF (Emerich et al. 2005; Thanos et al. 2010; Mortazavi et al. 2014).

Medeia ainda interações entre o cérebro e o sistema imunológico periférico, possuindo um papel na defesa contra organismos invasores. Tais evidências surgem da presença de células linfóides no CP; da capacidade para induzir localmente citocinas pró-inflamatórias e da expressão de moléculas de complexo major de histocompatibilidade (MHC) nas células epiteliais coroides (Emerich et al. 2005; Mortazavi et al. 2014).

### **1.3. Poliaminas**

As poliaminas são moléculas de baixo peso molecular, presentes nas células de todos os eucariotas e na maioria dos procariotas, essenciais para o normal funcionamento e crescimento celular (Minois et al. 2011).

Encontram-se em diferentes tecidos, órgãos e sistemas, incluindo o SNC, onde têm uma distribuição característica (Yatin 2002). Já foram localizadas em neurónios e células da glia (Carter 1994) e alguns estudos mostraram que a substância branca do cérebro produz grandes quantidades de espermidina (Shaw & Pateman 1973). São encontrados altos níveis de poliaminas no início do desenvolvimento do SNC, que vão diminuindo com a idade (Chaudhuri et al. 1983). Alterações nos níveis das poliaminas têm sido associados com o envelhecimento e com doenças.

Em condições fisiológicas normais, no cérebro humano adulto, as poliaminas encontram-se no CSF nas seguintes concentrações: a putrescina apresenta valores de  $0.13 \pm 0.02$  nM, a cadaverina de  $2.12 \pm 1.48$  nM, a espermidina de  $0.12 \pm 0.01$  nM (Paik et al. 2010) e a espermina de  $0.14 \pm 0.01$  nM (Ekegren & Gomes-Trolin 2005).

A regulação dos níveis de poliaminas é conseguida por um equilíbrio entre os mecanismos de síntese, catabolismo e transporte (Minois et al. 2011).

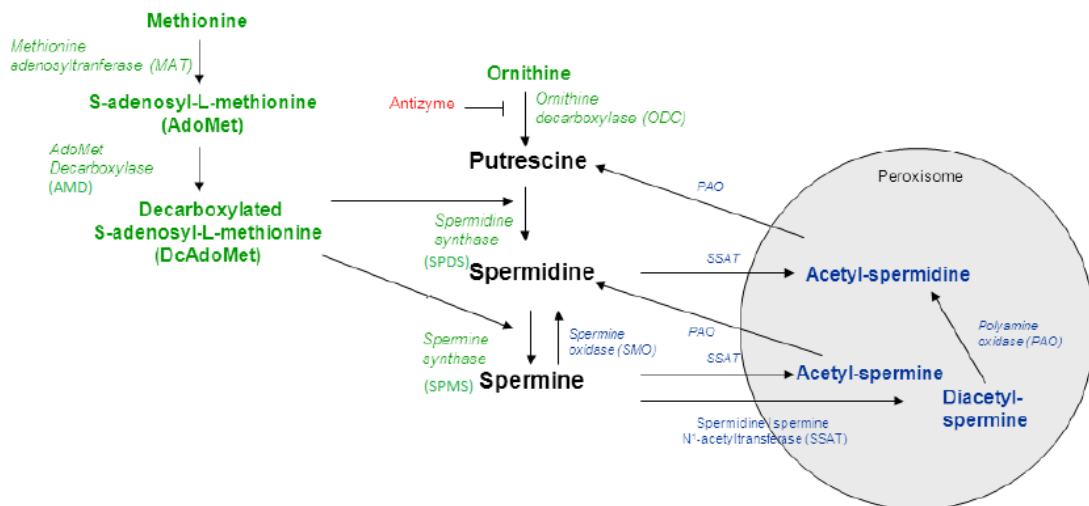
#### **1.3.1. Biossíntese das poliaminas**

As poliaminas são sintetizadas a partir do aminoácido ornitina, que sofre descarboxilação a putrescina, pela ornitina descarboxilase (ODC), enzima limitante na síntese das poliaminas (figura 8). A formação das duas poliaminas subsequentes, a espermidina e espermina, requer um precursor comum, a S-adenosilmetionina descarboxilada, que é produzida pela S-adenosilmetionina descarboxilase (AMD), de onde deriva o grupo aminopropil. Assim a putrescina é convertida em espermidina pela espermidina sintase (SPDS) após adição de um grupo aminopropil à putrescina e a espermina pela espermina sintase (SPMS) por adição de um grupo aminopropil à espermidina (figura 8) (Perez-Leal & Merali 2012; Ramani et al. 2014).

### 1.3.2. Catabolismo das poliaminas

A espermidina e espermina são metabolizados pela espermidina/espermina acetiltransferase (SSAT), enzima limitante no catabolismo das poliaminas, que inativa estas moléculas por acetilação utilizando a acetilcoenzima A (acetil-CoA) como doador. As poliaminas acetiladas podem ser excretadas para fora das células ou recicladas (a espermidina a espermina e a espermidina a putrescina) por oxidação pela poliamina oxidase (PAO) no peroxissoma (Perez-Leal & Merali 2012; Ramani et al. 2014). No citoplasma, a espermina pode ser convertida de novo a espermidina pela espermina oxidase (SMO) (figura 8) (Minois et al. 2011).

A anti-enzima (Azin1) pode ligar-se à ODC facilitando a sua degradação proteossomal, inibindo assim a biossíntese das poliaminas (Minois et al. 2011; Gao et al. 2013).



**Figura 8 - Via biossintética e catabólica das poliaminas.** ODC- ornitina descarboxilase; SPDS- espermidina sintase; SPMS- espermina sintase; SSAT- espermidina/espermina acetiltransferase; PAO- poliamina oxidase; AMD- S-adenosilmetionina descarboxilase. As setas verdes indicam a via biossintética, as setas azuis a via catabólica e a vermelho proteína inibitória. Adaptada de Minois et al. 2011.

### 1.3.3. Funções

As poliaminas desempenham um papel fundamental em muitos processos bioquímicos, incluindo regulação da transcrição e tradução, modulação da atividade enzimática, regulação de canais iônicos, resposta ao stress oxidativo e apoptose. São essenciais para o crescimento celular e a sua síntese aumenta proporcionalmente com o aumento da proliferação celular (Agostinelli et al. 2010; Minois et al. 2011; Perez-Leal & Merali 2012). Estão envolvidas em algumas doenças, como por exemplo no cancro, onde altos níveis de poliaminas são observados nas células cancerosas (Minois et al. 2011).

A importância das poliaminas na proliferação celular envolve a sua interação com a atividade da fosfoproteína nuclear, p53, que desempenha um papel essencial na regulação de vários genes envolvidos no crescimento e morte celular (Moinard et al. 2005).

Regulam a morte celular, particularmente a apoptose, pois uma acumulação excessiva de poliaminas pode provocar stress oxidativo devido à acumulação de peróxido de hidrogénio proveniente do catabolismo através da enzima PAO (Moinard et al. 2005).

As concentrações intracelulares de poliaminas são responsáveis por regular pontos importantes de controlo celulares dentro do ciclo celular, e isto pode, em parte, explicar porque as suas concentrações são estritamente controladas durante todo o ciclo celular (Li et al. 2007).

## **Capítulo 2**

### **Objetivos**



## 2. Objetivos

Um estudo de *microarrays* de cDNA em CP de ratos machos e fêmeas, realizado pelo nosso grupo de investigação, revelou a expressão de um grupo de genes relacionados com a via de transdução olfativa. Na sequência destes resultados, comprovou-se também a expressão de alguns genes e proteínas que constituem a via de transdução olfativa em CP de rato, nomeadamente da AC3 e Golf, estando ainda por esclarecer a sua relevância funcional.

Sugerindo-se que a via de transdução olfativa, possa estar funcional no CP, como um mecanismo quimiossensorial de vigilância do CSF e assim contribuir para a regulação da homeostase cerebral, o presente trabalho tem como principais objetivos:

- I) Concluir o estudo da expressão e localização celular dos componentes que constituem a via de transdução olfativa no CP de rato;
- II) Montar e otimizar a técnica  $Ca^{2+}$  *imaging* para medir as concentrações intracelulares de  $Ca^{2+}$  e assim testar a “resposta olfativa” de culturas primárias de CPEC de rato, às poliaminas (compostos existentes no CSF, que se mostrou provocarem uma resposta eletrofisiológica em CP de ratos);
- III) Analisar a expressão das enzimas da via biossintética e da via catabólica das poliaminas, no CP.



# **Capítulo 3**

## **Materiais e Métodos**



## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Animais

Todos os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os requisitos éticos de pesquisa animal e com a convenção europeia para a proteção dos animais vertebrados utilizados para fins experimentais ou outros propósitos científicos (Diretiva 2010/63/EU).

Foram utilizados ratos adultos *Wistar Han*, machos, fêmeas e fêmeas grávidas. Os animais foram anestesiados, via peritoneal, com uma mistura injetável de cetamina/xilazina, numa proporção de 2:1 e sacrificados por decapitação, aproveitando-se a sua cabeça. Após remoção do cérebro, os CPs foram recolhidos dos ventrículos laterais, congelados em azoto líquido e conservados a -80°C para posterior extração de RNA total ou de proteínas.

Para a cultura primária de CPEC e para imunohistoquímica de fluorescência por *whole-mount* foram utilizados ratos *Wistar Han* com 3 a 6 dias, aos quais foram retirados os CPs dos ventrículos laterais.

### 3.2. Cultura primária de células epiteliais do plexo coroideu (CPEC)

O método pelo qual foi estabelecido a cultura primária de CPEC encontra-se descrito por Quintela et al (Quintela et al. 2009). Para tal, recolheram-se os CPs dos ventrículos laterais para uma solução de tampão fosfato salino (PBS- *phosphate buffered saline*). Uma vez recolhidos os CPs procedeu-se à digestão dos mesmos com 0,2% pronase (Sigma) em PBS durante 5 minutos a 37°C. Os tecidos pré-digeridos foram recolhidos por centrifugação em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma) com 10% de soro fetal bovino (FBS- Fetal Bovine Serume) 100U/mL de antibiótico (penicilina e estreptomicina; Sigma) e centrifugados a 400xg durante 2 minutos. Retirou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram ressuspensas em DMEM completo e novamente centrifugado a 400xg durante 2 minutos. Retirou-se novamente o sobrenadante e as células sedimentadas foram ressuspensas em DMEM suplementado com 100units/mL de antibióticos, 10% FBS, 10ng/mL fator de crescimento epidérmico (EGF- *Epidermal Growth Factor*, Sigma), 5µg/mL insulina (Sigma), 20µM citosina-arabinosídeo (Ara-C, *cytosine arabinoside*, Sigma). As células foram plaqueadas em placas de 12 poços, para imunocitoquímica, e em placas de 2 poços (Ibidi), para *single cell calcium imaging*, em DMEM suplementado e incubadas a 37°C com uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>. O meio de cultura das células foi mudado no dia seguinte e a cada dois dias até se encontrarem diferenciadas.

### 3.3. Extração de RNA total

Sendo o RNA um ácido nucleico em cadeia simples extremamente lábil, todo o procedimento foi realizado em gelo. A dificuldade de obter sequências de RNA íntegras e puras provém principalmente da degradação enzimática por ribonucleases (RNases), pelo que é necessário utilizar agentes desnaturantes fortes, que efetuam lise celular e inativam as RNases, e água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), que inativa as RNases.

A extração de RNA foi efetuada utilizando TRIzol® Reagent (Sigma-Aldrich), uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, de acordo com as recomendações do fabricante (1mL TRIzol/100 mg de tecido). Assim, adicionaram-se 300 µL de TRIzol a cada microtubo que continha 1 par de CPs e homogeneizou-se manualmente, com ajuda de um pilão de forma a permitir o rompimento celular e a dissolução dos vários componentes celulares. Após uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, que permitiu a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas, adicionou-se o clorofórmio (200 µL de clorofórmio/1 mL de TRIzol) e homogeneizou-se a amostra por inversão. As amostras foram então incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen) a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, a solução separou-se em três fases: no fundo do tubo obteve-se a fase orgânica (cor rosada) contendo as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio; a interfase contendo o DNA e a fase aquosa (transparente), contendo o RNA. Assim, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo ao qual se adicionou o isopropanol (500 µL de isopropanol/1mL de TRIzol) e misturou-se por inversão, de forma a permitir a recuperação do RNA por precipitação. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 4°C durante 10 minutos a 12000 xg, rejeitou-se o sobrenadante. O RNA, sob forma de um precipitado branco (sedimento), foi lavado com 500 µL de etanol 75% em H<sub>2</sub>O DEPC (-20°C), centrifugou-se a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C, tendo-se rejeitado novamente o sobrenadante. Por fim, depois de seco, o precipitado de RNA foi re-hidratado em H<sub>2</sub>O DEPC e armazenado a -80°C para uso posterior.

#### 3.3.1. Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA foi realizada utilizando o nanoespectrofotômetro (Nanophotometer™, Implen), por medição das absorvâncias a 260nm (A<sub>260</sub>) e 280nm (A<sub>280</sub>), calculando-se então a concentração de RNA através da A<sub>260</sub> ( $A_{260} = \epsilon bc$ , Lei da Lambert Beer, sendo  $\epsilon = 25 \text{cm}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ) e o grau de pureza através da razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. Considera-se que o RNA está puro quando a razão entre as absorvências se encontra no intervalo entre 1,8 e 2,1.

### 3.3.2. Determinação da integridade do RNA total

A integridade do RNA foi analisada numa eletroforese do RNA em gel de agarose a 1% corado com *GreenSafe Premium* (NZYTech). Pesou-se 0,4g de agarose (Invitrogen), adicionou-se 40mL de Tampão TAE 1x, diluído em H<sub>2</sub>O DEPC, e dissolveu-se por aquecimento no microondas. Arrefeceu-se um pouco e adicionou-se 1µL de *GreenSafe Premium*, agente intercalante dos ácidos nucleicos. As amostras foram preparadas com 2 µL de amostra, 8 µL de H<sub>2</sub>O DEPC e 1 µL de loading buffer 10x (Bioline) e depositadas no gel. Após a corrida da eletroforese a 100 V durante 30 minutos, visualizou-se o gel no transiluminador e adquiriu-se a imagem (UVitec Cambridge).

A qualidade do RNA foi confirmada pela presença de 2 bandas de rRNA (RNA ribossomal), 18S e 28S, onde a banda 28S deve apresentar aproximadamente o dobro da intensidade da 18S. Caso o RNA estivesse degradado, esta proporção estaria alterada, podendo mesmo não se observar qualquer banda mas sim um arrastamento.

### 3.4. Síntese de cDNA

O cDNA (DNA complementar) é sintetizado a partir da transcrição reversa do RNA, por ação da enzima transcriptase reversa, obtendo-se como produto final, uma cadeia dupla de cDNA complementar à sequência de RNA.

Antes de se proceder à síntese de cDNA, o RNA total, isolado de CP, foi sujeito a um pré-tratamento com a enzima DNase I (Sigma-Aldrich) de forma a degradar vestígios de DNA genómico, que pudesse estar presente na amostra. Para tal, adicionou-se, num microtubo de 200 µl, um volume equivalente a 1µg de RNA, 1µL de Reaction Buffer 10X, 1µL DNase I (1U/µL) (Sigma-Aldrich) e H<sub>2</sub>O DEPC até perfazer um volume final de 8µL. Os microtubos foram colocados no termociclador (Multigene Optimax Labnet) a 37°C durante 15 minutos e parou-se a reação com 1µL de Stop Solution (EDTA 50mM) cuja função é quelatar os iões Ca<sup>2+</sup> e magnésio (Mg<sup>2+</sup>) e, deste modo, inativar a DNase I. Os microtubos foram aquecidos a 70°C durante 10 minutos de forma a desnaturar a DNase I e posteriormente colocados em gelo.

Para a síntese de cDNA foi também efetuado um tubo controlo, sem transcriptase reversa, de modo a detetar possíveis contaminações com DNA genómico.

Para a transcrição reversa, preparou-se uma MIX1 (para n+1 reações) num microtubo, com 2 µL de Random Primers e 1 µL de desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) por cada amostra. De seguida, adicionaram-se 3 µL da MIX1 a cada tubo PCR que já continha o RNA tratado com DNase I, perfazendo um volume total de 13 µL com H<sub>2</sub>O estéril. Os tubos foram então colocados no termociclador (Multigene Optimax Labnet) a 65°C durante 5 minutos e imediatamente arrefecidos em gelo. De seguida preparou-se uma MIX2 num microtubo com 4

$\mu\text{L}$  de tampão RT (5x First-Strand Buffer; Invitrogen) e 2  $\mu\text{L}$  de DTT (100 mM; Invitrogen) por cada amostra. Adicionaram-se 6  $\mu\text{L}$  da MIX2 a cada tubo PCR e foram colocados a 37°C durante 2 minutos. Adicionou-se por fim, aos tubos devidos, 1  $\mu\text{L}$  de M-MLV RT (Invitrogen) e aos outros 1  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O estéril e seguiram-se uma série de incubações: a 25°C durante 10 minutos, a 37°C durante 50 minutos e a 70°C durante 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

### 3.5. Amplificação enzimática de DNA (PCR)

Através do método de Reação de Amplificação em Cadeia (PCR- *Polymerase Chain Reaction*) é possível amplificar uma sequência específica de DNA, pela utilização de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), cada um deles complementar a cada uma das extremidades da sequência a amplificar.

Para analisar a expressão dos genes que codificam as enzimas da via biossintética e via catabólica das poliaminas no CP, utilizou-se a técnica de PCR, amplificando-se o cDNA com *primers* específicos cujas sequências se encontram representadas na tabela 2. Relativamente ao estudo da expressão dos genes que codificam os ORs, utilizaram-se *primers* degenerados (Braun et al. 2007) cujas sequências também se encontram representadas na tabela 2. Estes *primers* degenerados reconhecem regiões gênicas que codificam os domínios conservados dos ORs (Vanderhaeghen et al. 1997).

De forma a amplificar os cDNAs dos genes em estudo, realizaram-se reações de PCR utilizando a Taq DNA Polimerase (NZYtech), segundo o recomendado no protocolo do fabricante. Por cada reação adicionaram-se 2.5  $\mu\text{L}$  de *Buffer 10x* (NZYtech), 1.5  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (NZYtech), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM) (NZYtech), 0.2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polimerase, 0.3  $\mu\text{L}$  de *primer* direto (25  $\mu\text{mol}$ ) e 0.3  $\mu\text{L}$  de *primer* reverso (25  $\mu\text{mol}$ ). Por fim, perfez-se com H<sub>2</sub>O estéril para um volume de 23  $\mu\text{L}$ . A cada reação foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de cDNA, à exceção do negativo ao qual foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O estéril. A amplificação do DNA foi efetuada no termociclador (Multigene Optimax Labnet), com o seguinte programa de amplificação: 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos de forma a desnaturar o DNA, 45 segundos na temperatura ótima de emparelhamento do *primer*, e 45 segundos a 72°C para a polimerização. Para terminar, as reações foram expostas a 72°C durante 5 minutos, para o preenchimento de todas as extremidades coesivas. Os produtos amplificados foram depois visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1.5% na presença de *GreenSafe Premium* (NZYTech), como descrito anteriormente. Retiraram-se 9  $\mu\text{L}$  de cada produto de PCR, aos quais se adicionaram 1  $\mu\text{L}$  de *loading buffer 10x* (Bioline) e depositaram-se no gel. No primeiro poço foram depositados 5  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular HipperLadder II (Bioline). Após visualização no transiluminador, os produtos PCR devidamente amplificados foram guardados a 4°C para posterior purificação.

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados e condições de PCR. pb - pares de bases.

Gene	Tamanho do fragmento (pb)	Primer		Temperatura de hibridação (°C)
ORs	525	Foward	5'-TGGC5TA(CT)GA(CT)(AC)G5T(AT)(CT)GT5GC-3'	53
		Reverse	5'- (AG)AA5GG(AG)TT(AGCT)AGCAT(AGCT)GG-3'	
CNG2	582	Foward	5'-TGAGTATGGCTACCTGGCTA-3'	57
		Reverse	5'-TGAGTCACACCATCATCAGC-3'	
AMD1	131	Foward	5'-CATCACTCCAGAACCAGAAT-3'	52
		Reverse	5'-TAACAAACAAGGTGGTCACA-3'	
SSAT	101	Foward	5'-GGTTGCAGAAGTGCCGAAAG-3'	57
		Reverse	5'-GTAACCTGCCAATCCACGGG-3'	
Azin1	96	Foward	5'-CTTTGCACGGACCGTCTGCT-3'	55
		Reverse	5'-TTCCAGCATCTTGCATCTCA-3'	
Oaz1	101	Foward	5'-GAGTTCGCAGAGGAGCAACT-3'	54
		Reverse	5'-CCAAGAAAGCTGAAGGTTCG-3'	
SPDS	111	Foward	5'-CCCGAAAGGCCCTGAATGAC-3'	57
		Reverse	5'-AGGACTGGTGGTCCCAGACA-3'	
SPMS	110	Foward	5'-GTCCCTTCATACTTGAATTGTGG-3'	57
		Reverse	5'-GAGGTCAGGAAGGTGGCTTG-3'	
ODC	125	Foward	5'-GCATGTGGGTGATTGGATGC-3'	55
		Reverse	5'-TGAGTTGCCACATTGACCGT-3'	

### 3.5.1. Purificação dos Produtos de PCR dos ORs

A purificação do produto de PCR dos ORs foi realizada utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo-se o procedimento recomendado pelo fabricante.

Este *kit* baseia-se na capacidade que o DNA possui para se ligar a membranas de sílica, na presença de sais caotrópicos.

Ao produto de PCR adicionou-se igual volume de isotiocianato de guanidina (Membrane Binding Solution) e adsorveu-se a totalidade da mistura à coluna de sílica. Seguiram-se sucessivas lavagens para remover proteínas e sais contaminantes e no final o DNA purificado é eluído em H<sub>2</sub>O livre de nucleases.

Por fim, foi efetuada uma eletroforese em gel de agarose 1,5% com uma alíquota de produto de PCR, para verificação da sua pureza e integridade.

### 3.5.2. Clonagem dos produtos de PCR (ORs) no vetor pNZY28

Com o objetivo de estudar o padrão de expressão dos ORs no CP, fez-se a clonagem dos fragmentos de PCR obtidos com os *primers* degenerados de ORs no vetor pNZY28 (NZY-A PCR

*Cloning Kit*; NZYTech). Para tal, num microtubo de 1,5mL, foi adicionado 5µL NZY-A buffer, 1µL vetor pNZY 28, 3µL de amostra de DNA amplificado purificado, e 1µL de T4 DNA ligase. A reação de ligação decorreu durante 1hora, à temperatura ambiente e durante a noite a 4°C.

Este vetor foi desenhado para permitir a clonagem direta de produtos de PCR, que possuem extensões adenosil (A) na extremidade 3' geradas pela Taq DNA polimerase.

O vetor pNZY28 possui em ambas as extremidades 3' timidina (T), que melhora a eficiência da ligação de produtos de PCR aos plasmídeos, uma vez que previne a sua recirculação e permite extremidades compatíveis com os produtos de PCR.

Este vetor possui também marcas de seleção, como um gene que codifica para a resistência a um antibiótico (ampicilina), o que permite a seleção das bactérias que incorporaram o vetor, e uma origem de replicação (ORI), que vai permitir uma replicação de forma autónoma e a transmissão à descendência. Contém ainda um local de clonagem múltipla (LCR), isto é, uma porção de DNA reconhecida por múltiplas enzimas de restrição. Assim, a digestão com *EcoR I* ou *BamH I* permite a libertação do produto clonado. O LCR contém ainda o gene *lacZ* que codifica a enzima β-galactosidase, uma enzima que converte o x-Gal num composto de cor azul. Quando o produto de PCR é inserido no vetor, ocorre uma interrupção do gene *lacZ*, deixando de ser funcional, o que permite identificar diretamente os clones recombinantes pela cor branca das colónias, nas placas de cultura contendo X-Gal (figura 9).

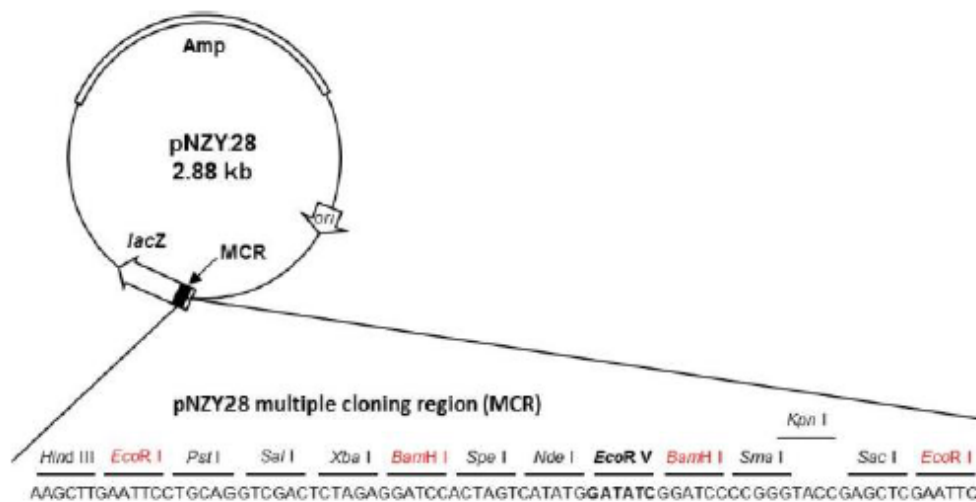


Figura 9 - Mapa físico do vetor pNZY28. Contém um local de clonagem múltipla que reconhece várias enzimas de restrição, um gene que confere resistência a ampicilina (amp), o gene *lacZ* e uma origem de replicação (ORI) (NZYtech).

### 3.5.3. Transformação de *E. Coli* com o plasmídeo recombinante

Os plasmídeos podem ser introduzidos em células bacterianas pelo processo de transformação. As bactérias competentes têm a capacidade de ser transformadas, isto é,

podem interiorizar o DNA presente no meio circundante. A competência natural das bactérias é um fenómeno raro. Assim, é necessário tornar as células competentes, o que pode ser realizado por tratamento químico ou físico.

Após a transformação por plasmídeo que contendo um gene de resistência a um antibiótico, a bactéria transformada pode ser selecionada pelo plaqueamento em meio que contém esses antibióticos. Somente as bactérias que expressam os genes de resistência ao antibiótico (bactérias transformadas) podem formar colónias nessas placas. Este método de seleção de transformantes constitui uma grande vantagem, pois normalmente, a transformação não é muito eficiente.

Para esta etapa, foi utilizada uma alíquota de 100 µL de bactérias competentes (*E. coli* XL1B, congeladas a -80°C), à qual foram adicionados 10µL do produto da ligação de clonagem. Após incubação em gelo durante 30 minutos, procedeu-se ao choque térmico a 42°C durante 40 segundos e mais uma incubação de 2 minutos em gelo. Adicionou-se meio SOC (2% tripton, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5 KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM de MgSO<sub>4</sub> e 20mM de glucose) pré-aquecido a 37°C e colocou-se num agitador orbital a 200rpm durante 1 hora a 37°C. Centrifugou-se a 5000rpm durante 1 minuto, removeu-se parte do sobrenadante e re-suspendeu-se. Plaqueou-se numa placa LB/Agar com X-gal (80µg/mL), IPTG (isopropylthio-β-galactoside) (0,5mM) e ampicilina (100µg/mL). O IPTG funciona como um indutor da expressão da β-galactosidase. Incubou-se na estufa a 37°C, durante a noite (~16horas).

#### **3.5.4. Cultura, em meio líquido, dos clones recombinantes**

Para a cultura dos clones recombinantes, em meio líquido, transferiu-se uma colónia branca para um tubo com 2mL de meio de cultura LB-broth com ampicilina (100µg/mL). Este foi incubado a 37°C num agitador orbital a 250rpm, durante a noite (~16horas).

#### **3.5.5. Purificação dos plasmídeos recombinantes**

A purificação dos plasmídeos foi efetuada com o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), segundo o procedimento recomendado pelo fabricante.

Este kit baseia-se no método de lise alcalina e serve para purificar DNA plasmídeo a partir de uma cultura de bactérias de *E.Coli*. Durante o procedimento, o detergente fortemente aniónico a valores de pH elevados provoca a quebra das paredes celulares das bactérias, desnatura o DNA cromossómico e as proteínas e liberta o DNA plasmídeo para o sobrenadante. O DNA plasmídeo é então seletivamente adsorvido numa coluna de sílica e as impurezas, como sais e proteínas, são removidas por lavagem. No final, o DNA plasmídeo é então eluído da coluna com H<sub>2</sub>O livre de nucleases.

### 3.5.6. Digestão do plasmídeos recombinantes

As enzimas de restrição ou endonucleases de restrição são enzimas que reconhecem sequências específicas de nucleotídeos no DNA e cortam as duas cadeias num local específico dentro dessa sequência. Estas enzimas são sintetizadas naturalmente pelas bactérias para prevenir ou restringir a invasão de DNA viral invasor.

Neste trabalho foi utilizada a *EcoRI*, que reconhece a sequência GAATTC, e hidrolisa a ligação fosfodiéster entre G e A, originando 2 extremidades coesivas.

Em microtubos de 1,5mL juntaram-se: 8µL de DNA, 2µL de tampão 10x, 1µL de *EcoRI* (NZYTech) e 9µL de H<sub>2</sub>O estéril. Incubou-se a 37°C durante 1 hora e 30 minutos. De seguida, foi efetuada uma eletroforese em gel de agarose 1,5%, a fim de verificar o resultado da digestão enzimática.

## 3.6. Imunofluorescência

A imunofluorescência baseia-se numa reação antigénio-anticorpo. Para a identificação de uma proteína (antigénio), é utilizado um anticorpo primário específico que reconhece a proteína de interesse e um anticorpo secundário marcado com uma molécula fluorescente, que se liga ao anticorpo primário, emitindo fluorescência quando há interação com o antigénio.

### 3.6.1. Imunohistoquímica - *whole-mount*

A técnica de imunohistoquímica por fluorescência em *whole-mount* permitiu estudar a expressão e localização celular de determinadas proteínas em explantes de CP, pela utilização de anticorpos específicos.

Foram utilizados ratos *Wistar Han* com 3 a 6 dias, aos quais foram retirados os CPs dos ventrículos laterais e imediatamente colocados em placas de 96-well com PFA 4% durante 45 minutos à temperatura ambiente. De seguida, os CPs foram incubados com uma solução de sacarose 30% em PBS até depositarem no fundo seguindo-se uma incubação de aproximadamente 6h a 4°C com solução de bloqueio (2.5% albumina sérica bovina (BSA - Bovine serum albumin) 0.2% Triton em PBS). Após 1 lavagem com PBS-T 0.1% os CPs foram incubados durante a noite a 4°C com o respetivo anticorpo primário (CNG2 e OR227) ou mistura de anticorpos (OR19+OR227) para as co-localizações diluídos em solução de diluição de anticorpos (2.5% BSA 0.2% Triton em PBS). As condições de incubação e os anticorpos utilizados encontram-se descritos na tabela 3. Após seis lavagens com PBS-T 0.1% incubaram-se os explantes durante 3 horas à temperatura ambiente com o respetivo anticorpo secundário diluído em solução de diluição de anticorpos, nas co-localizações as incubações com o anticorpo secundário foram sequenciais tendo-se incubado primeiro com o *Alexa Fluor 488 donkey anti goat* e após 3 lavagens com PBS-T 0.1% com *Alexa Fluor 546 goat anti rabbit* de

modo a evitar ligações cruzadas de anticorpos. Realizaram-se mais 3 lavagens com PBS-T 0.1% e procedeu-se à marcação do núcleo com *Hoechst* 33342 (Invitrogen, Molecular Probes) numa diluição de 1:1000 em solução de diluição de anticorpos durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após mais 1 lavagem com PBS-T 0.1% procedeu-se à montagem das lâminas utilizando o meio de montagem Entellan. As imagens foram adquiridas num microscópio confocal LSM 710 (Zeiss) numa ampliação de 63x.

**Tabela 3** - Anticorpos primários e anticorpos secundários utilizados na imunohistoquímica por fluorescência por *whole-mount*. RE- retículo endoplasmático; OCD- ornitina descarboxilase; SPSY- espermina sintase.

Proteína	Anticorpo Primário	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário	Diluição	Empresa
CNG2	Policlonal Goat anti-CNG2	1:25	Santa Cruz Biotechnology	Alexa Fluor 488 Donkey anti-Goat	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
OR227	Policlonal Goat anti-OR227	1:25	Santa Cruz Biotechnology	Alexa Fluor 488 Donkey anti-Goat	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
OR19	Policlonal Rabbit anti-OR19	1:50	Abcam	Alexa Fluor 546 goat anti-Rabbit	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
RE	Mouse anti-RE	1:1500	Invitrogen, Molecular Probes	Alexa Fluor 546 Goat anti-Mouse	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
OCD	Monoclonal Mouse anti-OCD	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
SPSY	Policlonal Rabbit anti-SPSY	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Alexa Fluor 546 Goat anti-Rabbit	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes

De forma a analisar a localização celular do CNG2, procedeu-se à marcação da membrana com *wheat germ agglutinin* (Molecular Probes). Para tal, incubaram-se os explantes com *wheat germ agglutinin* 5 µL/mL durante 20 minutos logo após a incubação com a sacarose, prosseguindo-se de seguida com o protocolo acima descrito.

Para analisar especificidade de ligação do anticorpo primário anti-OR227, pré incubou-se o anticorpo com o respetivo péptido (sc-13701, Santa Cruz Biotechnology), durante a noite numa proporção em massa de 5:1 (péptido: anticorpo) e realizou-se o protocolo de *whole-mount* acima descrito.

### 3.6.2. Imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica, foi utilizada em cultura primária de CPEC, e permite avaliar o nível de expressão de proteínas e conhecer a sua localização e distribuição celular.

De modo a analisar a expressão das proteínas em estudo, procedeu-se à incubação da cultura primária de CPEC com os anticorpos específicos desta via descritos na tabela 3. Para tal, as células foram lavadas com PBS e incubadas com PFA 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à permeabilização das células com uma solução de Triton X-100 1% em PBS durante 5 minutos. Após 3 lavagens com PBS, as células permeabilizadas foram incubadas com uma solução de bloqueio (PBS-T 0.1% FBS 20%) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após uma lavagem com PBS-T 0.1% procedeu-se à incubação com o respetivo anticorpo primário (tabela 3) diluído em solução de diluição de anticorpos (PBS-T 0.1% FBS 1%) durante a noite a 4°C, tendo-se lavado seis vezes com PBS-T e incubado com respetivo anticorpo secundário 1:1000 durante 1 hora à temperatura ambiente no escuro. Após 3 lavagens com PBS-T 0.1%, as células foram incubadas com *Hoechst* 33342 (Invitrogen, Molecular Probes) numa diluição de 1:1000 em solução de diluição de anticorpos durante 10 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se mais 1 lavagem com PBS-T 0.1% e procedeu-se à montagem das lâminas utilizando o meio de montagem Entellan (Merck). As imagens de fluorescência foram obtidas com um microscópio confocal LSM 710 (Zeiss).

Para estudar a localização dos ORs no CP procedeu-se à co-localização do OR 19 com o RE. Deste modo procedeu-se à imunocitoquímica, como descrito em cima, com algumas alterações: i) realizou-se uma incubação após o anticorpo primário com o anticorpo primário anti-RE diluído 1:1500 em solução de diluição de anticorpos durante 1h30 à temperatura ambiente; ii) a incubação com o anticorpo secundário, para evitar as ligações cruzadas entre eles, foi sequencial tendo-se incubado primeiro com o *Alexa Fluor 488 donkey anti-goat* e após 3 lavagens com PBS-T 0.1% com o *Alexa Fluor 546 goat anti-mouse*.

### 3.7. Western Blot

Para avaliar e caracterizar as proteínas envolvidas na via do olfato no CP realizou-se a técnica de *western blot*. Para tal, os CPs foram diretamente recolhidos para meio de lise (25mM Tris-HCL pH7.4, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM EGTA, 1 mM PMSF, 25.57 µM Leupeptina, 1mM DTT e 10µL/mL do cocktail de inibidores de proteases *Complete EDTA Free* (Roche)) prosseguindo-se ao protocolo de extração.

Para a extração de proteína total, os CPs foram mecanicamente desfeitos em 500 µL de tampão de lise com ao auxílio de um pilão, seguindo-se uma centrifugação a 10000xg a 4°C durante 5 minutos. O sobrenadante, que contém as proteínas, foi recolhido para um novo microtubo de 1.5 mL. O extrato de proteína total foi quantificado pelo método de Bradford e conservado, a -80°C, até ser utilizado.

O método de Bradford baseia-se na alteração da cor do corante Azul Brilhante Coomassie que, em condições ácidas, se liga aos resíduos positivos das proteínas convertendo-se na sua forma aniónica (azul). A 595nm a forma aniónica deste corante tem absorvância máxima, sendo esta

proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. Para quantificar a proteína, traçou-se, uma reta de calibração com padrões (0-10µg/mL) a partir de uma solução stock de BSA. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços num leitor de microplacas, Anthos 2020, a 595nm.

Ao volume de amostra a depositar no gel de poliacrilamida, correspondente a 50µg de proteína total, adicionou-se tampão de desnaturação (10% SDS, 0,05% azul de bromofenol, 200mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol e 30% β-mercaptoetanol) e efetuou-se uma desnaturação a 95 °C durante 5 minutos. Uma vez desnaturadas, as amostras foram aplicadas num gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE com gel de concentração 4,7%, em paralelo com o marcador de pesos molecular NZY Colour Protein Marker II (Nzytech). O gel foi corrido a 120V até à frente de corrida atingir o limite inferior do gel num sistema de eletroforese vertical (Cleaver). As proteínas foram depois eletrotransferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PDVF) (GE Healthcare). Após uma lavagem em tampão salino Tris (TBS- Tris Buffered Saline) procedeu-se ao bloqueio com 5% de leite magro em pó (Páturages) durante 1 hora e 30 minutos. De seguida realizaram-se duas lavagens de 10 minutos cada com TBS 0,1% de Tween (TBS-T) e procedeu-se á incubação durante a noite a 4°C com o respetivo anticorpo primário anti-CNG2 e anti-OCD (1:200, Santa Cruz Biotechnology) diluídos em TBS-T sob agitação constante. A membrana foi sujeita a três lavagens de 15min em TBS-T e incubada com o respetivo anticorpo secundário anti-goat e anti-mouse (1:10000) durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação. O processo de lavagem foi repetido, como descrito anteriormente, e a ligação do anticorpo foi detetada utilizando o substrato ECF (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram reveladas com o Molecular Imager FX Pro Plus Multilmager system (Biorad).

### **3.8. Single Cell Calcium Imaging**

A técnica de  $Ca^{2+}$  *imaging* é utilizada para avaliar a variação nos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular de uma célula, tecido ou meio, após adição de um estímulo. Esta técnica envolve a utilização de sondas, que são moléculas fluorescentes que respondem à ligação de iões de  $Ca^{2+}$  por alteração das suas propriedades de fluorescência. Dentro deste grupo de sondas que podem ligar iões de  $Ca^{2+}$ , incluiu-se a sonda Fura-2AM (Molecular Probes), utilizada neste trabalho. A sonda utilizada é excitável no ultravioleta, sendo que no estado livre de  $Ca^{2+}$ , a fluorescência a 380nm é maior do que a 340nm, enquanto que, ligada ao  $Ca^{2+}$ , a fluorescência a 380nm diminui e a 340nm aumenta.

Um dos principais objetivos do presente trabalho foi a otimização desta metodologia para estudar a resposta (concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ ) a diferentes estímulos químicos (“odores” estimuladores da via de sinalização olfativa) aplicados a culturas primárias de CPEC. Para tal, prepararam-se culturas primárias de CPEC, como descrito anteriormente, que foram semeadas em placas de dois poços (Ibidi). Após atingirem uma confluência de 80-90%,

foram lavadas uma vez com tampão CSF artificial (aCSF)(148mM NaCl, 3mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM NaHPO<sub>4</sub> e 5.55 glucose) e carregadas com a sonda diluída em aCSF + 1%BSA + 0.02% acido plurónico. Após uma lavagem as células foram novamente incubadas com aCSF durante 15 minutos a 37°C para desterificação da sonda e colocadas sob um microscópio de fluorescência de luz invertida (Axio Imager A1, Carl Zeiss). A solução stock de FURA-2AM foi preparada numa concentração de 1mM em DMSO.

De forma a analisar a ativação dos ORs, nas culturas primárias de CPEC, foram realizados estímulos com putrescina 5mM, 10mM e 15mM, diluídos em aCSF. Como controlo positivo do método utilizou-se ionomicina 5µM e como controlo negativo EGTA 10µM.

Foram ainda testadas diferentes condições de incorporação da sonda. Para tal, as células foram incubadas com a sonda nas condições descritas na tabela 4.

Tabela 4 - Diferentes condições testadas para a otimização do modelo de estudo: Ca<sup>2+</sup> *imaging* em culturas primárias de CPEC

Condição	[Fura-2AM] (µM)	Pré-incubação 4°C min	Incubação 37°C min
1	5	---	45
2	2	---	10
3	2	5	10
4	2	5	15
5	2	5	20
6	2	10	10
7	2	10	15
8	2	10	20

A variação na concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular foi avaliada pelo ratio da fluorescência emitida a 520nm após excitação a 340nm e 380nm, utilizando como fonte de luz o Lambda DG4 (Sutter Instruments) sob uma objetiva de 40x com uma câmara AxioVision (Carl Zeiss). O software de aquisição utilizado foi o AxioVision (Carl Zeiss).

# **Capítulo 4**

## **Resultados**

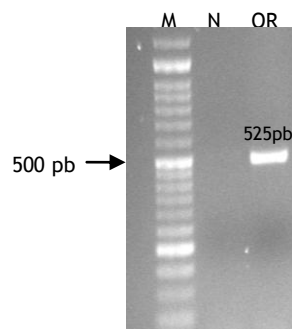


## 4. Resultados

### I) Estudo da expressão de alguns dos componentes da via de transdução olfativa no CP de rato

#### 1. Análise da expressão génica dos ORs (RT-PCR)

A técnica de RT-PCR, com *primers* degenerados, permitiu confirmar a expressão, ao nível do mRNA, dos genes dos ORs no CP de ratos fêmeas, machos e fêmeas grávidas. A utilização de *primers* degenerados, localizados nas regiões mais conservadas dos genes ORs, permite amplificar e assim analisar o repertório de ORs expresso no CP. Extraíu-se RNA total do CP, ao que se seguiu um tratamento com DNase I, para eliminação de vestígios de DNA genómico e síntese de cDNA. Os produtos amplificados com os *primers* degenerados (Tabela 1) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1.5% corado com *GreenSafe premium*, confirmando-se o tamanho esperado, 525pb (figura 10), por comparação das bandas obtidas com o marcador de peso molecular. Nos controlos negativos (N) não se observou amplificação, o que indica a ausência de contaminação com DNA genómico.



**Figura 10** - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR dos ORs. Marcador NZYDNA Ladder VI (M); controlo negativo (N); PCR efetuado com *primers* degenerados para os ORs a partir de cDNA de CP (OR).

Os produtos de PCR foram purificados, clonados no vetor pNZY28 e enviados para sequenciação à Stabvida Portugal. Selecionaram-se alguns clones para sequenciar e as sequências resultantes foram alinhadas no NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), tendo resultado uma homologia superior a 97% com sequências de ORs de *Rattus Norvegicus*. Com esta abordagem comprovou-se a expressão, ao nível do mRNA, dos ORs 522, 476, 19, 540, 806, 1382 no CP de rato (tabela 5).

Tabela 5 - Recetores olfativos identificados no plexo coróideu de rato. OR-recetor olfativo

	OR	Homologia
Fêmea	OR522 (1X) OR476 (1X)	99%
Macho	OR19 (2x)	98%
Grávida	OR540 (6x) OR806 (4x) OR1382 (2x)	98%-99%

## 2. Análise da expressão do CNG2 em CP de rato

### 2.1. Expressão génica de CNG2 (RT-PCR)

A técnica de RT-PCR permitiu ainda confirmar a presença do mRNA do gene do CNG2 no CP de rato. O produto amplificado com os *primers* específicos (Tabela 1), foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1.5% corado com *GreenSafe premium*, confirmando-se o tamanho esperado, 582pb (figura 11), por comparação das bandas obtidas com o marcador de peso molecular HipperLadder II. Nos controlos negativos (N) não se observou amplificação, o que indica a ausência de contaminação com DNA genómico.

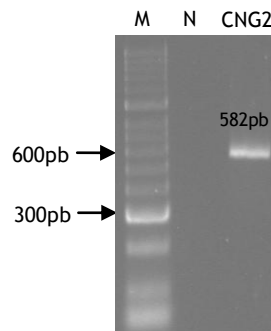


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR do CNG2. Marcador HipperLadder II (M); controlo negativo (N); PCR com primers específicos para CNG2 a partir de cDNA de CP (CNG2).

O produto de PCR foi purificado e enviado para sequenciação à Stabvida. A sequência resultante foi alinhada no NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e obteve-se 99% de homologia com a sequência de nucleótidos de CNG2 de *Rattus norvegicus*.

## 2.2. Expressão proteica de CNG2 (*western blot*)

A análise da expressão da proteína CNG2 foi realizada pela técnica de *Western blot* e obteve-se uma banda de 63KDa com o anticorpo específico anti-CNG2 como se pode observar na figura 12.



Figura 12 - *Western blot* de extratos de proteína total de CP de rato com o anticorpo anti-CNG2. A proteína apresenta 63KDa.

## 3. Imunofluorescência de alguns dos componentes da via de transdução olfativa em CP de rato

### 3.1. Expressão da proteína OR19 em CPEC

Os resultados da visualização da imunocitoquímica, com o anticorpo anti-OR19, por microscopia confocal permitiram verificar a expressão do OR19 no citoplasma das CPEC. No controlo negativo, não se verificou qualquer marcação (figura 13).

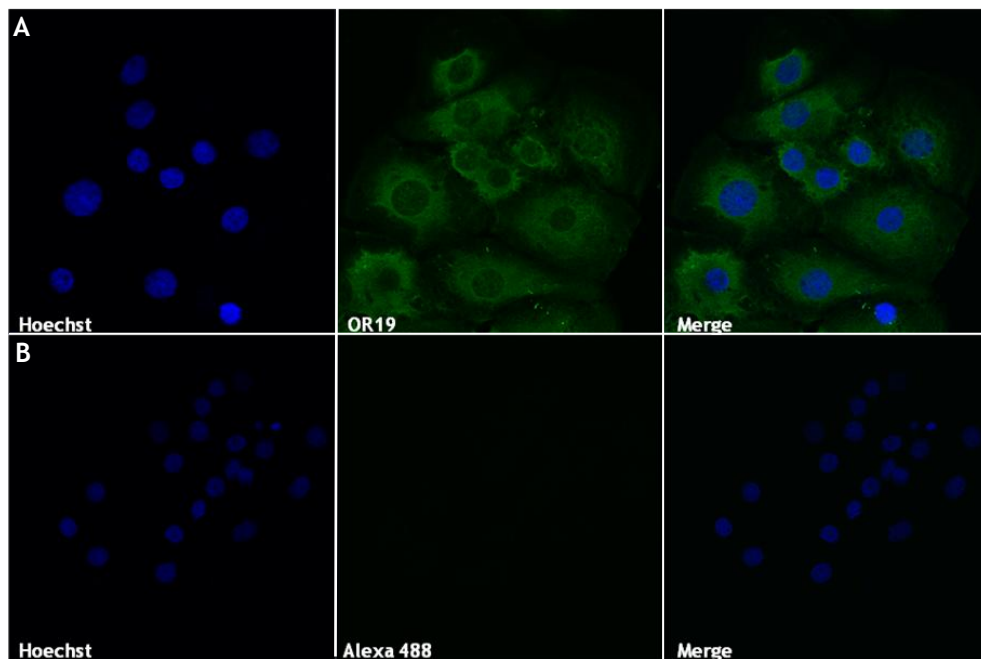
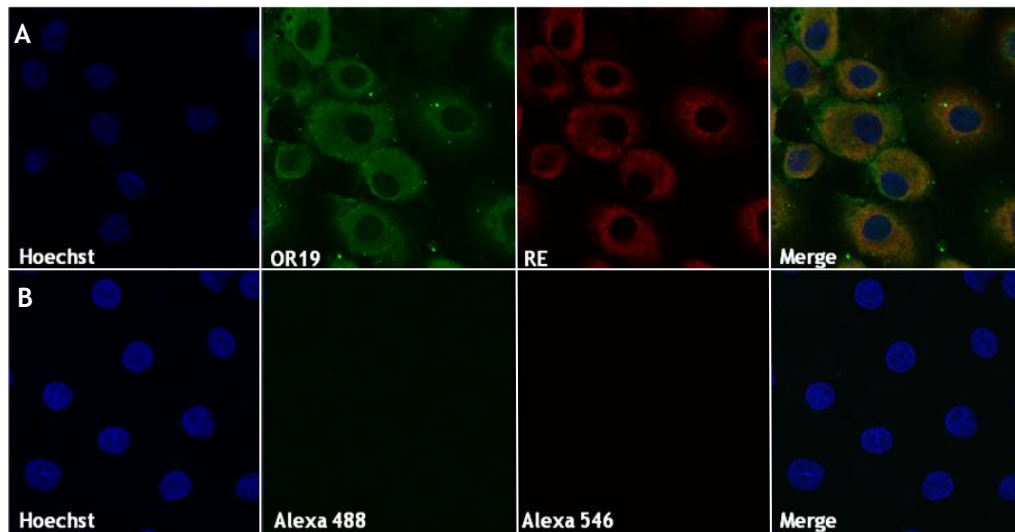


Figura 13 - Expressão do OR19 em CPEC. A - Imagem representativa de cultura primária de CPEC de rato incubadas com o anticorpo anti-OR19 seguido de incubação com Anti-rabbit Alexa Fluor 488; B - Controlo negativo apenas com omissão do anticorpo primário. Todas as imagens foram obtidas com um microscópio confocal numa ampliação de 63x.

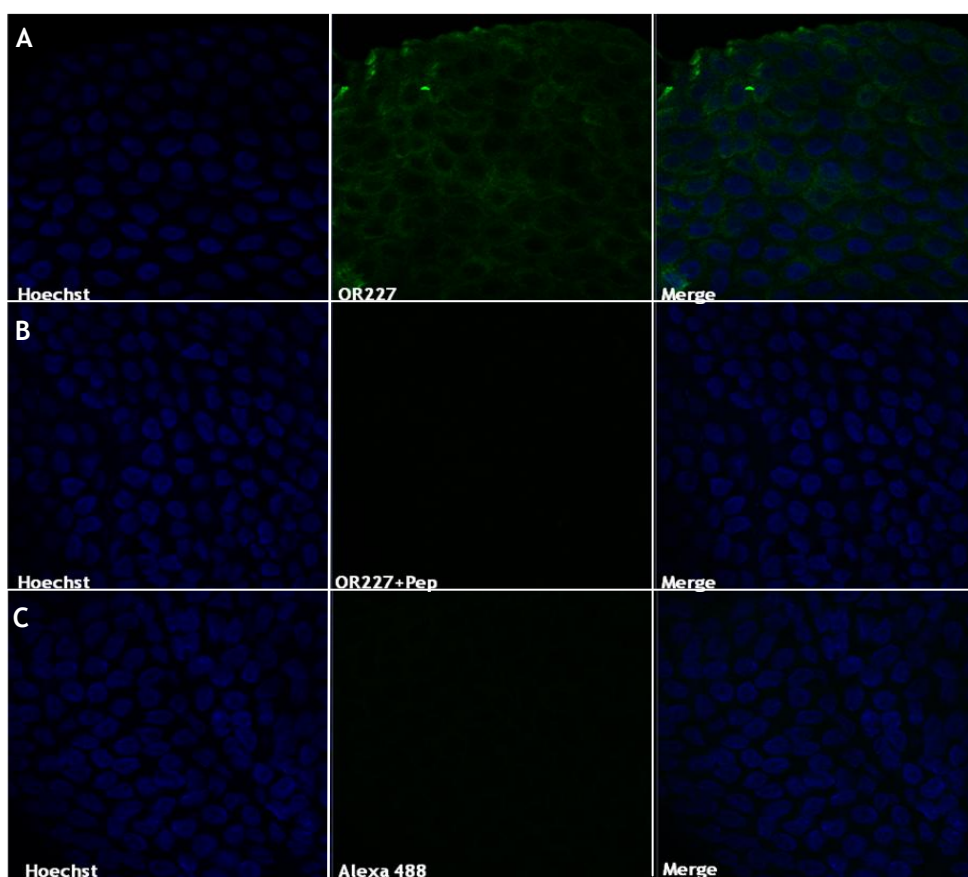
O resultado da imunocitoquímica nas CPEC (figura 13) mostrou uma marcação do OR19 sobre a zona perinuclear, formando uma auréola em volta do núcleo sugerindo que se possa localizar no retículo endoplasmático (RE). Prosseguiu-se então para a co-localização do OR19 com um anticorpo marcador do RE, que mostrou que o recetor se localiza neste organelo. No controlo negativo, não se verificou qualquer marcação (figura 14).



**Figura 14 - Co-localização do OR19 com o RE em CPEC.** A - Imagem representativa de CPEC de rato incubadas com o anticorpo anti-OR19, seguido de incubação com o anticorpo anti-RE e por último as incubações com Anti-rabbit Alexa Fluor 488 e Anti-mouse Alexa Fluor 546; B - Controlo negativo apenas com omissão dos anticorpos primários. Todas as imagens foram obtidas com um microscópio confocal numa ampliação de 63x.

### 3.2. Expressão das proteínas OR227 e CNG2 em explantes de CP

A técnica de imunohistoquímica por fluorescência em *whole-mount* com anticorpos específicos, permitiu observar a expressão da proteína CNG2 (figura 15) e OR227 (figura 16) em explantes do CP. Nos controlos negativos, não se verificou qualquer marcação.



**Figura 15 - Expressão do OR227 em explantes de CP.** A - A imagem representa explantes de CP incubados com anticorpo anti-OR227 seguido de incubação com anticorpo secundário anti-goat alexa fluor 488; B - Marcação com o anticorpo anti-OR227 pré-incubado com o péptido seguido de incubação com o anticorpo secundário anti-goat alexa fluor 488; C- Controlo negativo apenas com omissão do anticorpo primário. Todas as imagens foram obtidas com um microscópio confocal numa ampliação de 63x.

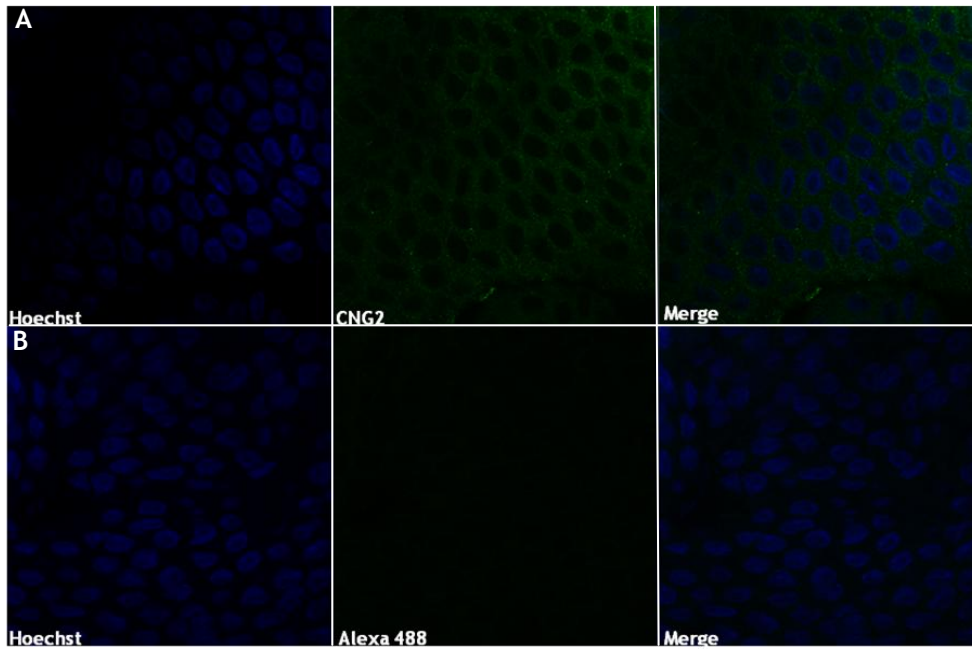


Figura 16 - Expressão do CNG2 em explantes de CP. A - Imagem representativa de explantes de CP incubados com anticorpo anti-CNG2 seguido de incubação com o anticorpo secundário *anti-goat alexa fluor 488*; B- Controlo negativo apenas com omissão do anticorpo primário. Todas as imagens foram obtidas com um microscópio confocal numa ampliação de 63x.

### 3.3. Localização celular de CNG2 em explantes de CP

A técnica de imunohistoquímica por fluorescência em *whole-mount* permitiu ainda co-localizar a proteína CNG2 com o marcador de membrana *Wheat germ agglutinin* em explantes de CP (figura 17).

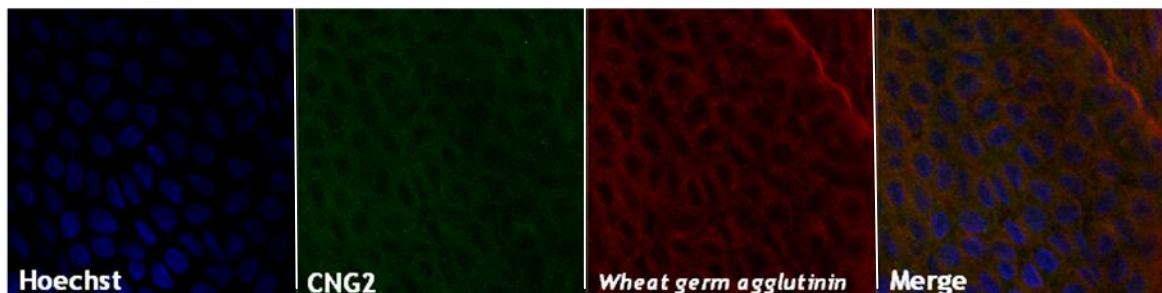


Figura 17 - Co-localização do CNG2 com *Wheat germ agglutinin*. Imagem representativa de explantes de CP incubados com o marcador de membrana *Wheat germ agglutinin* e com o anticorpo anti-CNG2 seguido de incubação com o anticorpo secundário *anti-goat alexa fluor 488*. Todas as imagens foram obtidas com um microscópio confocal numa ampliação de 63x.

### 3.4. Co-localização das proteínas OR227 e OR19 em explantes de CP

A técnica de imunohistoquímica por fluorescência em *whole-mount* permitiu co-localizar dois ORs diferentes, o OR19 e o OR227, em explantes de CP, e da sobreposição das imagens verificou-se a expressão dos dois ORs na mesma célula (figura 18).

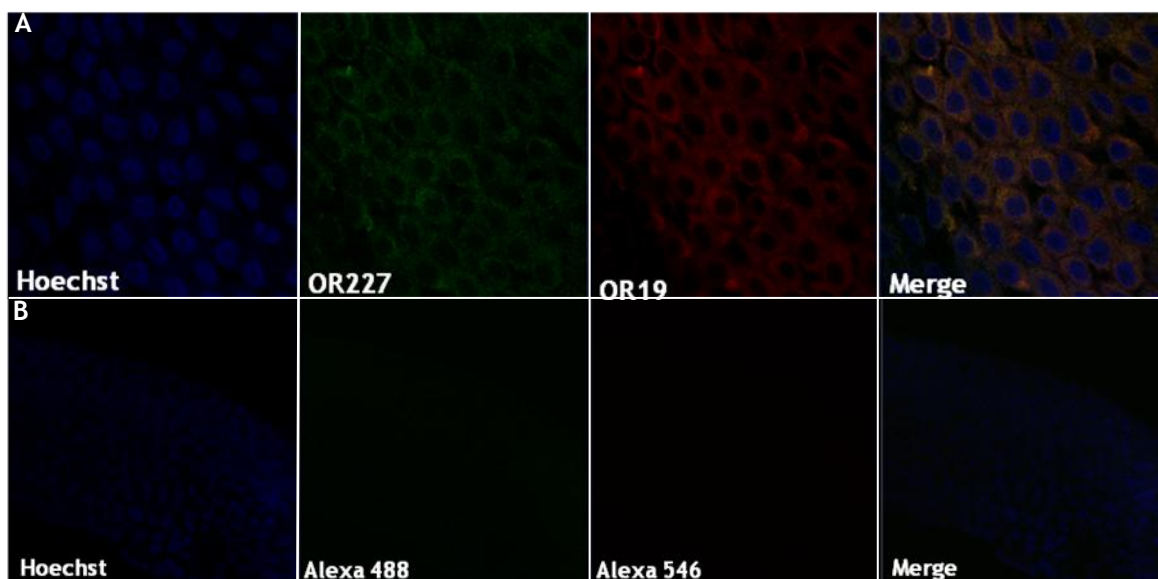
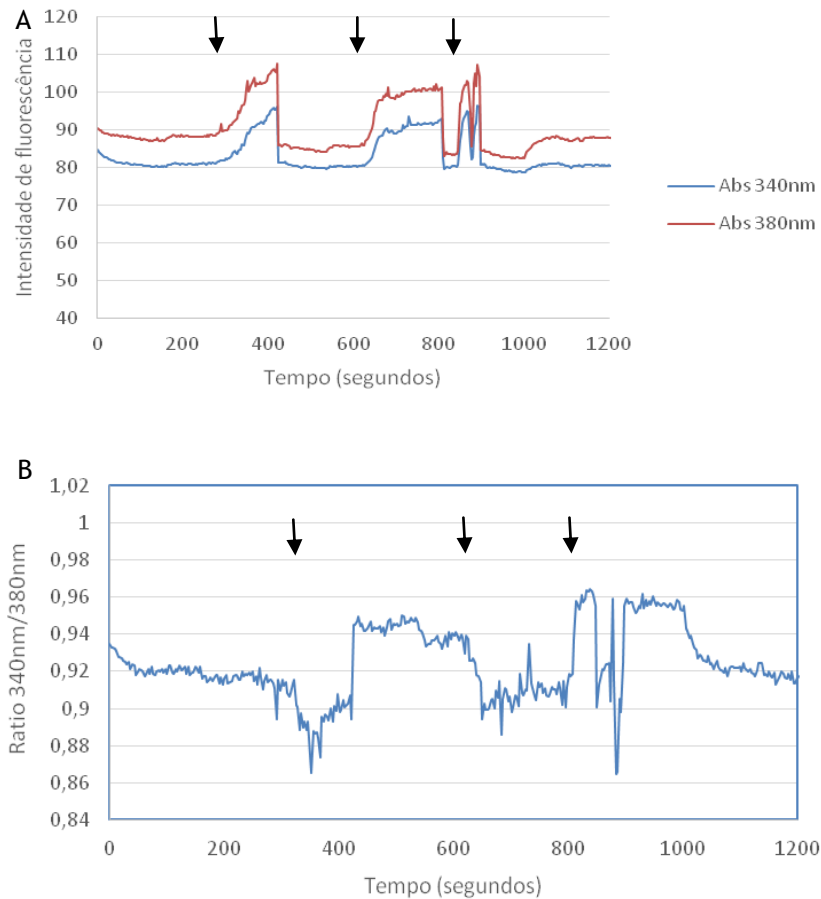


Figura 18 - Co-localização do OR227 com o OR19. A - Imagem representativa de explantes de CP de rato incubados com os anticorpos anti-OR227 e anti-OR19 seguido de incubação com os anticorpos secundários *anti-goat alexa fluor 488* e *anti-rabbit alexa fluor 546*; B - Controle negativo apenas com omissão dos anticorpos primários. Todas as imagens foram obtidas com um microscópio confocal numa ampliação de 63x.

## II) Estudo da “resposta olfativa” em CPEC (*Single cell calcium imaging*)

Com o objetivo de estudar a “resposta olfativa” de culturas primárias de CPEC às poliaminas, surgiu a necessidade de montar a técnica de  $Ca^{2+}$  *imaging* e otimizá-la para o nosso modelo de estudo: as CPEC.

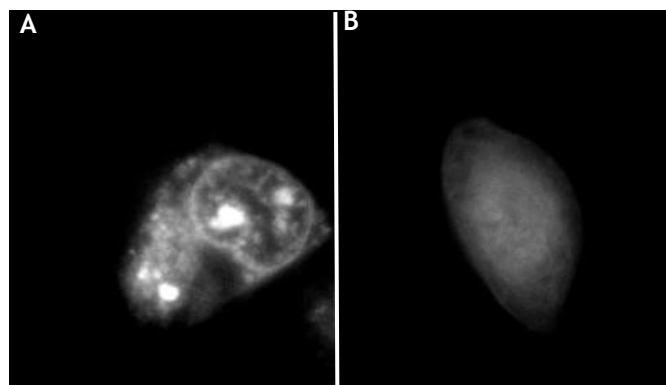
Os resultados obtidos nos ensaios preliminares de  $Ca^{2+}$  *imaging* para quantificação da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular revelaram uma pequena alteração no ratio 340/380 nm após estímulo das CPEC com putrescina nas concentrações de 5mM, 10mM e 15mM (figura 19).



**Figura 19 - Variação no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular nas CPEC após estímulo com putrescina 5mM, 10mM e 15mM. A - Intensidade de fluorescência ao longo do tempo a 340nm e 380 nm. As setas representam a adição dos estímulos putrescina 5mM, 10mM e 15mM respetivamente. B - Ratio da intensidade de fluorescência 340nm/380nm ao longo do tempo.**

Surgiu então a necessidade de otimização da metodologia para o modelo em estudo, tendo-se realizados testes com um controlo positivo (ionomicina  $5\mu\text{M}$ ) e um controlo negativo (EGTA  $10\mu\text{M}$ ) que não surtiram resultados.

Testaram-se então diferentes condições de carregamento da sonda FURA-2AM, referidas na tabela 4 e verificou-se que a melhor condição para carregar a sonda, considerando as características das CPEC, é a condição 5 (imagem 20).



**Figura 20 - Células carregadas com Fura-2AM sob diferentes condições.** A - A imagem representativa da sonda compartimentalizada observada nas condições 1,2,3,4,6,7,e,8 da tabela 4; B - imagem representativa da sonda difusa por todo o citoplasma observada na condição 5 da tabela 4.

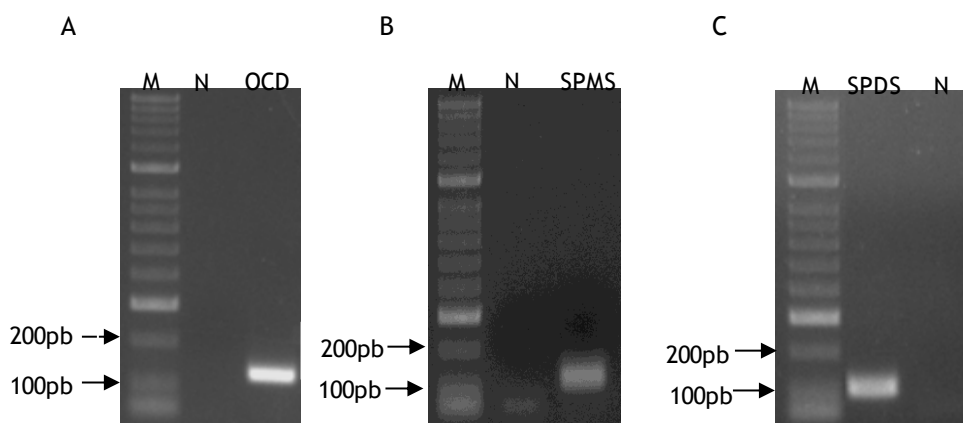
### **III) Estudo da via biossintética e da via catabólica das poliaminas no plexo coroideu de rato**

Estudos recentes, realizados pelo nosso grupo de trabalho, revelaram que o CP responde eletrofisiologicamente a um conjunto de estímulos químicos, as poliaminas. Dada a importância fisiológica das poliaminas a vários níveis, surgiu a necessidade de estudar o metabolismo destes compostos no CP de rato.

#### **1. Via biossintética das poliaminas**

##### **1.1. Análise da expressão dos genes da via biossintética das poliaminas por RT-PCR em CP de rato**

Com a técnica de RT-PCR foi possível analisar a expressão dos genes que fazem parte da via biossintética das poliaminas, nomeadamente: OCD, SPDS e SPMS (figura 8). Sintetizou-se cDNA a partir de RNA total isolado de CP e os produtos de amplificação com os *primers* específicos (Tabela 1) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com *GreenSafe premium*, confirmando-se o tamanho esperado para cada gene (figura 21) por comparação das bandas obtidas com o marcador de peso molecular. Obtivemos os seguintes tamanhos de banda: 116pb para OCD (figura 21A), 110pb para SPMS (figura 21B) e 111pb para SPDS (figura 21C).



**Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR das enzimas via biossintética das poliaminas.** Marcador HipperLadder II (M); controlo negativo (N); PCR a partir de cDNA de CP com *primers* específicos para OCD (A); SPMS (B) e SPDS (C). Os *primers* amplificam respetivamente 116pb, 110pb e 111pb.

Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados pela StabVida. As sequências foram confirmadas com o programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) por comparação com sequências da base de dados. Após alinhamento com as sequências da base de dados de *Rattus norvegicus*, obteve-se: 99% de homologia com a sequência de nucleótidos da OCD; 97% de homologia com a sequência de nucleótidos da SPMS e 98% de homologia com a sequência de nucleótidos da SPDS.

## 1.2. Análise da expressão proteica da via biossintética das poliaminas

### 1.2.1. Caracterização da proteína OCD (*western blot*)

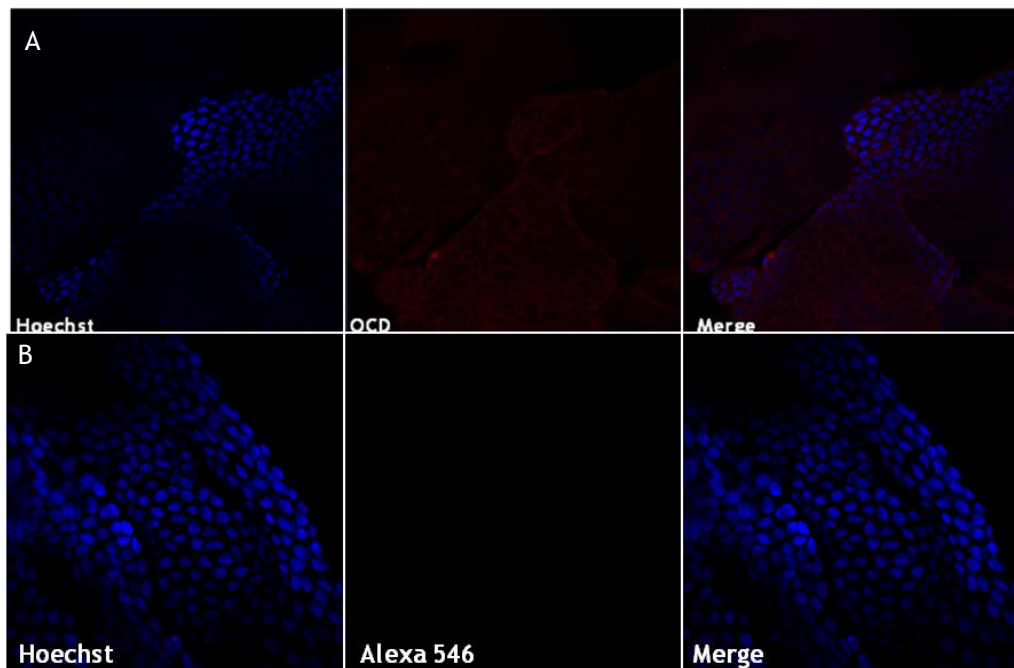
A caracterização da proteína OCD, enzima limitante na síntese das poliaminas, foi efetuada pela técnica de *Western blot* e obteve-se uma banda de 53 KDa, como se pode observar na figura 22.



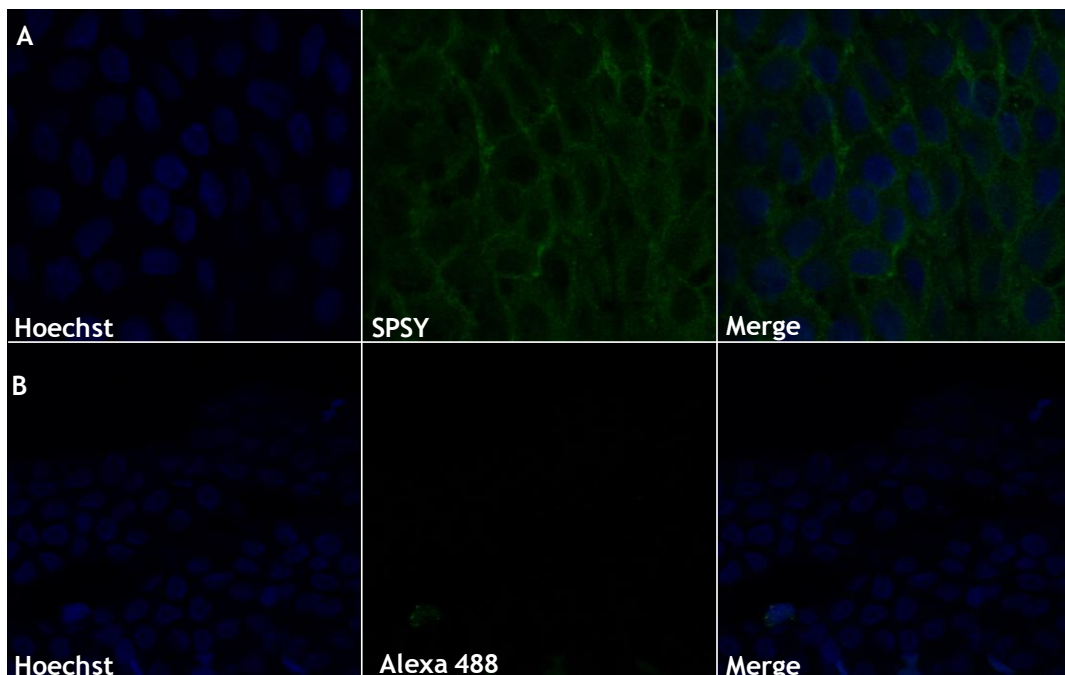
**Figura 22- Western blot de extratos de proteína total de CP de rato com o anticorpo anti- OCD.** A proteína apresenta 53 KDa.

### 1.2.2. Imunohistoquímica por fluorescência das proteínas OCD e SPSY

A técnica de imunohistoquímica por fluorescência em *whole-mount* permitiu determinar a expressão e localização das proteínas OCD (figura 23) e SPSY (figura 24) em explantes de CP. Nos controlos negativos, não se verificou qualquer marcação.



**Figura 23 - Expressão de OCD em explantes de CP.** A - Imagem representativa de explantes de CP incubados com o anticorpo anti-OCD seguido de incubação com anti-mouse alexa fluor 546. B - Controle negativo apenas com omissão do anticorpo primário. Todas as imagens foram obtidas com um microscópio confocal numa ampliação de 63x.

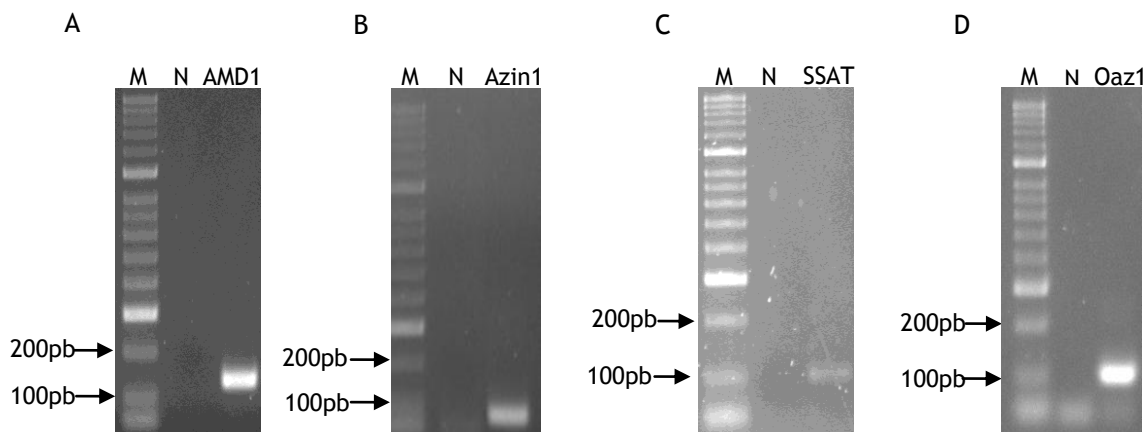


**Figura 24 - Expressão de SPSY em explantes CP.** A - Imagem representativa de explantes de CP incubados com o anticorpo anti-SPSY seguido de incubação com anti-rabbit alexa fluor 488; B- Controle negativo apenas com omissão do anticorpo primário. Todas as imagens foram obtidas com um microscópio confocal numa ampliação de 63x.

## 2. Via catabólica das poliaminas

### 2.1 Análise da expressão dos genes da via catabólica das poliaminas por RT-PCR

Foi ainda possível analisar a expressão dos genes que fazem parte da via catabólica das poliaminas, nomeadamente: AMD1, Azin1, SSAT e Oaz1 (figura 8), com a técnica de RT-PCR. Sintetizou-se cDNA a partir de RNA total isolado de CP e os produtos de amplificação com os *primers* específicos (Tabela 1) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com *GreenSafe premium*, confirmando-se o tamanho esperado para cada gene (figura 25) por comparação das bandas obtidas com o marcador de peso molecular. Obtiveram-se os seguintes tamanhos de banda: 131pb para AMD1 (figura 25A), 96pb para Azin1 (figura 25B), 101pb para SSAT (figura 25C) e 101pb para Oaz1 (figura 25D).



**Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR das enzimas via catabólica das poliaminas.** Marcador HipperLadder II (M); controlo negativo (N); PCR a partir de cDNA de CP com *primers* específicos para AMD1 (A), Azin1 (B), SSAT (C), Oaz1 (D). Os primers amplificam respetivamente 131pb, 96pb e 101pb e 101pb.

Os produtos amplificados foram purificados e enviados para sequenciação à StabVida. As sequências foram confirmadas com o programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) por comparação com sequências da base de dados. Após alinhamento com as sequências da base de dados de *Rattus norvegicus*, obteve-se: 100% de homologia com a sequência de nucleótidos da AMD1; 96% de homologia com a sequência de nucleótidos da Azin1 e SSAT e 98% de homologia com a sequência de nucleótidos da Oaz1.

## **Capítulo 5**

### **Discussão**



## 5. Discussão

O CP é uma estrutura altamente vascularizada, localizada nas cavidades ventriculares cerebrais, com relevância na vigilância da composição do CSF. Esta função quimiossensorial é corroborada por resultados prévios, obtidos pelo nosso grupo de investigação (Tavares 2012; Quintela et al. 2013), que mostram que alguns componentes da maquinaria de transdução olfativa estão expressos no CP.

Vários estudos têm vindo a demonstrar a expressão de componentes da via de transdução olfativa em diferentes tecidos e tipos celulares. A relevância funcional da ativação desta via de transdução fora do EO ainda não está totalmente esclarecida, mas têm sido propostas funções sensoriais em diferentes órgãos/sistemas, como os espermatozoides, o rim, a placenta, a língua ou o intestino (Feldmesser et al. 2006; Foster et al. 2014). Havia já evidências da expressão de componentes relacionados com a via de transdução olfativa no CP de rato, que mostraram a expressão da AC3, da G $\alpha$ olf e de um grupo de ORs (Tavares 2012; Quintela et al. 2013).

Sugerindo que esta via de sinalização possa funcionar, no CP, como um mecanismo quimiossensorial de vigilância do CSF e assim contribuir para a regulação da homeostasia cerebral, com o presente trabalho pretendeu-se prosseguir o estudo da expressão e funcionalização da via olfativa no CP de rato.

Começámos então por analisar o padrão de expressão dos genes dos ORs, por RT-PCR. Uma vez que os genes que codificam os ORs são desprovidos de intrões (Buck & Axel 1991; Ronnett & Moon 2002), foi necessário garantir que as amostras de RNA total não continham DNA genómico antes de proceder à transcrição reversa para cDNA. Para tal, o RNA isolado foi sujeito a um tratamento com a DNase I, de forma a degradar qualquer vestígio de DNA genómico presente na amostra, e foram realizados controlos a quando da realização dos PCRs. Neste estudo foram utilizados *primers* degenerados desenhados nas regiões de homologia da grande família de ORs (Braun et al. 2007; Menini 2010), de forma a conseguirmos amplificar o conjunto de genes a serem expressos no tecido em causa, o CP. Deste modo, clonaram-se os produtos de PCR que continham o conjunto de ORs expresso, separadamente para ratos fêmea, grávidas e machos, no vetor pNZY28 e sequenciaram-se alguns dos clones obtidos. A sequenciação dos clones confirmou que os recetores 522, 476, 19, 540, 806 e 1382 são expressos no CP, tendo sido obtida uma homologia superior ou a igual a 97% com a sequência de referência do banco de genes da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). É de realçar que os OR522 e OR476 estão presentes em fêmeas, o OR19 em machos e os OR540, OR806 e OR1382 em fêmeas grávidas. Embora o número reduzido de clones analisado não permita fazer comparações estatisticamente significativas, esta expressão diferenciada dos ORs poderá dever-se à regulação por hormonas sexuais, uma

vez que já era sabido que a via do olfato é regulada pelas hormonas sexuais (Quintela et al. 2013).

Para completar o estudo da expressão da maquinaria de transdução olfativa, foi ainda analisada a expressão de um dos componentes do canal nucleotídico cíclico específico da via do olfato, o CNG2 (Menini 2010). Este gene tal como os ORs é expresso no CP, tendo-se verificado uma homologia de 99% com a sequência de nucleótidos de CNG2 de *Rattus norvegicus* da base de dados publicada.

A análise da expressão da proteína CNG2 foi ainda efetuada por *Western blot*. O anticorpo anti-CNG2 detetou uma banda com um peso molecular de 63kDa. O resultado obtido contradiz o descrito na literatura, onde no EO apresenta 130 kDa (Oztokatli et al. 2012) e tecidos extra olfativos, a forma glicosilada do CNG2 apresenta 114 kDa e a forma não glicosilada aproximadamente 75 kDa (Brady et al. 2004).

Com vista a estudar a localização celular destas proteínas, efetuaram-se ensaios de imunofluorescência em cultura primária de CPEC. Os resultados mostram que a proteína OR19 apresenta uma localização citoplasmática com fluorescência mais intensa sobre a zona perinuclear, formando uma auréola em volta do núcleo que sugere localização no RE. Para esclarecer este assunto, realizou-se a co-localização deste OR com um marcador de RE. Segundo a literatura, (Bush & Hall 2008), os ORs apresentam uma localização na membrana citoplasmática celular no EO, mas em sistemas heterólogos, apresentam maior localização no RE do que na membrana citoplasmática, sugerindo como justificação para esta localização celular, a falta de determinado componente crítico que induza a translocação dos ORs para a membrana citoplasmática, nas células destes sistemas. Assim, o caso das CPEC poderá ser mais um sistema onde ocorre este fenómeno, ou por outro lado, poderá ser necessário um estímulo externo que induza esta translocação.

A distribuição e localização celular das proteínas OR227 e CNG2, foram analisadas em explantes de CP por imunofluorescência em *whole-mount*. Os resultados mostraram a presença do OR227 nas células epiteliais do CP, tendo-se provado a especificidade da ligação do anticorpo primário por bloqueio do mesmo com o respetivo péptido. Quanto ao CNG2, também se verificou a presença desta proteína nas células epiteliais do CP e como era de esperar, os resultados de co-localização do CNG2 com um marcador de membrana (*wheat germ agglutinin*) confirmam a sua localização membranar.

No EO, está estabelecido que cada OSN expressa apenas um tipo de OR (Buck & Axel 1991; Malnic et al. 1999; Serizawa et al. 2004; Huart et al. 2013), contudo, em tecidos extra olfativos não está nada descrito. Assim, de forma a analisar o padrão de expressão dos ORs no CP, procedeu-se à co-localização de dois ORs, o OR227 e o OR19, neste tecido. Os resultados obtidos mostram que os dois ORs co-localizam, sugerindo que no CP há expressão de mais do que um OR por célula epitelial. Contudo, este assunto permanece pouco explorado, sendo

necessário um estudo alargado a um maior número de ORs para corroborar os nossos resultados.

Estudos de eletrofisiologia, realizados em paralelo com o presente trabalho, mostraram que o CP responde a estímulos “olfativos”, nomeadamente às poliaminas. De modo a responder ao segundo objetivo deste estudo, o de validar as CPEC como modelo, *in vitro*, para ensaios de resposta a estímulos “olfativos” montámos e otimizámos a técnica de  $Ca^{2+}$  *imaging*, para medição da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular. Começámos por testar a resposta das CPEC à poliamina putrescina, nas concentrações que provocaram resposta eletrofisiológica do CP: 5mM, 10mM e 15mM. Numa primeira análise, a putrescina parecia provocar alteração dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Figura 19A). Contudo, após uma análise mais detalhada dos resultados, verificou-se que as alterações não se deviam à variação de  $Ca^{2+}$  intracelular, pois a alteração de intensidade de fluorescência foi observada de igual modo nos dois canais. Isto é, quando se adicionava um estímulo a emissão a ambos os comprimentos de onda respondiam na mesma direção, sendo o esperado um aumento a 340 nm e uma diminuição a 380 nm quando há subida da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ . Decidimos então utilizar um composto como controlo positivo, a ionomicina, descrita como um promotor do aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular, por causar pequenos poros na membrana das células que nos permite saber o valor máximo de intensidade de fluorescência a 340nm (Müller et al. 2013; Rada et al. 2014). Introduzimos também a utilização de um controlo negativo, o EGTA, um quelante de  $Ca^{2+}$ , que permite saber o valor máximo de fluorescência a 380nm. Contudo, após adição dos estímulos referenciados como controlo não obtivemos alterações de  $Ca^{2+}$  intracelular. Tendo em consideração os resultados obtidos dos controlos e a observação das células após incorporação da sonda levantaram-se questões fundamentais. Constatou-se que a sonda FURA-2AM se apresentava compartimentalizada dentro das células e não no citoplasma (Figura 20), o que a impedia de responder às variações de  $Ca^{2+}$  (Roe et al. 1990; Takahashi et al. 1999).

Esta observação levou-nos a pesquisar ainda mais sobre a técnica e está descrito que células epiteliais têm tendência a compartimentalizar sondas esterificadas ligadas ao grupo acetoximetilo (AM- acetoxymethyl groups), pois a velocidade da atividade das esterases citosólicas não é suficiente para desterificar a sonda e a tornar incapaz de atravessar membranas (Roe et al. 1990). O FURA-2AM é uma molécula hidrofóbica que atravessa facilmente as membranas plasmática das células. Uma vez no interior das células, as esterases citosólicas clivam os AM da molécula e originam um composto altamente carregado que não consegue atravessar as membranas celulares e fica retido no citoplasma (Oakes et al. 1988; Tsien 1989; Roe et al. 1990).

Posto todos estes motivos, e com base nos estudos de Roe et al. (Roe et al. 1990), decidimos realizar incubações a diferentes tempos e temperaturas. Observámos que, nas CPEC, quanto maior é o tempo de incubação das células com FURA-2AM maior a quantidade de sonda

compartimentalizada, tendo sido observada a sonda dispersa no citoplasma apenas na condição onde se pré-incubaram as CPEC a 4°C durante 5 minutos, antes da incubação com a sonda a 37°C durante 20 minutos e uma nova incubação com aCSF durante 15 minutos a 37°C para desterrificar a sonda. O tempo de desterrificação também foi avaliado não se tendo verificado diferença entre 15 minutos, 30 minutos ou 1 hora, tendo-se optado por 15 minutos.

Deste modo, após a realização deste trabalho de otimização, pensamos ter todas as condições otimizadas para realizar ensaios de  $Ca^{2+}$  *imaging* com o FURA2-AM em CPEC, e prosseguir com os ensaios funcionais, por forma a esclarecer a relevância funcional da via de transdução olfativa no CP.

Na sequência dos estudos paralelos que revelaram que o CP responde eletrofisiologicamente às poliaminas, questionámo-nos quanto ao metabolismo deste grupo de compostos químicos neste tecido. Dada a importância fisiológica das poliaminas, que desempenham um papel fundamental em muitos processos bioquímicos, incluindo regulação da transcrição e tradução, modulação da atividade enzimática, regulação de canais iónicos, resposta ao stress oxidativo e apoptose (Agostinelli et al. 2010; Minois et al. 2011; Perez-Leal & Merali 2012; Pegg 2014), achámos de máxima relevância o estudo do seu metabolismo no CP de rato. Começámos por analisar a expressão génica, das enzimas da via biossintética das poliaminas, nomeadamente a OCD, a SPMS e a SPDS e da via catabólica, as enzimas AMD1, Azin1, SSAT e Oaz1, por RT-PCR, em CP de rato.

A análise da expressão da proteína OCD foi efetuada por *Western blot*, tendo-se visualizado uma banda com um peso molecular de ~53KDa como descrito na literatura (Heby & Persson 1990; Tian et al. 2006; Perez-Leal & Merali 2012).

A distribuição e localização das proteínas OCD e SPSY foi efetuada através de ensaios de imunofluorescência em explantes de CP, que revelaram a presença de OCD e de SPSY, com localização citoplasmática nas células epiteliais dos mesmos, como descrito por Schipper et al (Schipper & Verhofstad 2002; Schipper et al. 2004).

Com base nos resultados do presente trabalho, que vieram completar os estudos anteriores, podemos afirmar que todos os componentes da via da transdução olfativa estão presentes no CP, o que poderá estar envolvido no reconhecimento de estímulos químicos presentes no CSF. É sabido que o CP, constituindo a barreira sangue-CSF, filtra moléculas/drogas do sangue, determinando assim a sua biodisponibilidade no CNS (Lehtinen et al. 2013). Estes são os primeiros estudos que indicam a presença da maquinaria de transdução olfativa no CP, uma estrutura que funciona como barreira e sistema de desintoxicação, tal como o rim e a placenta. Deste modo, a via de transdução olfativa no CP poderá funcionar como um sensor de composição química do CSF e, deste modo, induzir respostas celulares de acordo com o estado fisiológico de CNS.

Os resultados deste trabalho, vêm também mostrar, pela primeira vez, a expressão gênica e proteica de moléculas envolvidas no metabolismo das poliaminas no CP. Considerando que uma das principais funções do CP é a produção e destoxificação do CSF, a via das poliaminas poderá ser uma das vias pelas quais o CP responde a alterações no CSF.

A longo prazo, o total esclarecimento da funcionalidade da via de sinalização do olfato, no CP, poderá contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela vigilância da composição do CSF, por parte do CP, e da homeostasia cerebral.



## **Capítulo 6**

# **Conclusões e Perspetivas Futuras**



## 6. Conclusões e perspectivas futuras

Com a realização deste trabalho foi possível provar e concluir a presença de toda a maquinaria de uma via quimiossensitiva, a via de transdução olfativa, no CP de rato.

Os nossos resultados sugerem uma possível função do CP na transdução olfativa, onde os genes dos ORs podem não funcionar como recetores olfativos, mas ter outras funções com importantes implicações na vigilância da composição do CSF.

Foi também possível provar que o CP possui as enzimas que intervêm na biossíntese e catabolismo das poliaminas, compostos químicos fundamentais em muitos processos bioquímicos.

Uma vez que a cascata de transdução olfativa está presente no CP, é necessário provar a funcionalidade desta via nas CPEC. Para isso, serão realizados estímulos das CPEC com as poliaminas putrescina, cadaverina, espermina e espermidina e será analisada a resposta destas células por  $Ca^{2+}$  *imaging*. Para provar a especificidade da resposta aos estímulos “olfativos”, pretende-se também bloquear os componentes da via de transdução olfativa, como o CNG (tetracaína e o L-cis-Diltiazem), a AC3 (fármaco SQ22356) e a PLC (fármaco U73122) e analisar a resposta das células após o bloqueio.

Seria interessante ainda estudar o efeito das hormonas no padrão de expressão de ORs, com sondas Taqman específicas, por *real time* PCR.

Perspetiva-se ainda a conclusão do estudo do metabolismo das poliaminas no CP, nomeadamente verificar a expressão das restantes enzimas por *Western blot* e imunofluorescência.

Alguns autores defendem que uma via alternativa de síntese de GABA é a conversão de putrescina em GABA (De Mello et al. 1993; Sequerra et al. 2007). Como é sabido o CP sintetiza GABA, seria também interessante realizar ensaios no sentido de esclarecer se a síntese de GABA no CP pode também ser efetuada a partir da putrescina.



# **Capítulo 7**

## **Referências Bibliográficas**



## 7. Referências Bibliográficas

- Ache, B.W. & Young, J.M., 2005. Olfaction: Diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48, pp.417-430.
- Agostinelli, E., Marques, M.P.M., Calheiros, R., Gil, F.P.S.C., Tempera, G., Viceconte, N., Battaglia, V., et al., 2010. Polyamines: Fundamental characters in chemistry and biology. In *Amino Acids*. pp. 393-403.
- Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, a & Axel, R., 1998. Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron*, 20, pp.69-81.
- Borisy, F.F., Ronnett, G. V, Cunningham, A.M., Juilfs, D., Beavo, J. & Snyder, S.H., 1992. Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *The Journal of neuroscience*, 12, pp.915-923.
- Bradley, J., Reisert, J. & Frings, S., 2005. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Current Opinion in Neurobiology*, 15, pp.343-349.
- Bradley, J., Reuter, D. & Frings, S., 2001. Facilitation of calmodulin-mediated odor adaptation by cAMP-gated channel subunits. *Science*, 294, pp.2176-2178.
- Brady, J.D., Rich, T.C., Le, X., Stafford, K., Fowler, C.J., Lynch, L., Karpen, J.W., et al., 2004. Functional role of lipid raft microdomains in cyclic nucleotide-gated channel activation. *Molecular pharmacology*, 65, pp.503-511.
- Brand, C.S., Hocker, H.J., Gorfe, A. a, Cavasotto, C.N. & Dessauer, C.W., 2013. Isoform selectivity of adenylyl cyclase inhibitors: characterization of known and novel compounds. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 347, pp.265-275.
- Braun, T., Volland, P., Kunz, L., Prinz, C. & Gratzl, M., 2007. Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants. *Gastroenterology*, 132, pp.1890-1901.
- Brown, P.D., Davies, S.L., Speake, T. & Millar, I.D., 2004. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, 129, pp.957-970.
- Brunet, L.J., Gold, G.H. & Ngai, J., 1996. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron*, 17, pp.681-693.

- Buck, L. & Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65, pp.175-187.
- Buck, L.B., 2000. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell*, 100, pp.611-618.
- Bush, C.F. & Hall, R.A., 2008. Olfactory receptor trafficking to the plasma membrane. *Cellular and molecular life sciences*, 65, pp.2289-2295.
- Carter, C.J., 1994. Neuropharmacology of Polyamines.
- Chaudhuri, D., Choudhury, I. & Mukherjea, M., 1983. Ontogeny of polyamines in relation to nucleic acids in brain and spinal cord of the developing human fetus. *Brain research*, 312, pp.143-145.
- Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R. & Buck, J., 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, 289, pp.625-628.
- Chodobski, A. & Szmydynger-Chodobska, J., 2001. Choroid plexus: Target for polypeptides and site of their synthesis. *Microscopy Research and Technique*, 52, pp.65-82.
- Cornford, E.M., Varesi, J.B., Hyman, S., Damian, R.T. & Raleigh, M.J., 1997. Mitochondrial content of choroid plexus epithelium. *Experimental brain research*, 116, pp.399-405.
- Damkier, H.H., Brown, P.D. & Praetorius, J., 2013. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiological reviews*, 93, pp.1847-1892.
- Defer, N., Marinx, O., Poyard, M., Lienard, M.O., Jégou, B. & Hanoune, J., 1998. The olfactory adenylyl cyclase type 3 is expressed in male germ cells. *FEBS Letters*, 424, pp.216-220.
- DeMaria, S. & Ngai, J., 2010. The cell biology of smell. *The Journal of cell biology*, 191, pp.443-452.
- Du, L., Wu, C., Liu, Q., Huang, L. & Wang, P., 2013. Recent advances in olfactory receptor-based biosensors. *Biosensors & bioelectronics*, 42, pp.570-580.
- Ekegren, T. & Gomes-Trolin, C., 2005. Determination of polyamines in human tissues by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 338, pp.179-185.

- Emerich, D.F., Skinner, S.J.M., Borlongan, C. V, Vasconcellos, A. V & Thanos, C.G., 2005. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *BioEssays*, 27, pp.262-274.
- Emerich, D.F., Vasconcellos, A. V, Elliott, R.B., Skinner, S.J.M. & Borlongan, C. V, 2004. The choroid plexus: function, pathology and therapeutic potential of its transplantation. *Expert opinion on biological therapy*, 4, pp.1191-1201.
- Ennis, M., Hamilton, K.A. & Hayar, A., 2007. Neurochemistry of the main olfactory system. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, pp.137-204.
- Fadool, D.A. & Ache, B.W., 1992. Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate-activated channels mediate signal transduction in lobster olfactory receptor neurons. *Neuron*, 9, pp.907-918.
- Falcão, A.M., Marques, F., Novais, A., Sousa, N., Palha, J. a & Sousa, J.C., 2012. The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow! *Frontiers in cellular neuroscience*, 6, p.34.
- Feldmesser, E., Olender, T., Khen, M., Yanai, I., Ophir, R. & Lancet, D., 2006. Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. *BMC genomics*, 7, p.121.
- Fleischer, J., Breer, H. & Strotmann, J., 2009. Mammalian olfactory receptors. *Frontiers in cellular neuroscience*, 3, p.9.
- Foster, S.R., Roura, E. & Thomas, W.G., 2014. Extrasensory perception: Odorant and taste receptors beyond the nose and mouth. *Pharmacology and Therapeutics*, 142, pp.41-61.
- Fukuda, N. & Touhara, K., 2006. Developmental expression patterns of testicular olfactory receptor genes during mouse spermatogenesis. *Genes to cells*, 11, pp.71-81.
- Fukuda, N., Yomogida, K., Okabe, M. & Touhara, K., 2004. Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *Journal of cell science*, 117, pp.5835-5845.
- Gao, B. & Meier, P.J., 2001. Organic anion transport across the choroid plexus. *Microscopy research and technique*, 52, pp.60-64.
- Gao, J.-H., Guo, L.-J., Huang, Z.-Y., Rao, J.N. & Tang, C.-W., 2013. Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract. *Journal of physiology and pharmacology*, 64, pp.681-693.

- Gaudin, J.C., Breuils, L. & Haertlé, T., 2006. Mouse orthologs of human olfactory-like receptors expressed in the tongue. *Gene*, 381, pp.42-48.
- Gautier-Courteille, C., Salanova, M. & Conti, M., 1998. The olfactory adenylyl cyclase III is expressed in rat germ cells during spermiogenesis. *Endocrinology*, 139, pp.2588-2599.
- Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I. & Lancet, D., 2001. The complete human olfactory subgenome. *Genome research*, 11, pp.685-702.
- Griffin, C.A., Kafadar, K.A. & Pavlath, G.K., 2009. MOR23 Promotes Muscle Regeneration and Regulates Cell Adhesion and Migration. *Developmental Cell*, 17, pp.649-661.
- Goodenough, P.W., 1998. The molecular biology of olfactory perception. *International Journal of Food Science and Technology*, 33, pp.63-77.
- Hanoune, J. & Defer, N., 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41, pp.145-174.
- Heby, O. & Persson, L., 1990. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends in biochemical sciences*, 15, pp.153-158.
- Hoover, K.C., 2013. Evolution of Olfactory Receptors. *Olfactory Receptors*. pp. 241-249.
- Huart, C., Rombaux, P. & Hummel, T., 2013. Plasticity of the human olfactory system: the olfactory bulb. *Molecules*, 18, pp.11586-11600.
- Huque, T. & Bruch, R.C., 1986. Odorant- and guanine nucleotide-stimulated phosphoinositide turnover in olfactory cilia. *Biochemical and biophysical research communications*, 137, pp.36-42.
- Hurowitz, E.H., Melnyk, J.M., Chen, Y.J., Kouros-Mehr, H., Simon, M.I. & Shizuya, H., 2000. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA research*, 7, pp.111-120.
- Itakura, S., Ohno, K., Ueki, T., Sato, K. & Kanayama, N., 2006. Expression of Golf in the rat placenta: Possible implication in olfactory receptor transduction. *Placenta*, 27, pp.103-108.
- Kang, N. & Koo, J., 2012. Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. *BMB reports*, 45, pp.612-622.
- Kaupp, U.B. & Seifert, R., 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological reviews*, 82, pp.769-824.

- Kleene, S.J., 2008. The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chemical senses*, 33, pp.839-859.
- Lehtinen, M.K., Bjornsson, C.S., Dymecki, S.M., Gilbertson, R.J., Holtzman, D.M. & Monuki, E.S., 2013. The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *The Journal of neuroscience*, 33, pp.17553-17559.
- Leinders-Zufall, T., Ma, M. & Zufall, F., 1999. Impaired odor adaptation in olfactory receptor neurons after inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *The Journal of neuroscience*, 19, p.19.
- Li, J., Doyle, K.M. & Tatlisumak, T., 2007. Polyamines in the brain: distribution, biological interactions, and their potential therapeutic role in brain ischaemia. *Current Medicinal Chemistry*, 14, pp.1807-1813.
- Litvin, T.N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J. & Levin, L.R., 2003. Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *The Journal of biological chemistry*, 278, pp.15922-15926.
- Lucero, M., 2013. Peripheral modulation of smell: Fact or fiction? *Seminars in cell & developmental biology*, 24, pp.58-70.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. & Buck, L.B., 1999. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96, pp.713-723.
- Mao, J., Zhang, X., Sieli, P.T., Falduto, M.T., Torres, K.E. & Rosenfeld, C.S., 2010. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, pp.5557-5562.
- Marieb E., Hoehn K., 2007. Human anatomy & physiology. *Pearson Education*.
- De Mello, M.C.F., Guerra-Peixe, R. & De Mello, F.G., 1993. Excitatory amino acid receptors mediate the glutamate-induced release of GABA synthesized from putrescine in cultured cells of embryonic avian retina. *Neurochemistry International*, 22, pp.249-253.
- Menini, A., 1999. Calcium signalling and regulation in olfactory neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 9, pp.419-426.
- Menini, A., Lagostena, L. & Boccaccio, A., 2004. Olfaction: from odorant molecules to the olfactory cortex. *News in physiological sciences*, 19, pp.101-104.
- Menini, A., 2010. The Neurobiology of olfaction. 1st edition. CRC Press.

- Mezler, M., Fleischer, J. & Breer, H., 2001. Characteristic features and ligand specificity of the two olfactory receptor classes from *Xenopus laevis*. *The Journal of experimental biology*, 204, pp.2987-2997.
- Milligan, G. & Kostenis, E., 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British journal of pharmacology*, 147, pp.46-55.
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D. & Madeo, F., 2011. Polyamines in aging and disease. *Aging*, 3, pp.716-732.
- Moinard, C., Cynober, L. & de Bandt, J.P., 2005. Polyamines: Metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24, pp.184-197.
- Mombaerts, P., 2004. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nature reviews. Neuroscience*, 5, pp.263-278.
- Mombaerts, P., 1999. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*, 286, pp.707-711.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Vassar, R., Chao, S.K., Nemes, a, Mendelsohn, M., et al., 1996. The molecular biology of olfactory perception. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 61, pp.135-145.
- Morales, J., Fishburn, C.S., Wilson, P.T. & Bourne, H.R., 1998. Plasma membrane localization of G alpha z requires two signals. *Molecular biology of the cell*, 9, pp.1-14.
- Mortazavi, M.M., Griessenauer, C.J., Adeeb, N., Deep, A., Shahripour, R.B., Loukas, M., Tubbs, R.I., et al., 2014. The choroid plexus: A comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations. *Child's Nervous System*, 30, pp.205-214.
- Müller, M.S., Obel, L.F., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A. & Bak, L.K., 2013. Complex actions of ionomycin in cultured cerebellar astrocytes affecting both calcium-induced calcium release and store-operated calcium entry. *Neurochemical Research*, 38, pp.1260-1265.
- Nakamura, T., Gold, G.H., 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*, 325, pp.29.

- Nimura, Y. & Nei, M., 2007. Extensive gains and losses of olfactory receptor genes in mammalian evolution. *PLoS ONE*, 2, pp.1-8.
- Oakes, S.G., Martin, W.J., Lisek, C.A. & Powis, G., 1988. Incomplete hydrolysis of the calcium indicator precursor fura-2 pentaacetoxymethyl ester (fura-2 AM) by cells. *Analytical biochemistry*, 169, pp.159-166.
- Oztokatli, H., Hornberg, M., Berghard, A. & Bohm, S., 2012. Retinoic acid receptor and CNGA2 channel signaling are part of a regulatory feedback loop controlling axonal convergence and survival of olfactory sensory neurons. *The FASEB Journal*, 26, pp.617-627.
- Paik, M.-J., Ahn, Y.-H., Lee, P.H., Kang, H., Park, C.B., Choi, S. & Lee, G., 2010. Polyamine patterns in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Clinica chimica acta*, 411, pp.1532-1535.
- Pegg, A.E., 2014. The function of spermine. *IUBMB Life*, 66, pp.8-18.
- Perez-Leal, O. & Merali, S., 2012. Regulation of polyamine metabolism by translational control. *Amino Acids*, 42, pp.611-617.
- Pluznick, J.L., Protzko, R.J., Gevorgyan, H., Peterlin, Z., Sipos, A., Han, J., Brunet, I., et al., 2013. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, pp.4410-4415.
- Pluznick, J.L., Zou, D.-J., Zhang, X., Yan, Q., Rodriguez-Gil, D.J., Eisner, C., Wells, E., et al., 2009. Functional expression of the olfactory signaling system in the kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, pp.2059-2064.
- Podda, M.V. & Grassi, C., 2013. New perspectives in cyclic nucleotide-mediated functions in the CNS: the emerging role of cyclic nucleotide-gated (CNG) channels. *Pflugers Archiv*, 466, pp.1241-1257.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Lawrence, C. K. Lamantia, S., McNamara, J.O. Williams, S.M., 2005. *Neuroscience*. 3rd edition, Sinauer Associates Inc.
- Quintela, T., Gonçalves, I., Baltazar, G., Alves, C.H., Saraiva, M.J. & Santos, C.R.A., 2009. 17beta-estradiol induces transthyretin expression in murine choroid plexus via an oestrogen receptor dependent pathway. *Cellular and molecular neurobiology*, 29, pp.475-483.

- Quintela, T., Gonçalves, I., Carreto, L.C., Santos, M.A.S., Marcelino, H., Patriarca, F.M. & Santos, C.R.A., 2013. Analysis of the Effects of Sex Hormone Background on the Rat Choroid Plexus Transcriptome by cDNA Microarrays. *PLoS ONE*, 8.
- Rada, B., Park, J.J., Sil, P., Geiszt, M. & Leto, T.L., 2014. NLRP3 inflammasome activation and interleukin-1 $\beta$  release in macrophages require calcium but are independent of calcium-activated NADPH oxidases. *Inflammation Research*, 63, pp.821-830.
- Ramani, D., De Bandt, J.P. & Cynober, L., 2014. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. *Clinical Nutrition*, 33, pp.14-22.
- 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, pp.1695-1716.
- Reed, R.R., 2003. The contribution of signaling pathways to olfactory organization and development. *Current Opinion in Neurobiology*, 13, pp.482-486.
- Reisert, J. & Matthews, H.R., 1998. Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells. *The Journal of general physiology*, 112, pp.529-535.
- Restrepo, D., Miyamoto, T., Bryant, B.P. & Teeter, J.H., 1990. Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel catfish. *Science*, 249, pp.1166-1168.
- Rhein, L.D. & Cagan, R.H., 1983. Biochemical studies of olfaction: binding specificity of odorants to a cilia preparation from rainbow trout olfactory rosettes. *Journal of neurochemistry*, 41, pp.569-577.
- Rinaldi, A., 2007. The scent of life. *EMBO reports*, 8, pp.629-633.
- Roe, M.W., Lemasters, J.J., Herman, B., 1990. Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium*, 11, pp.63-73.
- Ronnett, G. V & Moon, C., 2002. G proteins and olfactory signal transduction. *Annual review of physiology*, 64, pp.189-222.
- Rouquier, S., Taviaux, S., Trask, B.J., Brand-Arpon, V., van den Engh, G., Demaille, J. & Giorgi, D., 1998. Distribution of olfactory receptor genes in the human genome. *Nature Genetics*, 18, pp.243-250.
- Sadana, R. & Dessauer, C.W., 2009. Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neuro-Signals*, 17, pp.5-22.

- Schipper, R.G., Cuijpers, V.M.J.I., De Groot, L.H.J.M., Thio, M. & Verhofstad, A.A.J., 2004. Intracellular localization of ornithine decarboxylase and its regulatory protein, antizyme-1. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 52, pp.1259-1266.
- Schipper, R.G. & Verhofstad, A.A.J., 2002. Distribution patterns of ornithine decarboxylase in cells and tissues: facts, problems, and postulates. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 50, pp.1143-1160.
- Seeley, R., Kennedy, J., Tate, P., 2008. Anatomia e Fisiologia, 8ª Edição. Lusociência, pp.443-458.
- Segal, M.B., 2000. The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 20, pp.183-196.
- Sequerra, E.B., Gardino, P., Hedin-Pereira, C. & de Mello, F.G., 2007. Putrescine as an important source of GABA in the postnatal rat subventricular zone. *Neuroscience*, 146, pp.489-493.
- Serizawa, S., Miyamichi, K. & Sakano, H., 2004. One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends in Genetics*, 20, pp.648-653.
- Serot, J.M., Bene, M.C. & Faure, G.C., 2003. Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience*, 8, pp.515-521.
- Shaw, G.G. & Pateman A.J., 1973. The regional distribution of the polyamines spermidine and spermine in brain. *Journal of Neurochemistry*, 20, pp.1225-1230.
- Skipor, J. & Thiery, J.-C., 2008. The choroid plexus--cerebrospinal fluid system: undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 68, pp.414-428.
- Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J.A., Wetzell, C.H., Zimmer, R.K. & Hatt, H., 2003. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*, 299, pp.2054-2058.
- Stephan, A.B., Tobochnik, S., Dibattista, M., Wall, C.M., Reisert, J. & Zhao, H., 2011. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger NCKX4 governs termination and adaptation of the mammalian olfactory response. *Nature Neuroscience*, 15, pp.131-137.
- Stockhorst, U. & Pietrowsky, R., 2004. Olfactory perception, communication, and the nose-to-brain pathway. *Physiology & behavior*, 83, pp.3-11.

- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D. & Herman, B., 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews*, 79, pp.1089-1125.
- Thouvenot, E., Lafon-Cazal, M., Demettre, 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, pp.5941-5952.
- Tian, H., Huang, Q., Li, L., Liu, X.X. & Zhang, Y., 2006. Gene expression of ornithine decarboxylase in lung cancers and its clinical significance. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38, pp.639-645.
- Tsien, R.Y., 1989. Fluorescent probes of cell signaling. *Annual review of neuroscience*, 12, pp.227-253.
- Vanderhaeghen, P., Schurmans, S., Vassart, G. & Parmentier, M., 1997. Specific repertoire of olfactory receptor genes in the male germ cells of several mammalian species. *Genomics*, 39, pp.239-246.
- Veitinger, T., Riffell, J.R., Veitinger, S., Nascimento, J.M., Triller, A., Chandsawangbhuwana, C., Schwane, K., et al., 2011. Chemosensory Ca<sup>2+</sup> dynamics correlate with diverse behavioral phenotypes in human sperm. *The Journal of biological chemistry*, 286, pp.17311-17325.
- Vorbrodt, A.W. & Dobrogowska, D.H., 2003. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: Electron microscopist's view. *Brain Research Reviews*, 42, pp.221-242.
- Vosshall, L.B., 2004. Olfaction: Attracting both sperm and the nose. *Current Biology*, 14.
- Wackym, P.A., Cioffi, J.A., Erbe, C.B. & Popper, P., 2005. G-protein Golfalpha (GNAL) is expressed in the vestibular end organs and primary afferent neurons of *Rattus norvegicus*. *Journal of vestibular research: equilibrium & orientation*, 15, pp.11-15.
- Wei, J., Zhao, A.Z., Chan, G.C.K., Baker, L.P., Impey, S., Beavo, J.A. & Storm, D.R., 1998. Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in neurons: A mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron*, 21, pp.495-504.
- Wettschureck, N. & Offermanns, S., 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews*, 85, pp.1159-1204.
- Wilkinson, R., Tschärke, D. & Simmons, A., 1999. Golf a is expressed in primary sensory neurons outside of the olfactory neuroepithelium. *Brain Research*, 831, pp.311-314.

- Wolburg, H. & Paulus, W., 2010. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119, pp.75-88.
- Wong, S.T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G.C., Lowe, G., Gaggar, a, Xia, Z., et al., 2000. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron*, 27, pp.487-497.
- Yan, C., Zhao, A.Z., Bentley, J.K., Loughney, K., Ferguson, K. & Beavo, J.A., 1995. Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, pp.9677-9681.
- Yatin, M., 2002. Polyamines in Living Organisms. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 1, pp.57-67.
- Young, J.M. & Trask, B.J., 2002. The sense of smell: genomics of vertebrate odorant receptors. *Human molecular genetics*, 11, pp.1153-1160.
- Zappaterra, M.W. & Lehtinen, M.K., 2012. The cerebrospinal fluid: Regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, pp.2863-2878.
- Zhang, X. & Firestein, S., 2002. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nature neuroscience*, 5, pp.124-133.
- Zheng, J. & Zagotta, W.N., 2004. Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*, 42, pp.411-421.
- Zozulya, S., Echeverri, F. & Nguyen, T., 2001. The human olfactory receptor repertoire. *Genome biology*, 2.