



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Será que a maquinaria de transdução olfativa está presente no intestino?

Carla Filipa Costa Gomes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientadoras:

Prof. Doutora Isabel Gonçalves

Prof. Doutora Cecília Santos

Covilhã, junho de 2013

Será que a maquinaria de transdução olfativa está presente no intestino?



Centro de Investigação em Ciências da Saúde
Health Sciences Research Centre

Será que a maquinaria de transdução olfativa está presente no intestino?

Carla Filipa Costa Gomes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientadoras:

Prof. Doutora Isabel Gonçalves

Prof. Doutora Cecília Santos

Covilhã, junho de 2013

A parte laboratorial desta dissertação foi realizada no Centro de Investigação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.

Será que a maquinaria de transdução olfativa está presente no intestino?

O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade do autor.

(Carla Filipa Costa Gomes)

Agradecimentos

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Bioquímica me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Assim, deixo apenas algumas palavras, mas um profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

À Coordenadora do Mestrado em Bioquímica, *Professora Doutora Cândida Tomaz*, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

Às fontes de financiamento (project [Pest-C/SAU/U0709/2011](#) by the Portuguese Foundation for Science and Technology through the COMPETE program) que tornaram possível a realização deste projeto, um especial obrigada.

À *Professora Doutora Cecília Santos*, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação, conhecimentos, e apoio incondicionais. Agradeço também a oportunidade que me deu de me integrar no seu Grupo de Investigação e reconheço, com gratidão, não só a confiança que em mim depositou, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases do projeto.

À *Professora Doutora Isabel Gonçalves*, o meu sincero agradecimento pela orientação neste projeto. Muito obrigada pelo profissionalismo, sincera amizade e total disponibilidade que sempre revelou para comigo. O seu apoio foi determinante na elaboração desta Dissertação, e em muito elevou os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimulou o meu desejo de querer saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor.

À *Gabriela Tavares*, um Muito Obrigada por todo o carinho e amizade que me manifestou. Agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio, a preocupação e os ensinamentos, desde que cheguei ao CICS bem como nos momentos de maior aflição.

Quero também agradecer à *Telma* pelas dicas que me prestou em termos laboratoriais e pelos conhecimentos teóricos e práticos que me transmitiu.

À *Joana*, pelo apoio, resolução de dúvidas, conhecimentos teóricos e práticos transmitidos e pela disponibilidade e simpatia sempre demonstradas.

Agradeço, também, à *Claúdia*, à *Ana Raquel*, à *Filipa* e ao *Zé*, por terem sido os meus companheiros de trabalho durante este ano.

À *Catarina*, pela realização dos cortes histológicos utilizados neste projeto.

Quero ainda dar um obrigado muito especial à “minha semi-conterrânea” *Inês Alvelos* por toda a disponibilidade demonstrada e por tudo o que me ensinaste.

Aos docentes, investigadores e técnicas que prescindiram de algum do seu precioso tempo para responder a qualquer dúvida e pelos ensinamentos que me passaram.

Aos meus amigos, por todo o apoio e paciência.

Ao meu namorado, André, agradeço com um carinho muito especial, a compreensão, o incentivo e a paciência que teve para comigo.

À *Minha Família*, em especial aos *Meus Pais*, que são o meu pilar onde fui buscar energias quando mais precisei, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

Resumo

Os recetores olfativos (ORs) são proteínas transmembranares, associadas à proteína G e que funcionam, no epitélio olfativo, como quimiosensores para a deteção de odores. A capacidade do sistema olfativo para detetar um vasto universo de compostos químicos depende, em larga medida, do fato de existirem cerca de 1000 genes de ORs no genoma dos mamíferos. No epitélio olfativo, a informação sobre os odores, recebida por esta multiplicidade de ORs, é canalizada apenas por uma via de sinalização. Quando a molécula de odor se liga ao OR, este ativa um tipo específico de proteína G, a proteína G olfativa trimérica (Golf), a qual por sua vez ativa a isoforma olfativa da adenilato ciclase (AC3), resultando num aumento de Adenosina Monofosfato Cíclica (cAMP). Um dos alvos do cAMP é um canal catiónico que, quando aberto, permite um influxo de iões sódio (Na^+) e iões cálcio (Ca^{2+}) no cílio, resultando numa despolarização da célula. Tanto a AC3 como a Golf e o canal catiónico são constituintes obrigatórios da maquinaria olfativa. Já foram descritas algumas situações, em que os ORs têm funções quimiosensoriais, fora do epitélio olfativo nomeadamente no esperma, placenta e rim. Com este projeto, pretendeu-se saber se as vias de sinalização dos ORs são usadas pelas células intestinais de forma a responder a alterações no lúmen do trato gastrointestinal. O estudo da expressão a nível do mRNA, foi desenvolvido por RT-PCR e a análise da expressão das proteínas por Western Blotting e Imunohistoquímica. Os principais constituintes da via olfativa foram identificados no intestino: os ensaios de Western Blot e Imunohistoquímica mostraram a presença dos recetores olfativos (OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496), a adenilato ciclase tipo 3 (AC3) e a subunidade α da proteína G específica do olfato (G α olf). Os estudos de RT-PCR, embora ainda em curso, mostraram a presença de mRNA de genes que codificam para recetores olfativos e para a G α olf. Os resultados obtidos neste projeto experimental sugerem que a cascata de sinalização da transdução olfativa pode estar ativa no intestino, uma vez que as várias proteínas que a constituem se encontram expressas neste tecido. Esta via pode regular a motilidade do intestino e funcionar como um detetor de moléculas químicas solúveis que se encontrem no lúmen intestinal, induzindo respostas celulares de acordo com as necessidades fisiológicas.

Palavras-chave

Intestino, Recetores Olfativos, G α olf, AC3, Transdução Olfativa

Abstract

Olfactory receptors (ORs) are transmembrane proteins associated with G protein involved in recognition and transduction of odorant stimuli. The ability of the olfactory system to detect a broad universe of chemical compounds depends largely on the fact that there are about 1000 genes in the ORs mammalian genome. In the olfactory epithelium, the information about odors, received by this plurality of ORs is channeled only through a signaling pathway. When the OR binds to the odor molecule, it activates a specific type of G protein, the specific olfactory trimeric G-protein (Golf), which in turn activates adenylate cyclase olfactory isoform (AC3), resulting in an increase in Adenosine Monophosphate Cyclic (cAMP). One of the targets of cAMP is a cation channel which, when opened, allows an influx of sodium ions (Na^+) and calcium ions (Ca^{2+}) in the cilia, resulting in depolarization of the cell. Both the AC3 as the Golf and the cationic channel are mandatory components in the olfactory machinery. Olfactory-like chemosensory signaling occurs outside the olfactory epithelium, in other tissues where it also monitors the composition of fluids, in particular sperm, placenta, and kidney. So, with this project, we sought to know whether the olfactory signaling pathways are used by intestinal cells to respond to changes in the lumen of the gastrointestinal tract. The RNA analysis was performed by conventional PCR, and protein analysis by Western Blotting and Immunohistochemistry. We found that major components of olfaction, including olfactory receptors (OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496), olfactory-related adenylate cyclase (AC3) and olfactory G protein (G α olf), are expressed in the rat bowel. These results suggest that olfactory-like chemosensory pathway might be active in bowel and could function as regulator of intestine motility and as a detector of soluble chemical molecules in intestinal lumen, therefore inducing several cellular responses, according to physiological needs.

Keywords

Bowel, Olfactory Receptors, G α olf, AC3, Olfactory Transduction

Índice

1	Introdução	1
1.1	Sistema Digestivo - Trato Gastrointestinal	2
1.2	Intestino Delgado	3
1.2.1	Anatomia do Intestino Delgado	3
1.2.2	Histologia do Intestino Delgado	4
1.3	Intestino Grosso	6
1.3.1	Anatomia do Intestino Grosso	6
1.3.2	Histologia do Intestino Grosso	7
1.4	Sistema Olfativo	8
1.4.1	Transdução Olfativa por via aérea	9
1.4.1.1	Epitélio Olfativo - Organização e Tipos Celulares	9
1.4.1.2	Via de Transdução Olfativa	10
1.4.1.3	Componentes da Via de Transdução Olfativa	13
1.4.1.3.1	Recetores Olfativos (ORs)	13
1.4.1.3.2	Proteína G específica do olfato (Golf)	13
1.4.1.3.3	Adenilato ciclase tipo 3 (AC3)	14
1.4.1.3.4	Canais Nucleotídicos Cíclicos (CNCs)	15
1.4.2	Transdução Olfativa em meio aquoso	15
1.4.2.1	Transdução Olfativa presente em outros Sistemas (meio aquoso)	16
1.4.2.1.1	Placenta	16
1.4.2.1.2	Rim	17
1.4.2.1.3	Espermatozoides	18
1.4.2.1.4	Coração em Desenvolvimento	19
1.4.2.1.5	Língua	20
1.4.2.1.6	Baço e Pâncreas	20
1.4.2.1.7	Cérebro	20
1.4.2.1.8	Intestino	20
1.4.3	Funções Biológicas dos ORs nos Tecidos Olfativos	21
2.	Objetivo	22
3.	Materiais e Métodos	24
3.1	Animais e Recolha de Tecidos	25
3.2	Extração de RNA total de EO e Intestino de Rato	26
3.3	Síntese de cDNA (RT-PCR) a partir de RNA extraído de EO e Intestino de Rato	27
3.4	Amplificação Enzimática de DNA (PCR Convencional)	28
3.5	Purificação de Produtos de PCR para Clonagem	30
3.5.1	A partir de produtos de PCR conOR de intestino de rato	30
3.6	Clonagem de Produtos de PCR em pGEM-T Easy	30
3.6.1	Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor	31
3.6.2	Transformação de <i>E.coli</i> com DNA plasmídico	31
3.6.3	Cultura, em meio líquido, dos clones recombinantes	32
3.6.4	Purificação dos plasmídeos recombinantes	32

3.6.5 Digestão enzimática dos plasmídeos recombinantes e eletroforese em gel de agarose para verificação da digestão enzimática	33
3.7 Imunohistoquímica em Cortes Histológicos de EO e Intestino de Rato para deteção de AC3, G α olf, OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496	34
3.8 Extração e Quantificação de Proteína Total de EO e Intestino de Rato	36
3.9 Western Blotting em extratos proteicos de EO e Intestino de Rato para deteção de AC3, G α olf, OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496	37
4. Resultados	40
4.1 Deteção das proteínas AC3 e G α olf e dos Recetores Olfativos OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496 no EO e no Intestino de Rato por Imunohistoquímica	41
4.1.1 OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496 no Intestino de rato	42
4.1.2 AC3 e G α olf no Intestino de Rato	48
4.2 Deteção das proteínas AC3 e G α olf no EO e no Intestino de Rato por Western Blotting	50
4.3 Deteção dos Recetores Olfativos OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496 no EO e no Intestino de Rato por Western Blotting	51
4.4 Expressão dos genes OR por PCR Convencional com “primers” degenerados	53
4.5 Expressão génica da G α olf por PCR Convencional com “primers” específicos	54
5. Discussão	55
6. Conclusões e Perspetivas Futuras	59
8. Bibliografia	61

Lista de Figuras

- Figura 1.** Órgãos do Sistema Digestivo. Adaptado de Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009.
- Figura 2.** Diferentes Regiões do Duodeno. Adaptado de <http://resumosanatomia.blogspot.pt>.
- Figura 3.** Ilustração da histologia do Lúmen do Intestino Delgado. Adaptado de Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009.
- Figura 4.** Vista Anterior do Intestino Grosso. Adaptado de <http://nutrientesbiologia.blogspot.pt>.
- Figura 5.** Ilustração da Histologia das diferentes regiões do Intestino Grosso. Adaptado de Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009.
- Figura 6.** Epitélio Olfativo e a Organização dos OSNs e outros tipos celulares. (A) - Localização do epitélio olfativo na cavidade nasal. (B) - Principais tipos celulares no EO.
- Figura 7.** Via Canónica de Transdução Olfativa. Adaptado de NaNa Kang e J. Koo, 2012.
- Figura 8.** Inativação da Via de Transdução Olfativa por reposição dos níveis basais de cAMP. Adaptado de Ronnette e Moon, 2002).
- Figura 9.** Inativação da Via de Transdução Olfativa por feedback negativo sobre o canal nucleotídico cíclico. Adaptado de Ronnette e Moon, 2002).
- Figura 10.** Via Não Canónica de Transdução Olfativa. Adaptado de Ronnette e Moon, 2002.
- Figura 11.** Ilustração do local de incisão para extração de Epitélio Olfativo. Adaptado de Uraih e Maronpot, 1990.
- Figura 12.** Cortes histológicos de epitélio olfativo (A e B) e de intestino (C-J) de rato com marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer, usados como controlos negativos no projeto.
- Figura 13.** Expressão proteica da proteína OR19 (MOR 140-1) em INT e EO de rato.
- Figura 14.** Expressão proteica da proteína OR63 (MOR 267-1) em INT e EO de rato.
- Figura 15.** Expressão proteica da proteína OR600 (MOR 39-1) em INT e EO de rato.
- Figura 16.** Expressão proteica da proteína OR620/624 (MOR 4-1/MOR 4-2P) em INT e EO de rato.
- Figura 17.** Expressão proteica da proteína OR1496 (MOR 167-1) em INT e EO de rato.
- Figura 18.** Expressão proteica da adenilato ciclase 3 (AC3) em INT e EO de rato.
- Figura 19.** Expressão proteica da subunidade α da proteína G (G α olf) em Intestino de rato.
- Figura 20.** Western Blotting de extratos de proteína total de INT e de EO de rato, incubados com os anticorpos específicos anti-ACIII (A) e anti-G α olf (B).
- Figura 21.** Western Blotting de extratos de proteína total de INT de rato, incubados com os anticorpos os específicos anti-OR19 (A), anti-OR63 (B), anti-OR600 (C), anti-OR620/624 (D) e anti-OR1496 (E).
- Figura 22.** Eletroforese em gel de agarose a 1%, da amplificação enzimática dos conOR.
- Figura 23.** Eletroforese em gel de agarose a 1%, da amplificação enzimática da G α olf.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências de primers AC3 e Gaolf utilizados em PCR.

Tabela 2. Sequências de primers conOR e tamanho do fragmento obtido nas reações de PCR.

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados para a detecção das proteínas AC3 e Gaolf e dos Recetores Olfativos em Intestino e EO de Rato, pela técnica de imunohistoquímica.

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados para a detecção das proteínas AC3 e Gaolf e dos Recetores Olfativos em Intestino e EO de Rato, pela técnica de Western Blotting.

Lista de Acrónimos

ACIII ou AC3	Adenilato Ciclase tipo 3
ACtm	Adenilato Ciclase Transmembranar
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
CAPS	Ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico
Ca ²⁺ -CaM	Complexo Cálcio-Calmodulina
CCK	Colecistoquinina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CL	Colón
CNC	Canal Nucleotídico Cíclico
DAB	Diaminobenzina
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotideos Trifosfato
DTT	Ditiotreitol
DUO	Duodeno
EC	Células Enterocromafins
ECF	Enhanced Chemifluorescence
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EO	Epitélio Olfativo
FBS	Soro Fetal Bovino
FW	Forward
GH	Hormona do Crescimento
GIP	Péptido Insulinotrópico Dependente de Glicose
GDP	Guanosina Difosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
G α olf	Subunidade α da Proteína G específica do Olfato
HRP	Horseradish Peroxidase
IGF	Fator de Crescimento tipo-insulina
IL	Íleo
IMQ ou IHC	Imunohistoquímica
INT	Intestino
IP ₃	Inositol 1,4,5-Trifosfato
IPTG	Isopropyl B-D-1-thiogalactopyranoside

JEJ	Jejuno
LB-Agar	Agar Luria Bertani
LB-Broth	Meio Líquido de Luria Bertani
LCM	Local de Clonagem Múltipla
MALT	Tecido Linfático Associado a Mucosas
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
OR	Recetor Olfativo
OSN	Neurónio Sensorial Olfativo
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBS-T	Tampão Fosfato Salino com Tween20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldeído
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfato
PLC	Fosfolipase C
PMSF	Fluoreto Fenilmetanosulfonil
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
RV	Reverse
sAC	Adenilato Ciclase do Tipo Solúvel
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TGI	Trato Gastrointestinal
WB	Western Blotting

Será que a maquinaria de transdução olfativa está presente no intestino?

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Digestivo - trato gastrointestinal

Os alimentos que ingerimos contêm uma diversidade de nutrientes que são utilizados na construção de tecidos corporais, bem como na sua manutenção e reparação quando lesados. Os alimentos são, também, fundamentais para a vida uma vez que se tratam da nossa única fonte de energia química. Contudo, a maioria dos alimentos que ingerimos consistem em moléculas demasiado grandes para serem, imediatamente após a ingestão, usadas pelas células. Assim, os alimentos têm que ser transformados em moléculas mais pequenas, processo designado digestão, para que possam ser absorvidas e entrar para o interior das células (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

O sistema digestivo permite, ainda, a absorção de água, vitaminas e minerais e a eliminação de resíduos resultantes do metabolismo (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

O sistema digestivo ou sistema gastrointestinal é um sistema tubular composto por dois grupos de órgãos (figura 1): o trato gastrointestinal (TGI) e os órgãos digestivos acessórios.

O TGI ou canal alimentar é um tubo contínuo que se estende desde a boca até ao ânus, atravessando as cavidades torácica e abdominopélvica. Os órgãos do TGI incluem a boca, faringe, esófago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. Por outro lado, do grupo dos órgãos digestivos acessórios fazem parte os dentes, língua, glândulas salivares, fígado, vesícula biliar e pâncreas. Existem, ainda, outros órgãos digestivos acessórios, responsáveis pela produção e armazenamento de secreções que chegam ao trato gastrointestinal através de dutos; estas secreções auxiliam na modificação química dos alimentos (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

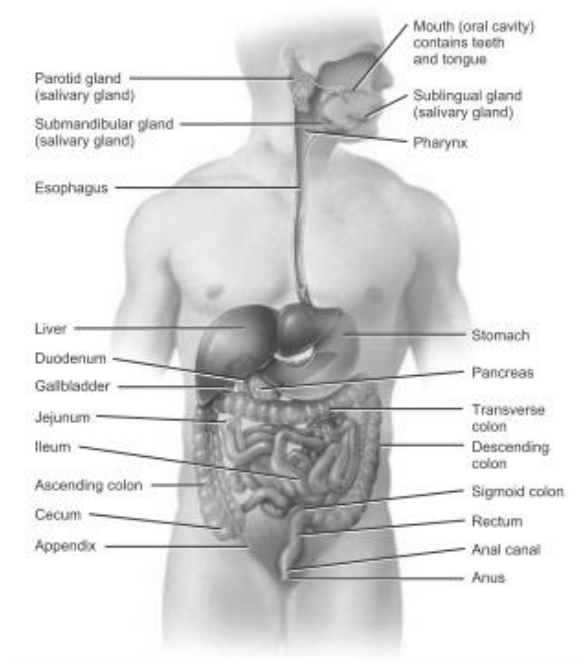


Figura 1. Órgãos do Sistema Digestivo. Adaptado de Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009.

1.2 Intestino Delgado

O intestino delgado é um segmento do trato digestivo superior que se inicia no esfíncter pilórico do estômago e termina na ligação ao intestino grosso, na união do cego com o cólon ascendente - válvula ileocecal ou esfíncter ileocecal. Apresenta cerca de 2,5m de diâmetro e 3m de comprimento num indivíduo vivo, ao passo que num cadáver possui 6,5m de comprimento devido à perda do tónus muscular após morte (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

A digestão e a absorção de nutrientes ocorrem, principalmente, ao longo do intestino delgado, sendo a sua estrutura especialmente adaptada para estas funções (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

O intestino delgado apresenta como principais funções a digestão completa de hidratos de carbono, de proteínas e de lípidos e a manutenção do contato dos alimentos com a mucosa permitindo a absorção de cerca de 90% de nutrientes e água que atravessam o trato digestivo (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

1.2.1 Anatomia do Intestino Delgado

O intestino delgado encontra-se dividido em três regiões: duodeno, jejuno e íleo (Ferrufino Juan C. *et al*, 1996; Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

O duodeno (DUO) é a região de menor extensão e localiza-se entre o estômago e o jejuno. Trata-se da primeira porção do intestino delgado, estendendo-se desde o piloro até à flexão duodeno-jejunal, onde se encontra o ligamento de Treitz, que fixa esta parte do intestino à parede posterior do abdómen (Ferrufino Juan C. *et al*, 1996); apresenta cerca de 25-30cm de comprimento e 3-4cm de diâmetro, estando dividido em quatro porções (figura 2). A primeira porção apresenta cerca de 5cm, enquanto a segunda, terceira e quarta porções têm, respetivamente, cerca de 10cm, 8cm e 7cm (Schmutz *et al.*, 2005).

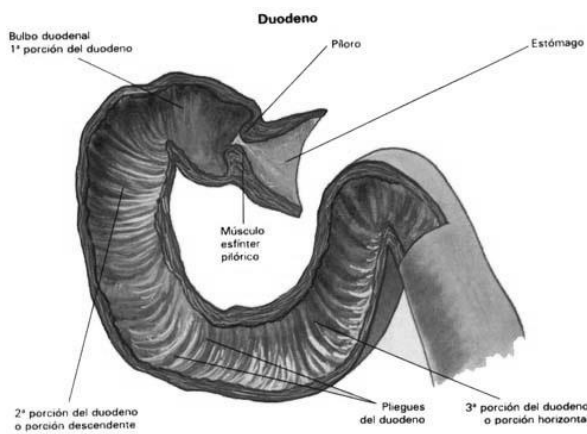


Figura 2. Diferentes regiões do Duodeno. Adaptado de <http://resumosanatomia.blogspot.pt>.

O jejuno (JEJ) tem cerca de 1m de comprimento e estende-se até ao íleo (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009). Este diferencia-se do duodeno e do íleo por possuir grandes e abundantes pregas circulares (Ferrufino Juan C. *et al*, 1996).

A parte final, e mais longa, do intestino delgado é o íleo (IL) que mede aproximadamente 2m e liga-se ao intestino grosso através de um esfíncter de músculo liso (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009), que apresenta, tecido adiposo abundante ao nível da submucosa (Ferrufino Juan C. *et al*, 1996).

1.2.2 Histologia do Intestino Delgado

A parede do intestino delgado é composta por quatro camadas. Partindo do interior para a superfície são elas: MUCOSA, SUBMUCOSA, MUSCULARIS e SEROSA (figura 3) (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

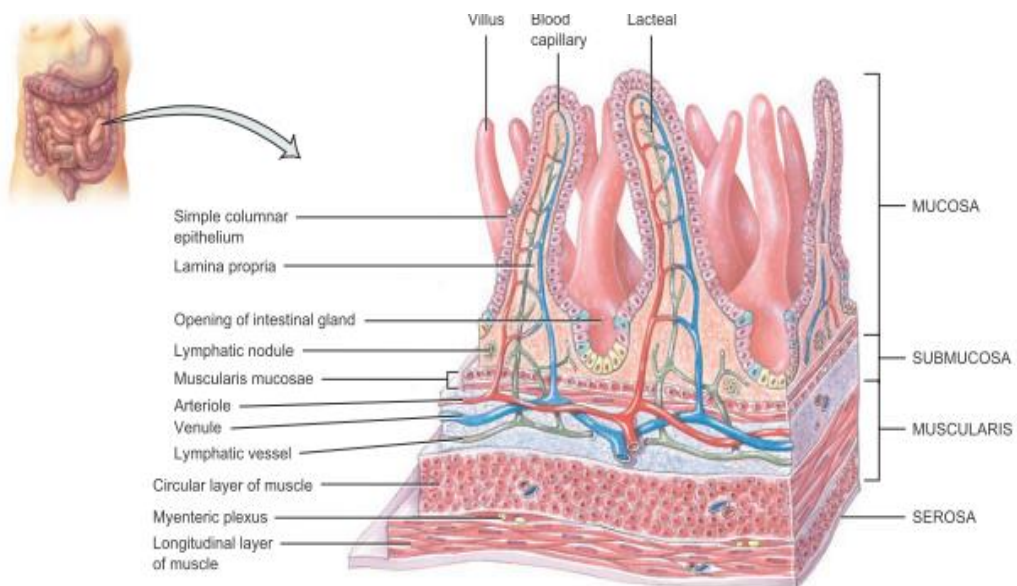


Figura 3. Histologia do Lúmen do Intestino Delgado. Adaptado de Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009.

A **MUCOSA** do intestino delgado é composta por três camadas: camada epitelial, lamina própria e muscularis mucosae (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

A **camada epitelial** consiste num epitélio colunar simples que contém diversos tipos celulares: células absorptivas ou enterócitos, células caliciformes, glândulas intestinais, células Paneth e células enteroendócrinas (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

As células absorptivas digerem e absorvem nutrientes do quimo, enquanto as células caliciformes ou células goblet têm como função a secreção de muco. Para além destas, a

mucosa do intestino delgado possui diversas “fendas” revestidas por epitélio glandular - as criptas de Lieberkühn. Estas glândulas intestinais apresentam células Paneth e células enteroendócrinas. As células Paneth secretam lisozima, uma enzima bactericida, e conseguem efetuar fagocitose, tendo um papel fundamental na regulação da população microbiana do intestino delgado; por outro lado, as células enteroendócrinas dividem-se em três tipos: células S, células CCK e células K, que secretam, respetivamente, as hormonas secretina, colecistoquinina (CCK) e o péptido insulínico dependente de glucose também denominado GIP (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

A **lamina propria** contém tecido conetivo areolar e grande abundância de tecido linfático associado a mucosas (MALT). Os gânglios linfáticos isolados são mais abundantes na parte distal do íleo enquanto os grupos de gânglios linfáticos conhecidos como Placas de Preyer se encontram ao longo de todo o íleo (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009). Por fim, a **muscularis mucosae** consiste em músculo liso (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

A **SUBMUCOSA** do duodeno contém glândulas duodenais designadas Glândulas de Brunner responsáveis pela secreção de um muco alcalino que auxilia a neutralização do ácido gástrico no quimo. Por vezes, o tecido linfático da lamina própria estende-se através da muscularis mucosae até chegar à submucosa (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

A **MUSCULARIS** do intestino delgado consiste em duas camadas de músculo liso. A camada exterior, fina, contém fibras longitudinais enquanto a camada interna, espessa, apresenta fibras circulares. Excetuando o duodeno, a **SEROSA** rodeia completamente o restante intestino delgado (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

Embora a parede do intestino delgado apresente o mesmo arranjo básico de quatro camadas que o restante TGI, existem estruturas especiais que facilitam os processos de digestão e absorção: pregas circulares, vilosidades e microvilosidades (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

As **pregas circulares** são dobras da mucosa e submucosa que apresentam cerca de 10mm de comprimento. Iniciam-se na extremidade proximal do duodeno e terminam na porção média do íleo, tendo como função o aumento da absorção devido ao aumento da área de superfície. Estas estruturas permitem que as substâncias presentes no lúmen intestinal atravessem o intestino delgado em movimentos circulares e não apenas numa simples linha reta (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

As **vilosidades** são projeções, do tipo digitiforme, da mucosa e apresentam 0,5-1,0mm de comprimento. Existem em vasto número, cerca de 20-40/mm², promovendo o aumento da área de superfície. Cada vilosidade é revestida por epitélio e um núcleo de lamina propria e a envolver o tecido conetivo da lamina propria encontra-se uma arteríola, uma vénula, uma rede de capilares sanguíneos e, ainda, um capilar linfático designado lactífero (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

Por fim, as **microvilosidades** são projeções da membrana apical das células absorptivas. Cada microvilosidade apresenta 1 μ m de comprimento e encontra-se revestida por uma membrana que possui grupos de 20-30 filamentos de atina. Existem cerca de 200 milhões de microvilosidades/mm², aumentando grandemente a área de superfície do intestino. No seu conjunto formam uma linha designada “bordadura em escova”. Na “bordadura em escova” existem enzimas com funções digestivas (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

1.3 Intestino Grosso

O intestino grosso é a porção final do trato gastrointestinal sendo responsável pela finalização da absorção de nutrientes, água, vitaminas ou iões, produção de algumas vitaminas B e K, condução dos conteúdos do cólon para o reto devido a movimentos peristálticos, conversão de proteínas em aminoácidos por ação da flora bacteriana, bem como a hidrólise dos aminoácidos e formação de fezes e a eliminação das mesmas (defecação) (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

1.3.1 Anatomia do Intestino Grosso

O intestino grosso apresenta cerca de 1,5m de comprimento e 6,5cm de diâmetro, estendendo-se desde o íleo até ao ânus. Encontra-se ligado à parede abdominal posterior e estruturalmente está dividido em quatro regiões: ceco, cólon, reto e canal anal (figura 4). Por sua vez, o cólon encontra-se dividido em diferentes porções, ascendente, transverso, descendente e sigmóide (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009; Young B., Heath J.W., 2000).

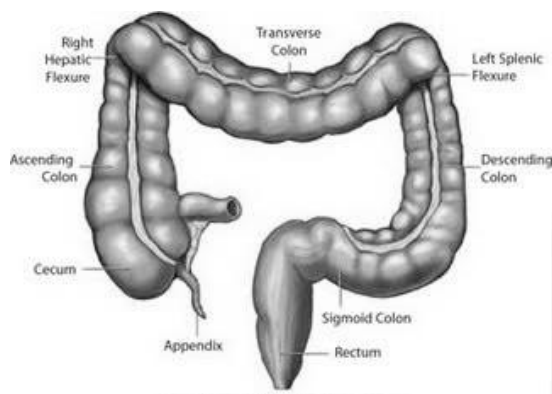


Figura 4. Vista Anterior do Intestino Grosso. Adaptado de <http://nutrientesbiologia.blogspot.pt>.

1.3.2 Histologia de Intestino Grosso

A parede do intestino grosso é constituída pelas quatro camadas típicas do restante TGI: MUCOSA, SUBMUCOSA, MUSCULARIS E SEROSA (figura 5).

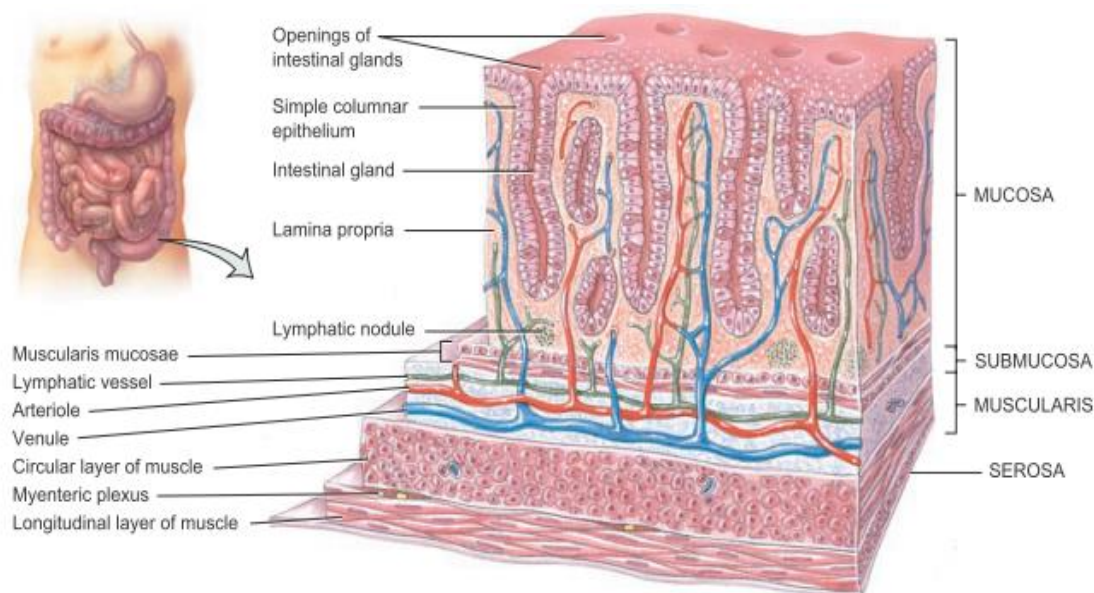


Figura 5. Histologia do Intestino Grosso. Adaptado de Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009.

A **MUCOSA** é constituída por um **epitélio** colunar simples, **lamina propria** e **muscularis mucosae**, sendo o epitélio composto em grande parte por células absorptivas e células caliciformes, cujo número aumenta na porção terminal do intestino grosso (Gonçalves, C. e Bairos, V., Histologia, IU, 2009). As células absorptivas têm um papel importante na absorção de água enquanto a função das células caliciformes passa pela secreção de muco que lubrifica e facilita a passagem dos conteúdos presentes no cólon. Ambos os tipos celulares revestem as criptas de Lieberkühn (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009) que existem em maior quantidade que no intestino delgado (Gonçalves, C. e Bairos, V., Histologia, IU, 2009). A mucosa do intestino grosso caracteriza-se, ainda, pela ausência de células Paneth (Gonçalves, C. e Bairos, V., Histologia, IU, 2009).

Na **lamina propria** podem, por vezes, ser encontrados gânglios linfáticos que atravessam toda a muscularis mucosae dirigindo-se para a submucosa (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

Comparativamente ao intestino delgado, a mucosa do intestino grosso apresenta reduzido número de estruturas especializadas em aumentar a área de superfície do tecido: não existem pregas circulares nem vilosidades; contudo as microvilosidades estão presentes nas células absorptivas. Esta característica explica o fato de a absorção ocorrer principalmente ao nível do intestino delgado (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

A camada **SUBMUCOSA** do intestino grosso é composta por tecido conetivo areolar enquanto a **MUSCULARIS** apresenta uma camada externa de músculo liso longitudinal e uma camada interna de músculo liso circular. Contrariamente às restantes regiões do TGI, as porções de músculo liso longitudinal são espessas formando bandas salientes designadas **tenae coli**. Estas bandas estão localizadas ao longo da parede do intestino grosso e são responsáveis pela aparência foliar e ligeiramente enrugada do colón devido às contrações tónicas que sofrem (Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson, 2009).

1.4 Sistema Olfativo

O olfato é responsável pelo reconhecimento de sinais químicos externos que influenciam o comportamento dos organismos (Brinda C. Prasad *et al.*, 1999), sendo, do ponto de vista evolutivo, um dos sentidos mais antigos (Purves *et al.*, 2005).

A sensibilidade do sistema olfativo permite aos organismos detetar e discriminar entre milhares de moléculas de baixo peso molecular, maioritariamente substâncias orgânicas, que comumente são designadas odores (Stuart Firestein, 2001). O Homem tem a capacidade de reconhecer cerca de dez mil odores diferentes, enquanto a maioria dos mamíferos apresenta uma sensibilidade e um poder de discriminação consideravelmente mais elevados (Brinda C. Prasad, *et al.*, 1999).

O processamento dos sinais químicos presentes no ambiente é essencial para a deteção e perceção da disponibilidade e qualidade de alimentos, parceiros reprodutivos, presas e predadores, estando, também, envolvido em respostas emocionais e cognitivas (L. Dryer e A. Berghard 1999; Brinda C. Prasad, *et al.*, 1999; Purves *et al.*, 2005) bem como, em funções de regulação neuroendócrina (M. Ennis. K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007).

Diferentes estudos revelaram a existência de duas vias de transdução olfativa, tendo sido a transdução olfativa por via aérea, no epitélio olfativo, a primeira a ser estudada. Mais tarde, alguns autores descobriram uma nova via de transdução olfativa que ocorre em meio aquoso, usada pelos animais aquáticos e por alguns órgãos de animais terrestres (Noe e Breer, 1998; Ronnette e Moon, 2002).

1.4.1 Transdução Olfativa por via aérea

1.4.1.1 Epitélio Olfativo - organização e tipos celulares

O epitélio olfativo (EO) é um epitélio colunar pseudoestratificado de cor amarelada que se encontra sobre o teto da cavidade nasal (figura 6-A) (Marieb and Hoehn, 2008).

A maioria dos autores defende a existência de três tipos celulares principais neste tecido: as células de suporte também designadas células de sustentação, os neurónios sensoriais olfativos (OSNs) e as células basais (figura 6-B). Outros autores referem, ainda, outros tipos celulares: as células microvilares (M. Ennis. K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007) e as glândulas de Bowman (Michael T. Shipley, *et al.*, 2008) (figura 6-B).

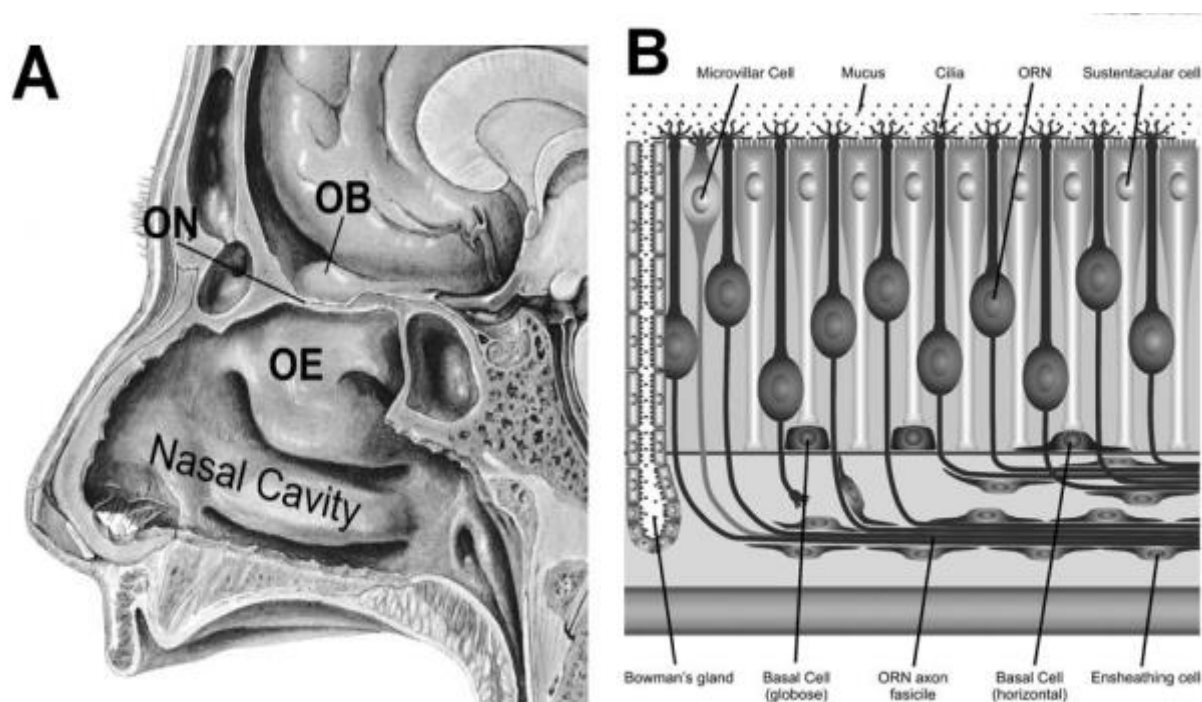


Figura 6. - Epitélio Olfativo e Organização dos neurónios sensoriais olfativos e outros tipos celulares. (A) - Localização do epitélio olfativo na cavidade nasal; ON - Neurónio Olfativo; OB - Bulbo Olfativo OE - Epitélio Olfativo. (B) - Ilustração dos principais tipos celulares no EO.

As células de sustentação, como o próprio nome indica, fazem o suporte e são responsáveis pelo isolamento elétrico dos OSNs. Desempenham, ainda, um papel na secreção de moléculas e enzimas desintoxicantes para o muco nasal, como por exemplo enzimas do tipo citocromo P450 (Hadley e Dahl, 1982; M. Ennis. K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007), que podem estar envolvidas em transformações conformacionais dos odores, de forma a tornar as moléculas odorantes menos permeáveis ou inativando-as para evitar uma transdução de sinal potencialmente perigosa. Assim, as células de suporte desempenham um papel importante no processo de destoxificação (M. Ennis. K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007).

Os OSNs são neurónios bipolares, que projetam uma única dendrite para o lúmen do epitélio olfativo (Michael T. Shipley, *et al.*, 2008), local em que se encontram as moléculas odorantes que são inaladas a partir do ar inspirado e captadas pelos cílios.

Na outra extremidade do OSN, existe um axónio, não ramificado, que se projeta através da lâmina basal e da placa cribiforme, do osso etmóide do nariz, até chegar ao cérebro, em particular até ao bulbo olfativo. A extremidade do axónio forma sinapses com as dendrites das células mitrais que se localizam no interior do glomérulo olfativo (Ronnelt e Moon 2002).

As células basais encontram-se em contato com as células de sustentação e têm como função efetuar o envolvimento dos OSNs, dividindo-se em 2 classes: as células basais globóides e as células basais horizontais. Como o seu nome indica, as células basais globóides apresentam uma forma arredondada, ao passo que as células basais horizontais apresentam uma forma achatada e expressam queratina (Ronnelt e Moon, 2002).

Vários autores defendem que as células basais são células estaminais a partir das quais os OSNs se conseguem diferenciar e regenerar, uma vez que estes neurónios envelhecem e morrem ao longo da vida (Ronnelt e Moon, 2002; M. Ennis. K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007; Menini, 2010). Além disso, quando comparados com outros tipos de neurónios, os OSNs apresentam um tempo de vida curto (nos roedores têm cerca de 40 dias de vida) (M. Ennis. K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007), visto que formam uma barreira entre os meios interno e externo, encontram-se, muitas vezes, em contacto com agentes tóxicos e/ou infecciosos. Com a renovação dos OSNs ao longo de toda a vida, o papel das células basais na geração de novos OSNs é fundamental para manter o sentido do olfato e a transdução olfativa ativos (Ronnelt e Moon, 2002).

As células microvilares possuem na sua superfície luminal, microvilosidades que se encontram em contato direto com o muco presente no epitélio olfativo (M. Ennis. K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007; Michael T. Shipley, *et al.*, 2008).

As glândulas de Bowman são responsáveis pela secreção de um componente seroso do muco que reveste o epitélio olfativo (Michael T. Shipley, *et al.*, 2008).

1.4.1.2 Via de Transdução Olfativa

O sistema olfativo dos vertebrados consegue identificar e distinguir compostos voláteis (odorantes) entre uma enorme diversidade de estruturas moleculares, com elevada sensibilidade. Tal performance é devida aos numerosos recetores olfativos (ORs) que estão expressos nos OSNs e ao seu processamento subsequente.

Os primeiros eventos na deteção de odores ocorrem nos cílios da membrana dos OSNs, que se mantêm em contacto direto com as moléculas odorantes que são inalados a partir do ar inspirado. A deteção olfativa é iniciada quando as moléculas odorantes interagem com os ORs

originando-se um sinal que é, posteriormente, transmitido centralmente (Ronnette e Moon, 2002) (figura 7).

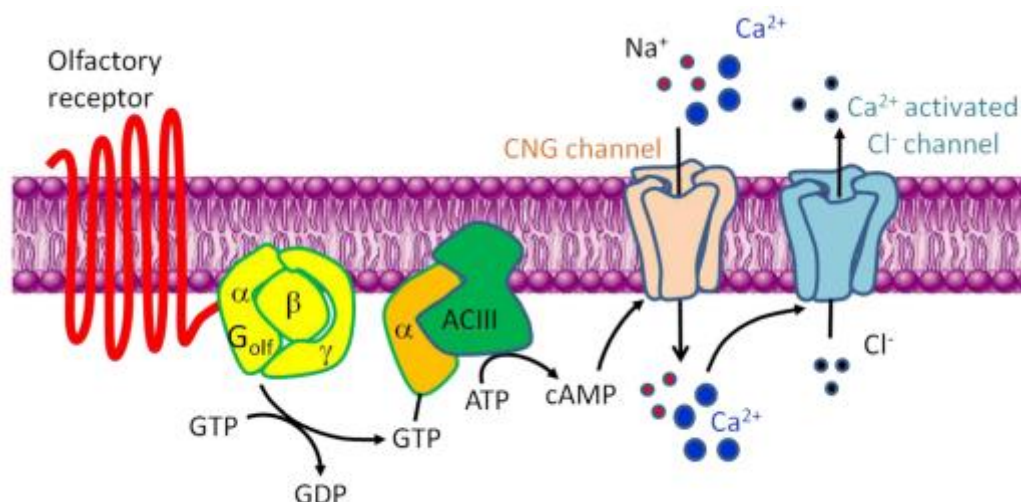


Figura 7. Via Canônica de Transdução Olfativa. Adaptado de NaNa Kang e JaeHyung Koo, 2012.

A ligação do odor ao OR induz a ativação da subunidade α da proteína G específica do olfato, a G_{olf} , à qual o OR se encontra acoplado. Após ativação, esta subunidade proteica liga-se e ativa a adenilato ciclase específica do olfato - adenilato ciclase do tipo 3 (AC3) - que é predominantemente expressa nos OSNs e promove a geração de Adenosina Monofosfato Cíclica (cAMP) a partir de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) (Ronnett e Moon, 2002; M. Ennis, K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007; Joerg Fleischer *et al.*, 2009; DeMaria e Ngai, 2010; Menini, 2010; NaNa Kang e JaeHyung Koo, 2012).

O aumento de cAMP intracelular induz a abertura de canais catiónicos dependentes de nucleotídeos cíclicos - os canais nucleotídicos cíclicos (CNCs) - que se encontram localizados na membrana ciliar, levando à despolarização dos OSNs através do influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) e íons sódio (Na^+) (Ronnett e Moon, 2002; M. Ennis, K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007; DeMaria e Ngai, 2010; Menini, 2010; NaNa Kang e JaeHyung Koo, 2012). Esta despolarização inicial é, posteriormente, amplificada devido à ativação de canais de cloreto, ativados em resposta ao aumento de Ca^{2+} intracelular (M. Ennis, K. A. Hamilton, A. Hayar, 2007; Menini, 2010).

A despolarização é propagada ao longo do OSN, induzindo a abertura de canais iónicos sensíveis à voltagem que estão presentes na membrana do neurónio. O disparo dos potenciais de ação bem como a libertação de neurotransmissores ocorre no terminal sináptico, no glomérulo, no bulbo olfativo (DeMaria e Ngai, 2010).

Alguns autores referem que a via de transdução de sinal olfativa pode ser inativada através de dois mecanismos: por reposição dos níveis basais de cAMP ou através de um processo de

feedback negativo sobre o canal nucleotídico cíclico devido à ação do complexo cálcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM).

No primeiro caso, a ação da fosfodiesterase PDE1C isoladamente ou ligada ao complexo cálcio-calmodulina (PDE1C ou PDE1C/ Ca^{2+} -CaM, respectivamente) sobre o cAMP provoca a inativação da via de transdução olfativa, uma vez que a fosfodiesterase realiza a hidrólise do cAMP impedindo que este se ligue ao CNC (figura 8) (Ronnnett e Moon, 2002).

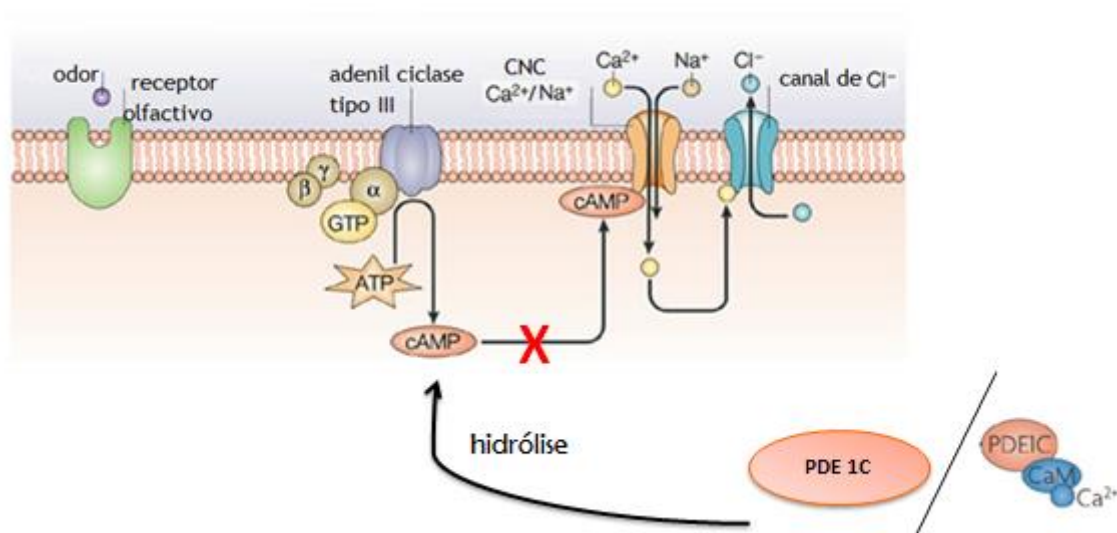


Figura 8. Inativação da Via de Transdução Olfativa por reposição dos níveis basais de cAMP. Adaptado de Ronnett e Moon (2002).

Na segunda situação, o aumento de Ca^{2+} intracelular devido ao seu influxo através do CNC reduz a afinidade do CNC para o cAMP, resultando numa redução da sua probabilidade de abertura, o que reduzirá o influxo de cálcio levando, conseqüentemente, à inativação da via de transdução olfativa. Esta modulação ocorre devido à ligação direta do complexo Ca^{2+} /calmodulina ao CNC (figura 9) (Ronnnett e Moon, 2002).

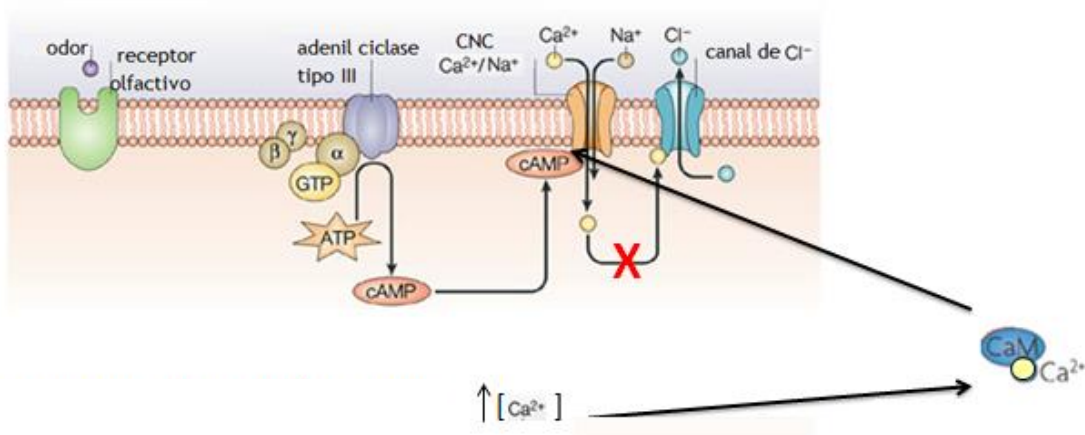


Figura 9. Inativação da Via de Transdução Olfativa por feedback negativo sobre o CNC. Adaptado de Ronnette e Moon (2002).

1.4.1.3 Componentes da Via de Transdução Olfativa

1.4.1.3.1 Recetores Olfativos (ORs)

Alex e Buck (1991) identificaram uma grande variedade de famílias génicas de recetores olfativos, estreitamente relacionados entre si. A capacidade do sistema olfativo conseguir discriminar entre uma elevada variedade de moléculas odorantes está relacionada com o fato de existirem cerca de 1000 genes de ORs, que correspondem a 1% do genoma total dos mamíferos (Pluznick, Zou *et al.*, 2009).

Os ORs estão expressos na membrana ciliar dos OSNs e pertencem à família de recetores acoplados à proteína G (Ronnnett e Moon 2002). Do ponto de vista estrutural, são proteínas hidrofóbicas, que possuem 7 domínios transmembranares e que diferem em apenas algumas sequências de aminoácidos, especialmente nas sequências que formam os domínios III, IV e V, o que sugere que estes domínios são os responsáveis pela discriminação das diferentes moléculas odorantes (DeMaria e Ngai 2010; Menini, 2010).

Os genes responsáveis pela codificação dos ORs são classificados em dois grupos de acordo com a sua sequência de aminoácidos e com a sua distribuição filogenética (Ronnette e Moon, 2002), existindo, assim, duas classes de recetores olfativos: ORs de classe I e ORs de classe II (Ronnette e Moon, 2002; Joerg Fleischer *et al.*, 2009).

Os genes de ORs de classe I foram inicialmente identificados em peixes, sapos e mais tarde em golfinhos - espécie que apenas possui genes de ORs de classe I. Contudo, nos animais semiaquáticos, como os sapos foram identificados genes de ORs classe I e genes de ORs de classe II. Inicialmente pensava-se que os mamíferos não codificavam genes de ORs de classe I, fazendo pensar que os ORs de classe I são especializados em reconhecer moléculas odorantes solúveis em água e que os genes de ORs de classe II, seriam responsáveis pelo reconhecimento dos odores presentes no ar (Ronnette e Moon, 2002; Joerg Fleischer *et al.*, 2009).

Recentemente, no caso dos humanos e em roedores, foi identificada presença de genes de ORs de classe I (Ronnnett e Moon 2002; Itakura S. *et al.*, 2006; Joerg Fleischer *et al.*, 2009; Menini, 2010), sendo que todos genes de ORs de classe I pertencem a uma única família génica, onde apenas metade destes parecem ser funcionais. Por outro lado, os genes de ORs que pertencem à classe II localizam-se em mais do que um cromossoma (Ronnnett e Moon 2002).

1.4.1.3.2 Proteína G específica do olfato (Golf)

A proteína G, também conhecida como proteína de ligação à guanina, desempenha um papel importante na transdução de sinal de várias vias de sinalização celular (Evan H. Hurowitz, *et al.*, 2000; Wackym, *et al.*, 2005). Esta proteína possui três subunidades (α , β e γ), originando

um complexo proteico que se encontra na membrana celular (Evan H. Hurowitz *et al.*, 2000).

A proteína G que pode interagir com diversas moléculas efetoras, como as diferentes adenilato ciclastes e a fosfolipase C, que são responsáveis pela transdução de sinal que origina a produção de cAMP, a mobilização de cálcio intracelular, respetivamente, bem como pela indução de potenciais de membrana. A interação entre a proteína G e as diferentes moléculas efetoras ocorre após a troca da molécula de guanosina difosfato (GDP) ligada à subunidade α da proteína G por guanosina trifosfato (GTP), resultando numa mudança conformacional do complexo (Evan H. Hurowitz, *et al.*, 2000; Menini, 2010).

Como a subunidade α da proteína G interage tanto com o receptor que lhe está acoplado, como com as moléculas efetoras das vias de sinalização, esta subunidade é considerada o constituinte funcional do complexo proteico da proteína G (Wackym, *et al.*, 2005). Por outro lado, as subunidades β e γ formam um heterodímero que se dissocia em condições de desnaturação.

Sabe-se que existem quatro famílias de proteínas G, classificadas de acordo com a homologia de sequências e com o tipo de moléculas efetoras que regulam especificamente (Hurowitz, *et al.*, 2000). São elas: Gas, Gai/o, Gaq e a proteína G α 12 (Wackym, *et al.*, 2005).

A proteína Gas é responsável pela ativação da adenilato ciclase enquanto a proteína Gai/o tem um papel contrário, promovendo a inibição da adenilato ciclase. A proteína Gaq promove a ativação da fosfolipase C (PLC) e a proteína G α 12 é responsável pela ativação da fosfolipase D (Milligan e Kostenis 2006).

A proteína G α olf ou proteína G específica do olfato, trata-se de uma isoforma da subunidade α da proteína G, que se encontra na membrana ciliar dos OSNs (Wackym, *et al.*, 2005) e que partilha 88% da homologia dos aminoácidos com a Gas, sendo considerada um membro da família da Gas (Nathalie Ferrand *et al.*, 1999; Wackym, *et al.*, 2005).

A G α olf está descrita na literatura como apresentando um peso molecular de aproximadamente 45kDa enquanto as subunidades β e γ possuem pesos moleculares de 35kDa e 8-10 kDa, respetivamente (Milligan e Kostenis 2006).

1.4.1.3.3 Adenilato ciclase tipo 3 (AC3)

A adenilato ciclase é uma proteína responsável pela produção de cAMP a partir de ATP. Segundo a literatura, estão descritos 9 tipos de adenilato ciclase transmembranares (AC_{tm}) e um outro tipo de adenilato ciclase presente no citosol e em alguns organelos celulares (sAC - adenilato ciclase do tipo solúvel), em que a sua atividade é regulada através de aniões bicarbonato (Tresguerres *et al.*, 2011).

A adenilato ciclase membranar apresenta 12 domínios transmembranares e ambas as extremidades (C terminal e N terminal) estão viradas para o citoplasma, enquanto o domínio

catalítico da adenilato ciclase se encontra entre os domínios transmembranares 6 e 7; o domínio catalítico é o responsável pela conversão de ATP em cAMP (Menini, 2010).

No EO encontra-se expressa a adenilato ciclase do tipo 3 (adenilato ciclase específica para o olfato), particularmente ao nível dos OSNs, estando descrita na literatura como apresentando um peso molecular de 200kDa (Wei, Zhao *et al.*, 1998).

1.4.1.3.4 Canais Nucleotídicos Cíclicos (CNCs)

Os CNCs medeiam respostas eletrofisiológicas, na via olfativa, devido à ligação de cAMP (O. Matsuzaki, *et al.*, 1999). Desta forma, na membrana ciliar dos OSNs, a informação resultante da interação entre o odor e o OR é transmitida sob a forma de informação química, que ao nível do CNC é convertida num sinal elétrico, por ativação do fluxo iónico que ocorre através da membrana plasmática (Menini, 2010).

O CNC é uma proteína membranar composta por quatro subunidades: duas subunidades CNGA2, uma CNGA4 e uma CNGB1. Cada subunidade apresenta 6 domínios transmembranares (S1-S6) e uma região que forma o poro, entre os domínios S5 e S6.

A ligação de cAMP ao CNC promove o influxo de Ca^{2+} e Na^+ através do canal para o interior do OSN, provocando a sua despolarização, que é, posteriormente, amplificada devido à abertura dos canais de cloreto (Purves *et al.*, 2005; DeMaria e Ngai 2010).

Para além do papel eletrofisiológico na via olfativa, os CNCs podem desempenhar diversas funções, nomeadamente no desenvolvimento. Por exemplo, num invertebrado, *C. elegans*, uma mutação no gene *tax-2* (gene que codifica para o CNC) causa anomalias no crescimento axonal numa subclasse de neurónios sensoriais (O. Matsuzaki, *et al.*, 1999).

1.4.2 Transdução Olfativa em meio aquoso

Embora diversos estudos apoiem o papel central do cAMP na deteção odorante, vários investigadores têm fornecido evidências que demonstram a existência de outras vias de sinalização ativadas em resposta à estimulação por odores.

Huque e Bruch (1986) identificaram a atividade da PLC na membrana ciliar olfativa de peixes-gato, enquanto Breer e seus colaboradores (1998) demonstraram o aumento dos níveis de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) em resposta a algumas moléculas odorantes (Ronnette e Moon, 2002). Desta forma, nos peixes, a interação entre a molécula odorante e o OR ativa uma via não canónica da transdução olfativa, que envolve a ativação da fosfolipase C, com consequente formação de IP_3 (figura 10) (Ronnette e Moon, 2002).

A função da fosfolipase C é hidrolisar o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), um fosfolípido que se encontra na membrana plasmática, gerando-se diacilglicerol (DAG) que permanece na

membrana e IP_3 , que é libertado para o citoplasma. As moléculas de IP_3 que se formam desempenham um papel fundamental na libertação de cálcio armazenado, a partir do retículo endoplasmático, devido à ligação do IP_3 aos seus recetores presentes na membrana do retículo (Ronnette e Moon, 2002). O cálcio libertado para o citoplasma age sobre os canais de cloreto gerando-se uma despolarização da membrana do OSN.

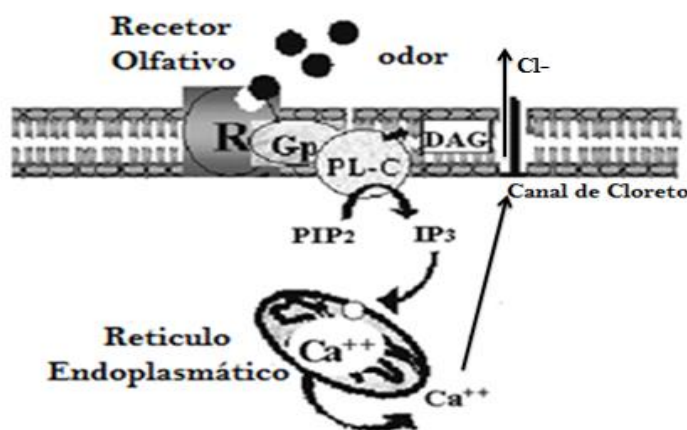


Figura 10. Via Não Canónica de Transdução Olfativa. Adaptado de Ronnette e Moon, 2002.

1.4.2.1 Transdução Olfativa em outros Sistemas (meio aquoso)

Sabe-se que os recetores olfativos não estão envolvidos apenas em funções quimiosensoriais no epitélio olfativo, encontrando-se, também, expressos em vários tecidos como o rim, a placenta, o coração em desenvolvimento, os pulmões, o baço, a língua, o encéfalo, os espermatozoides (Nathalie Ferrand *et al.*, 1999; Vosshall, 2004; Itakura S. *et al.*, 2006; Pluznick, Zou *et al.*, 2009; NaNa Kang e JaeHyung Koo, 2012), o pâncreas e o fígado (NaNa Kang e JaeHyung Koo, 2012).

1.4.2.2.1 Placenta

A placenta é o primeiro órgão dos mamíferos a ser formado durante a embriogénese, originando uma espécie de barreira entre o ambiente fetal e o ambiente materno. É responsável por efetuar trocas de gases, nutrientes e desperdícios resultantes do metabolismo (Itakura S. *et al.*, 2006).

Todas estas moléculas podem agir sobre os recetores olfativos e o fato de haver uma expressão generalizada dos membros da família dos ORs em vários órgãos sugere que os ORs desempenhem outras funções quimiosensoriais para além de fazerem o reconhecimento de odores (Itakura S. *et al.*, 2006).

Além disso, sabe-se que os ORs podem interagir, através dos seus domínios extracelulares com ligandos existentes nas células alvo, atuando como mediadores de reconhecimento celular, fulcral para a organogênese durante o desenvolvimento do embrião (Itakura S. *et al.*, 2006).

Itakura S. *et al.*, (2006) efetuaram um estudo de forma a identificar a expressão do ORs e da proteína Golf na placenta de rato. Por RT-PCR foram identificados genes de 11 ORs diferentes, sendo que todos eles são membros da classe II, no cDNA de placenta de rato. Por Western Blotting, foi, também, demonstrada a expressão da Golf na placenta. Adicionalmente, foi descoberto que a imunorreatividade da Golf está exclusivamente localizada nas células gigantes dos trofoblastos e nos espongiotrofoblastos.

Por outro lado vários estudos têm sugerido que moléculas de adesão celular como, por exemplo, as integrinas e as caderinas, que se apresentam expressas no trofoblasto possuem um papel importante para evitar a invasão do embrião sobre as células maternas da decídua. Desta forma, pensa-se que os ORs localizados nas células gigantes do trofoblasto podem reconhecer sinais emitidos pelas células da decídua, de forma a parar a invasão das células do trofoblasto. Por outro lado, os ORs podem funcionar como recetores da superfície celular, permitindo que várias moléculas de pequeno peso molecular atravessem a placenta (Itakura, Ohno *et al.*, 2006).

Recentemente foi demonstrado que a placenta não funciona apenas como um elemento que permite as trocas entre o feto e a mãe, mas sim, como um órgão que produz várias hormonas, como a Hormona do Crescimento (GH) e fatores de crescimento, como o fator de crescimento tipo-insulina (IGF), bem como os seus recetores. Estas hormonas e fatores de crescimento são também produzidos pelo trofoblasto (Itakura, Ohno *et al.*, 2006).

Desta forma, os ORs expressos no trofoblasto podem agir como sensores, reconhecendo pequenas moléculas na placenta como sinais ambientais originados no feto ou na mãe de forma a efetuar a regulação da síntese destas hormonas e dos fatores de crescimento, de acordo com as necessidades fisiológicas de cada momento (Itakura, Ohno *et al.*, 2006).

1.4.2.2.2 Rim

O rim é um órgão cuja função passa pela monitorização da composição química do fluido tubular (Pluznick *et al.*, 2008). A maquinaria de transdução olfativa já foi identificada em vários tecidos que não o epitélio olfativo e visto que o rim funciona como um sensor dos conteúdos que atravessam os diferentes segmentos dos nefrónios, Pluznick *et al.* (2008), decidiram efetuar o estudo da via olfativa neste órgão, colocando a hipótese de que a monitorização realizada pelo rim pudesse estar relacionada com a via olfativa.

Pluznick *et al.* (2008), identificaram que as proteínas AC3 e Golf apresentam expressão no rim a nível de proteína e ao nível do RNA, e que estas duas proteínas se encontram em segmentos comuns dos nefrónios (no túbulo distal, na primeira porção do túbulo coletor e nas

células da mácula densa). Adicionalmente, a AC3 revelou uma distribuição citoplasmática e ao longo da membrana apical de epitélio dos túbulos renais. Estes investigadores provaram, ainda, a presença de ORs (Olf78, Olf90, Olf1373, Olf1392, Olf1393 e Olf NP_TR6JSE50FPA) pela técnica de RT-PCR e por PCR Convencional de uma linha celular da mácula densa (Pluznick, Zou *et al.*, 2008).

Após demonstrarem a presença das proteínas que compõem a maquinaria de transdução olfativa no rim, estes autores efetuaram estudos funcionais em que verificaram que ratos *knockout* numa das proteínas chave da transdução dos sinais olfativos, a AC3, são incapazes de regular corretamente a taxa de filtração glomerular e bem como os níveis plasmáticos de renina (Pluznick, Zou *et al.*, 2008).

Assim, a maquinaria de transdução olfativa que se encontra expressa no nefrónio distal e na mácula densa pode desempenhar um papel fisiológico crucial na função renal.

Por exemplo, pode ser benéfico para o rim ter a capacidade de conseguir ajustar as taxas de filtração, reabsorção e secreção em resposta a mudanças dos níveis metabólicos, bem como, em resposta a níveis elevados de xenobióticos, induzindo a remoção destas substâncias perigosas e, também, de ácidos dicarboxílicos de forma a evitar o aparecimento de pedras nos rins. Desta forma, não é de estranhar que o rim possua sensores químicos como os recetores olfativos de forma a regular a excreção destas substâncias (Pluznick *et al.*, 2008).

1.4.2.2.3 Espermatozóides

Os espermatozóides, gâmetas sexuais masculinos, são produzidos nos testículos, sendo constituídos por uma cabeça, segmento intermédio e cauda que confere as estas células a capacidade de se movimentarem em direção ao oócito que pretendem fecundar.

Um fenómeno crucial no processo de fertilização é a quimiotaxia (movimento das células em direção a substâncias químicas libertadas para o ambiente), embora a base molecular deste processo ainda não esteja completamente elucidado. Por outro lado, a expressão de ORs é desde à vários anos conhecida nos espermatozóides e várias investigações têm sido efetuadas de forma a tentar relacionar a olfação com a reprodução (Spher *et al.*, 2003).

Em espécies cuja fertilização é externa, como acontece nos peixes e nos ouriços-do-mar, é crucial que os espermatozóides se movimentem em direção ao oócito, para que a fertilização possa ocorrer com êxito. Desta forma, deve existir uma sinalização que indique aos espermatozóides a correta direção que estes devem tomar até chegarem ao oócito. Além disso, o próprio oócito secreta ligandos específicos, que podem ser detetados pelos ORs presentes nos espermatozóides. No caso das espécies onde a fertilização é interna, como nos mamíferos, o fenómeno de quimiotaxia entre o oócito e o espermatozóide é menos evidente, mas acontece (Vosshall 2004).

Assim, em 2003 Spehr *et al.*, efetuou um estudo sobre o papel desempenhado pelo recetor olfativo hOR17-4 na quimiotaxia entre do espermatozóide e o oócito.

Para procederem a este estudo, realizaram a clonagem do recetor olfativo hORr17-4 em sistemas heterólogos e foram examinadas as suas “preferências” para dois ligandos: bourgoneal - ligando com odor floral (fragância dos lírios) e undecanal. Após os testes efetuados foi demonstrado que este OR responde fortemente a odores florais como o bourgoneal e que fica inativo na presença de undecanal (Spher *et al.*, 2003).

Um ano mais tarde, em 2004 Vosshall, comprovou através de um estudo em espermatozoides humanos que o recetor olfativo hOR17-4 se ativa em resposta ao bourgoneal e se inativa na presença de undecanal. Adicionalmente, foi comprovada a quimiotaxia em direção ao bourgoneal.

Vosshall (2004) comprovou ainda a expressão de hOR17-4 no epitélio olfativo e testes funcionais mostram que é capaz de desencadear as mesmas respostas no nariz e no espermatozóide.

Contudo, ainda, não foi provado que este OR medeia por si só as respostas olfativas no espermatozóide mas os resultados obtidos, até agora, têm extrema importância no sentido de esclarecer o papel quimiossensorial da via olfativa em tecidos que não o EO (Vosshall 2004).

1.4.2.2.4 Coração em Desenvolvimento

A ativação do recetor B-adrenérgico envolve a proteína heterotrimérica Gs e diversas isoformas da adenilciclase. Recentemente, a G α olf foi detetada nos grânulos secretados pelos cardiomiócitos endócrinos, surgindo a hipótese de que esta proteína pode desempenhar um papel fundamental na exocitose de hormonas cardíacas.

A G α olf que partilha 88% de homologia com a proteína Gas, bem como a adenilciclase do tipo 3, foram inicialmente identificadas no epitélio olfativo, Mais tarde, estas duas proteínas foram identificadas em tecidos não olfativos. No entanto, a G α olf ainda não foi encontrada no miocárdio, mas é sabido que o recetor olfativo OL1 se encontra expresso em estágios iniciais no desenvolvimento do coração de rato (Nathalie Ferrand *et al.*, 1999).

Desta forma, Nathalie Ferrand *et al.* (1999), estudaram a presença das moléculas da via de sinalização olfativa no coração de rato. A expressão da G α olf foi analisada em coração de rato desde antes do nascimento até ao momento do desmame do animal. O mRNA de G α olf foi detetado no coração de rato, em níveis mais elevados, desde o 21º dia de gestação até 3 dias após o parto. Adicionalmente, estudos imunohistoquímicos mostraram a presença da G α olf em cardiomiócitos atriais e ventriculares.

Os autores verificaram, também, que os mRNAs de OL1 e da latrofilina, recetores olfativos acoplados a proteínas G, estão expressos em estágios iniciais pós-natais. Por outro lado, o

mRNA da AC3 encontra-se expresso antes do nascimento e até ao momento do desmame dos animais.

Dado que a proteína Golf partilha 88% de homologia com a proteína Gas pode encontrar-se aqui um potencial interesse para esta proteína numa via de sinalização envolvendo a estimulação β -adrenérgica do miocárdio de rato.

1.4.2.2.5 Língua

Vários ORs foram identificados na língua humana através de RT-PCR (OR6Q1, OR10A4/JCG5, HTPCR06/OR2K2, JCG3/OR5P2 e JCG6/OR10A5) (NaNa Kang e Jaehyung Koo, 2012).

1.4.2.2.6 Baço e Pâncreas

Através de RT-PCR foi demonstrada a expressão do recetor olfativo OL2 no baço de rato e na linha celular secretora de insulina de ratinho MIN6. Embora os ligandos para este recetor ainda não tenham sido investigados, existe a possibilidade de estes controlarem a secreção de insulina no pâncreas (NaNa Kang e Jaehyung Koo, 2012).

1.4.2.2.7 Cérebro

Três recetores olfativos, M71, C6, e OR3 foram detetados no córtex cerebral, estando M71 e C6 expressos na Camada II de Neurônios Piramidais Corticais, no pólo occipital, durante o desenvolvimento pós-natal do ratinho (NaNa Kang e Jaehyung Koo, 2012).

Adicionalmente foi demonstrado que o recetor da molécula odorante MOL2.3 se encontra expresso nos gânglios do sistema nervoso autónomo (NaNa Kang e Jaehyung Koo, 2012).

1.4.2.2.8 Intestino

A libertação de serotonina pelas células enterocromafins (EC) do intestino é acionada por substâncias presentes no lúmen intestinal, sendo este o evento chave para a regulação dos processos de motilidade e secreção que ocorrem neste tecido (Thomas Braun, *et al.*, 2007). Estes autores investigaram a expressão de recetores olfativos expressos nas EC e quais os ligandos e moléculas odorantes que podem causar a secreção de serotonina, utilizando linhas celulares de EC humanas.

Foram identificados quatro recetores olfativos com expressão nas EC (OR73, hOR17-7/11, OR1G1, hOR17-210) que poderão estimular a libertação de serotonina.

A serotonina controla a motilidade e processos de secreção que decorrem no intestino, estando implicada, também, em condições patológicas como vómitos, diarreia e síndrome do

“intestino inflamado”. Desta forma, os ORs são potenciais alvos para o tratamento de doenças gastrointestinais e de desordens de motilidade (Thomas Braun, *et al.*, 2007).

1.4.3 Funções dos Recetores Olfativos nos Tecidos Olfativos

Os ORs cumprem um papel crucial na deteção das moléculas odorantes que são inaladas a partir do ar inspirado.

É sabido que alterações na estrutura do ligando podem ativar subconjuntos distintos de ORs e, conseqüentemente induzir diferentes perceções do cheiro. Contudo são necessários mais testes funcionais para se perceber como é que este grupo de recetores tem a capacidade de discriminar entre uma enorme variedade de químicos ambientais (DeMaria e Ngai 2010).

Para além das capacidades de deteção e de discriminação de odores, os ORs desempenham uma importante função fazendo o direcionamento dos axónios dos OSNs para o seu correto glomérulo olfativo, no bulbo olfativo (Itakura, Ohno *et al.*, 2006; DeMaria e Ngai 2010).

2. OBJETIVO

Sabe-se que os constituintes proteicos da via olfativa já foram encontrados em diversos tecidos, que não o epitélio olfativo, como a placenta, o coração em desenvolvimento, o rim, os pulmões, a língua (Nathalie Ferrand *et al.*, 1999; Itakura S. *et al.*, 2006; Pluznick, Zou *et al.*, 2009; NaNa Kang e JaeHyung Koo, 2012), entre outros. Contudo e apesar de ser conhecido o papel quimiossensorial dos ORs fora do EO, a importância destes dados ainda não está completamente elucidada.

Desta forma, o presente trabalho tem como principal finalidade analisar a expressão das proteínas que constituem a via da transdução de sinal olfativa no trato gastrointestinal, particularmente no intestino de rato. Assim, pretendeu-se saber se as vias de sinalização dos ORs são usadas pelas células intestinais para responder a alterações na composição dos conteúdos do lúmen do trato gastrointestinal. Neste projeto analisou-se a expressão de alguns componentes da via de transdução olfativa: AC3, Golf e os recetores olfativos OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496, em diferentes regiões do trato gastrointestinal.

A análise da expressão foi realizada, ao nível de mRNA, por RT-PCR, utilizando EO e duodeno de rato. Ao nível proteico, a análise da expressão foi efetuada por Western Blotting (WB) em extratos de proteína total de duodeno, jejuno e íleo de rato e por Imunohistoquímica (IMQ ou IHC) em cortes histológicos de duodeno, jejuno, íleo e colón de rato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Recolha de Tecidos

Neste trabalho foram utilizados ratos adultos *Wistar Han*, machos e fêmeas, cujos pesos variavam entre 200 e 300 gramas. Estes animais foram mantidos à temperatura ambiente com ciclos de luz/escuridão de 12 horas, com alimentação e água disponíveis *ad libitum*.

A sua manipulação foi executada segundo as normas recomendadas pela União Europeia (Diretiva/63/EU/2010). Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (2:1), 100 μ L/100g do peso do animal e, seguidamente, foram sacrificados por decapitação, tendo-se feito a colheita de EO e das diversas regiões de intestino.

O epitélio olfativo foi recolhido através do palato do animal, fazendo-se uma incisão entre a primeira e a segunda crista do palato, como ilustrado na figura 11. Para a recolha do intestino, foi efetuada uma incisão ao longo de toda a cavidade abdominal.

Após a recolha, os tecidos foram fixados numa solução de paraformaldeído (PFA) a uma concentração de 4% (Panreac), para posterior preparação de lâminas com cortes histológicos e/ou congelados em azoto líquido e conservados a -80°C para posterior extração de proteína total e de RNA total.

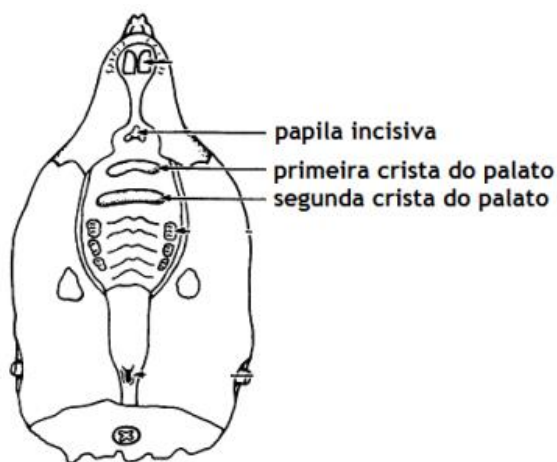


Figura 11. Ilustração do local de incisão para efetuar a extração de epitélio olfativo. Adaptado de Uraih e Maronpot, 1990.

3.2 Extração de RNA total de EO e de Intestino de Rato

A extração de RNA é essencial para execução de diversas análises de expressão gênica, tais como o PCR em tempo real, “microarrays”, construção de bibliotecas de cDNA, entre outras. Para a obtenção de bons resultados, é vital que as amostras de RNA estejam puras e na sua forma mais íntegra possível, pois as moléculas fragmentadas originam dados de baixa qualidade e pouco confiáveis, em especial em técnicas quantitativas.

Uma das maiores preocupações durante o procedimento de extração de RNA é a sua degradação por ação das RNases - enzimas extremamente resistentes a diversos tratamentos, incluindo os tratamentos térmicos. Por outro lado, a molécula de RNA é extremamente lábil e por esta razão as manipulações para extração de RNA são efetuadas a 4°C, para que a molécula de RNA se mantenha estável.

O procedimento de extração de RNA total inicia-se com a adição de Trizol ou reagente TRI (Sigma-Aldrich, Inc), que consiste numa solução monofásica de fenol e de isotiocianato de guanidina e cuja função é efetuar a lise celular de forma a libertar para a solução o RNA sem que a sua integridade seja comprometida.

Contudo, e tendo em conta as características do EO e do Intestino foram realizados alguns passos prévios à lise celular. Assim, antes de efetuar a lise celular de intestino e imediatamente após a recolha do tecido, as diferentes porções do intestino foram colocadas em solução RNAlater (Ambion) de forma a prevenir a degradação das moléculas de RNA. Ao fim de 12 horas de incubação a 4°C, os diferentes tecidos foram retirados da solução estabilizadora de RNA, congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C até à sua utilização. No caso do EO, por este possuir um epitélio com camada mucosa e uma matriz extracelular extensa, este tecido sofreu, após congelamento em azoto líquido, uma trituração mecânica com um pilão e almofariz; finalizada a trituração mecânica, o tecido foi recolhido para um novo microtubo de 1,5 mL.

Após os passos prévios que os tecidos sofreram, foi efetuada a adição de Reagente TRI, seguida de uma homogeneização com a ajuda de um minipilão, uma incubação à temperatura ambiente de 5 minutos e uma centrifugação a 12000g durante 10 minutos a 4°C (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen). O volume de Reagente TRI a utilizar é calculado em função da massa de tecido ou número de células que se pretende manipular.

De seguida, foi efetuada uma adição de clorofórmio (Merck) que permite, após uma centrifugação a 14000g durante 15 minutos a 4°C, remover de resíduos de fenol, bem como efetuar a separação da solução em três fases: a fase orgânica, de cor rosa, que contém as proteínas desnaturadas, a interfase e a fase aquosa, transparente, onde se encontra o RNA.

A fase aquosa foi recolhida para novos microtubos de 1,5mL e adicionou-se isopropanol (Fisher) que possibilita a precipitação do RNA após uma incubação de 10 minutos à

temperatura ambiente, para que este possa ser recuperado. Este método permite, ainda, que após remoção da fase aquosa, se recupere DNA e proteínas por precipitação sequencial.

Os volumes de clorofórmio e de isopropanol a adicionar são calculados em função da quantidade de reagente TRI utilizado em cada tecido.

De seguida foi efetuada uma centrifugação a 14000g durante 10 minutos a 4°C. No final, removeu-se o sobrenadante e efetuaram-se lavagens do RNA em etanol frio 75% em água DEPC (dietilpirocarbonato - é um agente alquilante e, também, inibidor de RNAases).

Após as lavagens, o sedimento de RNA foi deixado secar ao ar e sua reidratação foi realizada utilizando água DEPC, seguida de uma incubação a 50°C durante 2 minutos (SBH130D, Stuart), para ajudar à solubilização do sedimento.

Após o procedimento de extração, analisou-se a integridade do RNA através de uma eletroforese em gel de agarose a 1%, em que um RNA íntegro deve apresentar duas bandas distintas, banda 28S e banda 18S, sendo que a primeira deve ter aproximadamente o dobro da intensidade da segunda banda.

A quantificação do RNA total foi efetuada num espectrofotómetro (NanoPhotometer™, Implen), onde foi medida a absorvância a 260nm. O rácio ideal das absorvâncias 260nm/280nm, para a amostra de RNA, deve encontrar-se entre 1,8 e 2,1. Rácios inferiores a 1,8 poderão ser indicadores de contaminação da amostra de RNA com proteínas e/ou fenol.

3.3 Síntese de cDNA (RT-PCR) a partir de RNA extraído de EO e de Intestino de Rato

A síntese de cDNA consiste numa reação enzimática que possibilita a obtenção de uma cadeia dupla de DNA, a partir de RNA total de um determinado tecido, que é complementar à sequência de RNA em causa.

Antes de se proceder à síntese de cDNA, o RNA extraído de Intestino e de EO foram sujeitos a um pré-tratamento com a enzima DNase I (AMPD1, Sigma-Aldrich, Inc) de forma a degradar qualquer molécula de DNA genómico, contaminante, que pudesse estar presente nas amostras.

Para tal foram efetuados duplicados de cada amostra em estudo (intestino e EO): um microtubo com e outro sem transcriptase reversa para controlo de contaminação de DNA genómico. Adicionou-se a cada microtubo o volume equivalente a 1mg RNA, 1µL de Reaction Buffer 10X, 1µL DNase I (1U/µL) e água DEPC até perfazer um volume final de 10µL.

De seguida, agitou-se gentilmente a solução sem vortexar pois a enzima DNase I é extremamente sensível. Assim, a agitação foi realizada por sucessivas pipetagens, seguidas de

uma centrifugação e os microtubos foram colocados no termociclador (T Professional Basic Gradient, Biometra) durante 15 minutos, a 25°C, e em seguida no gelo.

Adicionou-se 1µL de Stop Solution (EDTA 25mM) cuja função é quelatar os íons cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) e assim inativar a enzima DNase I. De seguida, os microtubos foram colocados no termociclador e aquecidos a 70°C durante 10 minutos, de forma a desnaturar a DNase I e o RNA e colocados em gelo.

A síntese de cDNA é alcançada pela utilização da enzima transcriptase reversa, que a partir de um oligonucleotídeo iniciador, é capaz de sintetizar uma cadeia de DNA tendo por base a molécula de RNA, originando-se no final da reação uma molécula em cadeia dupla que pode, posteriormente, ser amplificada através de PCR convencional.

Desta forma, para a síntese de cDNA foram preparadas duas misturas - Mix1 e Mix2 - cujo volume é referente ao número de amostras usadas mais uma (n+1).

A Mix1 era constituída por “random primers” (0,09 unidades/µL, a uma OD de 260, em 3mM Tris-HCl, pH=7 e 0,2mM EDTA, Invitrogen) e por desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's) (a uma concentração final de 10mM, nzyTech). A Mix2 consistia em tampão First Strand 5x (50mM Tris-HCl, 75mM KCl e 3mM MgCl_2 (Finnzymes) e em DTT (a concentração final de 0,008mM).

O procedimento de síntese de cDNA inicia-se com a desnaturação da molécula de RNA, a 65°C, seguindo-se a hibridação dos iniciadores (hexonucleotídeos de sequência aleatória designados “random primers”) ao RNA, a 37°C, terminando com a polimerização a 70°C.

Assim, após o tratamento das amostras de RNA com a enzima DNase I, foram adicionados a cada amostra, 4µL da Mix1 e os microtubos foram colocados no termociclador durante 5 minutos a 65°C e em seguida no gelo.

Seguidamente, adicionaram-se 6µL da Mix2 e incubaram-se os microtubos durante 2 minutos a 37°C. Finalmente adicionou-se, aos microtubos devidos, 1µL de enzima M-MLV RT (200U/µL, Invitrogen) e colocaram-se os microtubos durante 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C e, por fim, 15 minutos a 70°C.

3.4 Amplificação enzimática de DNA (PCR Convencional)

Para estudar a expressão dos genes ACIII e Gaolf no EO e no Intestino de rato, ao nível do RNA, foi utilizada a técnica de PCR Convencional, com “primers” específicos cujas sequências se encontram representadas na tabela 1. Como controlo positivo da reação de PCR foi utilizado cDNA de EO de rato, tecido onde é sabido que os genes em estudo são expressos.

Tabela 1. Sequências dos primers AC3 e Gaolf utilizados nas reações PCR

Designação	Primer	Sequência do Primer
AC3	“FW”	CTGGCAGTATGATGTATGG
	“RV”	AGGCAATGATGAGGTAGG
Gaolf	“FW”	GAAGCAGTTGCAGAAAGAGC
	“RV”	TGGGAATATTCAAAGTCAGT

As reações de PCR foram efetuadas com 1,5µL de cDNA sintetizado a partir de Intestino ou de EO de rato. Num volume total de 25µL juntou-se: 2,5µL de tampão da Taq 10X (nzyTech), 1µL de dNTPs (a uma concentração final de 10mM, nzyTech), 1,5µL de MgCl₂ a 3mM (nzyTech), 0,4pmol de cada “primer” (FW e RV) da AC3 e Gaolf (tabela 1) e 0,4U Taq DNA polimerase (nzyTech); perpez-se o volume final com água estéril.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador com o seguinte programa: 5 minutos a 95°C seguindo-se 40 ciclos, de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a um gradiente de temperatura e 1 minuto a 72°C. Por fim, foi, ainda, realizado um passo de extensão final da reação durante 5 minutos a 72°C.

Para estudar a expressão dos genes que codificam ORs presentes no intestino de rato, ao nível do RNA, foi utilizada a técnica de PCR Convencional, utilizando “primers” degenerados (Thomas Braun, *et al.*, 2007) cujas seqüências se encontram representadas na tabela 2.

Tabela 2. Sequências de primers *consensus* conOR e tamanho do fragmento obtido nas reações de PCR.

Designação	Primer	Sequência do Primer	Tamanho
conOR	“FW”	TGG C5T A(CT)G A(CT)(AC) G5T (AT)(CT)G T5G C	525pb
	“RV”	(AG)AA 5GG (AG)TT (AGCT)AG CAT (AGCT)GG	

Após a otimização das condições de reação de PCR, foi eleita uma temperatura de hibridação de 55°C e uma concentração final de 3mM de MgCl₂. O resultado das reações de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.5 Purificação de Produtos de PCR para Clonagem em pGEM-T

Para purificar os fragmentos amplificados por PCR utiliza-se um kit comercial.

O kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) baseia-se na capacidade que o DNA possui para ligar-se a membranas de sílica, na presença de sais caotrópicos. Após eletroforese para separar os fragmentos de DNA, a banda(s) de interesse é excisada e dissolvida na presença de isotiocianato de guanidina (*Membrane Binding Solution*).

Alternativamente, após a amplificação, o produto PCR é adicionado à *Membrane Binding Solution* e diretamente purificado.

Depois de lavar o fragmento de DNA isolado ou um produto de PCR, o DNA é eluído em água.

3.5.1 A partir de produtos de PCR conOR de Intestino de rato

Após otimização das condições de PCR com os primers degenerados, os produtos de PCR foram purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega, de forma a serem processados para futuros procedimentos de clonagem e sequenciação.

De seguida, foi efetuada uma eletroforese em gel de agarose 1% para a verificação da presença do produto purificado.

3.6 Clonagem dos produtos de PCR em pGEM-T Easy

O vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA) é um sistema conveniente para a clonagem de produtos de PCR. O vetor é preparado, pelo fabricante, por digestão do vetor pGEM-T Easy com *EcoR V*, e a adição de timidina em ambas as regiões terminais 3'. Esta saliência nas extremidades terminais 3' com timidina melhora em muito a eficiência da ligação dos produtos de PCR aos plasmídeos, pois as extremidades salientes impedem o plasmídeo de recircularizar e ao mesmo tempo fornecem extremidades compatíveis com os produtos de PCR, que possuem uma extensão adenosil (As) na extremidade 3' gerada pela Taq DNA polimerase (Mezei e Storts, 1994).

O vetor pGEM-T Easy contém os promotores T7 e SP6 que flanqueiam a região de múltipla clonagem que codifica a enzima β -galactosidase. A inativação do gene codificante desta enzima, devido à inserção do produto de PCR, permite identificar diretamente os clones recombinantes pela cor branca das colónias, em placas de cultura contendo X-Gal.

3.6.1 Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor

A um microtubo de 1,5mL foi adicionado, pela seguinte ordem, 1µL de vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA), 5µL de tampão de ligação rápida 2x (Tris-HCl 60mM; pH=7.8; MgCl₂ 20mM; DTT 20mM; ATP 2mM; PEG 10%), 3µL de amostra de DNA purificado e 1µL de T4 DNA ligase. A reação de ligação decorreu durante 1:30h, à temperatura ambiente.

3.6.2 Transformação de *E.coli* com DNA plasmídico

Os plasmídeos podem ser introduzidos em células bacterianas pelo processo de transformação. As bactérias que podem ser transformadas, isto é, aquelas que podem absorver o DNA, são chamadas de bactérias competentes.

Algumas bactérias são naturalmente competentes. Outras podem tornar-se competentes através de tratamento químico ou físico. Depois de a bactéria absorver o DNA plasmídico, fica com a capacidade de expressar os genes de resistência a novos antibióticos conforme a instrução dada pelo novo DNA. Bactérias que expressam novas proteínas, desta forma, são ditas “transformadas”. Novas cópias do plasmídeo são sintetizadas pelas enzimas de replicação do DNA da célula e transferidas às células-filhas à medida que a bactéria se multiplica. Este processo permite obter grandes quantidades do gene clonado (Videira, 2001).

Após a transformação por plasmídeos que contêm genes de resistência a antibióticos, a bactéria transformada pode ser selecionada pelo plaqueamento em meio que contém o(s) antibiótico(s). Somente as bactérias que expressam os genes de resistência a novos antibióticos (bactérias transformadas) podem formar colónias nas placas com antibióticos. Este método de seleção de transformantes constitui uma grande vantagem, pois normalmente, a transformação não é muito eficiente. Numa experiência clássica, menos de uma célula em 1000 será transformada (Videira, 2001).

3.6.2.1 Transformação de *E.coli* com DNA plasmídico

Para esta etapa foi utilizada uma alíquota de bactérias competentes (*E. coli* XL1B, congeladas a -80°C), à qual foram adicionados 10µL da ligação de clonagem. Após incubação em gelo durante 35 minutos, procedeu-se ao choque térmico a 42°C durante 2 minutos.

De seguida, plaqueou-se uma placa LB/Agar com X-Gal (80µg/mL), IPTG (0,5mM) e ampicilina (100µg/mL). Incubou-se na estufa a 37°C, durante a noite. Após a incubação, foi efetuada a contagem do número de colónias brancas e colónias azuis existentes na placa.

3.6.3 Cultura, em meio líquido, dos clones recombinantes

Uma das características dos plasmídeos como vetores é a possibilidade de, durante o processo de clonagem, distinguir e selecionar diretamente bactérias que contêm plasmídeos recombinantes das bactérias que contêm plasmídeos intatos. Isto porque, em muitas situações, há uma grande probabilidade de o vetor se religar em vez de ligar a molécula de DNA que se pretende clonar. A estratégia utilizada normalmente é a de construir vetores cujo local de clonagem múltipla (LCM) se encontra dentro de um gene que determina uma dada atividade diretamente mensurável. Quando é inserido um fragmento de DNA nesse local, o gene é interrompido e perde a atividade. O plasmídeo pGEM-T Easy contém o gene codificante da β -galactosidase (LacZ), uma enzima capaz de converter um substrato cromogénico (X-Gal) num produto de cor azul. Num meio de cultura contendo X-Gal, as bactérias transformadas com o plasmídeo pGEM-T Easy intato apresentar-se-ão azuladas devido à atividade da enzima β -galactosidase. As bactérias transformadas com os plasmídeos recombinantes, em que a inserção do DNA destruiu o gene LacZ, permanecerão esbranquiçadas. Para que o processo de seleção acima descrito ocorra, coloca-se IPTG no meio de cultura, que funciona como um indutor da expressão da β -galactosidase.

3.6.3.1 Cultura, em meio líquido, dos clones recombinantes

Para efetuar a cultura dos clones recombinantes, em meio líquido, foram utilizados falcons contendo 2mL meio de cultura LB-broth com ampicilina (100 μ g/mL). Para estes, foi transferida uma colónia branca em cada, seguindo-se uma incubação a 37°C numa estufa com agitação orbital (250rpm), durante a noite.

3.6.4 Purificação dos plasmídeos recombinantes

A lise alcalina em combinação com o detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) tem sido usada desde há mais de 20 anos para isolar DNA plasmídico da *E. coli*. A utilização de detergentes fortemente aniónicos a valores de pH elevados quebra as paredes celulares das bactérias, desnatura o DNA cromossómico e proteínas, e liberta o DNA plasmídico para o sobrenadante. Embora a solução alcalina desnature completamente o DNA, as cadeias de DNA circular (plasmídeos) são incapazes de se separarem uma da outra porque elas são topologicamente entrelaçadas (Sambrook e Russell, 2001).

Durante a lise, as proteínas bacterianas, a parede celular quebrada e o DNA cromossómico desnaturado formam grandes complexos revestidos pelo SDS. Estes complexos são facilmente precipitados quando os iões de sódio são substituídos por iões de potássio. Depois de o material desnaturado ter sido removido por centrifugação, o DNA plasmídico pode ser recuperado do sobrenadante (Sambrook e Russell, 2001).

Para purificar os plasmídeos recombinantes utiliza-se um kit comercial, baseado no método alcalino. O kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) foi desenvolvido para purificar DNA plasmídico a partir de uma cultura de bactérias de *E. coli*.

3.6.4.1 Purificação dos clones recombinantes

O passo de purificação foi efetuado com um kit baseado na técnica de lise alcalina - *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) - seguindo as instruções indicadas pelo fabricante.

3.6.5 Digestão enzimática dos plasmídeos recombinantes

Os estudos de engenharia genética são possíveis devido à existência de uma classe especial de enzimas que “cortam” o DNA. Essas enzimas designam-se enzimas de restrição ou endonucleases de restrição. As enzimas de restrição são proteínas produzidas por bactérias para prevenir ou restringir a invasão de um DNA estranho. Elas atuam como “tesouras” de DNA, cortando o DNA invasor em diversos fragmentos.

As enzimas de restrição reconhecem e cortam sequências específicas ao longo da molécula de DNA, nos chamados sítios de restrição. Cada enzima de restrição tem a sua própria sequência de reconhecimento. Em geral, um sítio de restrição é formado por uma sequência de 4-6pb, designado palíndroma ou sequência palindrômica.

A EcoRI, utilizada neste trabalho para verificar a clonagem do fragmento de interesse, corta cada cadeia de DNA na sequência GAATTC, entre as bases G e A, originando 2 extremidades coesivas.

3.6.6.1 Digestão de plasmídeos recombinantes e eletroforese em gel de agarose para verificação da digestão enzimática

Em microtubos de 1,5mL adicionou-se 8µL de DNA, 2µL de tampão 10x, 1µL de EcoRI e 9µL de água estéril e incubou-se num banho a 37°C durante 1hora. De seguida, foi efetuada uma eletroforese em gel de agarose a 1%, a fim de verificar o resultado da digestão enzimática.

3.7 Imunohistoquímica em cortes histológicos de EO e de Intestino de Rato para deteção de AC3, Gaolf, OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496

A técnica de imunohistoquímica (IMQ ou IHC) possibilita a avaliação da expressão de proteínas em cortes histológicos, e permite a sua localização e distribuição celulares. Esta técnica tem por princípio base a interação anticorpo-antigénio, de forma a detetar a proteína de interesse, podendo o método de deteção ocorrer direta ou indiretamente.

O procedimento de IMQ iniciou-se pela desparafinação dos tecidos em xileno durante 10 minutos à temperatura ambiente dos cortes histológicos de EO e das diversas regiões do intestino (duodeno, jejuno, íleo e colón). De seguida os cortes histológicos foram hidratados através de sucessivas passagens por soluções de concentrações decrescentes de etanol (etanol 100% (v/v), etanol 95% (v/v) e etanol 80% (v/v)). Por fim, os cortes histológicos foram passados por água corrente durante 10 minutos.

A preparação correta do tecido, desde a extração, fixação, desidratação, parafinação e corte do mesmo, é fundamental para o bom funcionamento da técnica. Vários tecidos necessitam que se efetue um passo de recuperação antigénica, pois durante o procedimento de fixação do tecido às lâminas podem ocorrer ligações cruzadas entre proteínas, mascarando os epítopos antigénicos e impedindo que estes sejam detetados pelo anticorpo primário, o que diminui a eficácia da técnica.

Desta forma, foi realizado um passo de recuperação antigénica de todos os tecidos, através do método térmico, onde foi utilizado tampão citrato de sódio 10mM, pH=6, diluído em tampão fosfato salino (PBS), a 90°C, durante 30 minutos.

Neste projeto o método de deteção usado foi a deteção indireta onde o anticorpo primário liga-se especificamente à proteína em estudo e o anticorpo secundário - que possui elevada afinidade para o anticorpo primário - encontra-se biotinizado. A biotina é uma molécula da classe das vitaminas para a qual o complexo ExtrAvidin-Peroxidase possui elevada afinidade. A reação catalisada pela peroxidase usa o peróxido de hidrogénio - H_2O_2 - como substrato e a diaminobenzidina - DAB - como dador de eletrões. A formação do complexo enzima-substrato induz a oxidação da diaminobenzidina promovendo a sua precipitação, originando-se uma coloração castanha sobre a proteína em estudo.

Assim, efetuou-se um primeiro bloqueio das peroxidase endógenas com H_2O_2 a 3%, durante 10 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se um segundo bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 1% e soro fetal bovino (FBS) 5%, diluídos em PBS 1X, durante 40 minutos à temperatura ambiente, com a finalidade de inibir as imunoglobulinas endógenas, para que estas não interajam de forma inespecífica com o anticorpo secundário.

Todas as incubações a que as lâminas histológicas foram sujeitas, realizaram-se numa câmara húmida para evitar que o tecido ficasse seco. As lavagens do tecido são efetuadas com PBS com Tween 20, um detergente que ajuda a lavar e a remover o anticorpo primário excedente, evitando a formação de uma tonalidade de fundo que mascare os resultados.

Os anticorpos primários utilizados para a marcação das proteínas em estudo neste trabalho, bem como as diluições utilizadas, encontram-se apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados para a deteção das proteínas AC3 e Gaolf e dos Recetores Olfativos em Intestino e EO de Rato, pela técnica de Imunohistoquímica.

Proteína	Anticorpo primário	Diluição usada na IMQ
AC3	anti-adenilciclase III (C-20: sc-588, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:100
Gaolf	anti-gnal (ab 74049, Abcam)	1:1000
OR19 (MOR 140-1)	anti-olfactory receptor 19 (ab 101619, Abcam)	1:500
OR63 (MOR 267-1)	anti-olfactory receptor 63 (ab 101618, Abcam)	1:1000
OR600 (MOR 39-1)	anti-olfactory receptor 600 (OSR00208W, Osenses)	1:500
OR620/624 (MOR 4-1/4-2P)	anti-olfactory receptor 620/624 (OSR00198W, Osenses)	1:500
OR1496 (MOR 167-1)	anti-olfactory receptor 1496 (ab 69187, Abcam)	1:500

Para a marcação das proteínas AC3, Gaolf, OR19, OR63, OR600 e OR620/624 e OR1496 foram usados os anticorpos primários apresentados na tabela 3, segundo as diluições indicadas, diluídos em PBS 1X com BSA 1% e FBS 5%. A incubação decorreu overnight a 4°C.

Para a AC3 e Gaolf, após a incubação decorrida durante a noite, os cortes histológicos foram lavados com PBS-T 0,1% seguindo-se uma incubação, de 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário biotínido, anti-rabbit IgG (Sigma Life Science) diluído em PBS 1X com BSA 1% e FBS 5%, (1:20). No caso dos ORs foi efetuada a lavagem dos cortes com PBS-T 0,1% seguindo-se a incubação, durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário, Link biotynilated secondary antibodies AB2, Dako REAL™, Dako.

Posteriormente, foram feitas lavagens com PBS-T 0.1%, tendo-se, de seguida, realizado a incubação com ExtrAvidin-Peroxidase (0,5 mg/ml, Sigma Life Science), 1:20 em PBS 1X com BSA 1% e FBS 5%, durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após esta incubação foram realizadas lavagens das lâminas histológicas, seguidas de uma incubação com DAB 50X (Dako REAL, Dako) dissolvido em tampão de diluição de DAB (HRP substrate buffer, ChemMate, DakoCytomation), durante 2 a 4 minutos.

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

Em todas as IMQs realizadas foi utilizado um controlo negativo que era constituído por uma lâmina do mesmo tecido em estudo, onde se realizou todo o procedimento de igual forma, com exceção da incubação realizada com o anticorpo primário.

Para finalizar, os cortes histológicos foram desidratados, com concentrações crescentes de etanol (etanol 70% (v/v), etanol 95% (v/v) e etanol 100% (v/v)), parafinados em xileno e montados utilizando o meio de montagem Entellan (Merck). Por fim, os cortes histológicos foram observados ao microscópio (Axio Imager A1) nas ampliações de 10X e 40X.

3.8 Extração e Quantificação de Proteína Total de EO e de Intestino de Rato

Para efetuar a extração da proteína total a partir de tecidos, utiliza-se meio de lise completo, que varia de acordo com as características das proteínas que se pretendem extrair. O meio de lise utilizado neste trabalho laboratorial era constituído por: NP40 1%, Desoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e os inibidores de proteases PMSF 1%, aprotinina 3% e Leupeptina 1%.

Os duodenos, jejunos e íleos obtidos a partir de ratos *Wistar Han* foram lisados com 1mL de meio de lise incompleto - 1% de NP40, 0,5% de Desoxicolato de sódio, 0,1% SDS - ao qual se adicionou um cocktail de inibidores de proteases (10µL/mL meio de lise incompleto utilizado), triturados e homogeneizados com o auxílio do Ultra Turrax T25 Basic (IKA® WERKE). Seguidamente, efetuou-se uma centrifugação de 5 minutos a 14000g, a 4°C e recuperou-se o sobrenadante para novos microtubos.

A metodologia utilizada para a extração de EO foi a mesma que a descrita para o intestino, tendo-se alterado apenas com um passo prévio de congelação em azoto líquido seguida de uma trituração mecânica com pilão e almofariz para destruir a extensa matriz extracelular.

A quantificação de proteína total extraída das diversas regiões de intestino e EO foi determinada pelo método de Bradford (1976), num leitor de microplacas (2020, Anthos), onde é traçada uma reta de calibração por leitura da absorvância a 595 nm, de uma diluição sucessiva de amostras de BSA.

O método de Bradford tem por princípio base o fato de o corante Azul Brilhante de Coomassie G250 mudar de cor em condições ácidas e se ligar principalmente aos resíduos básicos e aromáticos das proteínas, convertendo-se para a sua forma aniônica, de cor azul.

A 595nm, este corante apresenta uma absorvância máxima, que é proporcional à quantidade de proteína presente na amostra em estudo.

Após quantificação dos extratos de proteína total, estes foram guardados a -80°C.

3.9 Western Blotting em extratos proteicos de EO e de Intestino de Rato para detecção de AC3, Gaolf, OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496

A técnica de Western Blotting ou imunoblotting possibilita efetuar a detecção e quantificação relativa de uma determinada proteína, partindo de extratos de proteína total. O princípio base deste método depende da reação entre anticorpo com o epítipo antigénico da proteína que se pretende estudar, a qual se encontra imobilizada sobre uma membrana.

Para o primeiro passo de Western Blotting juntou-se num microtubo de 1,5mL um volume de amostra equivalente a 50µg de proteína total e água até perfazer um volume de 20µL. De seguida adicionou-se 5µL de tampão de deposição (2% SDS, um detergente aniônico que confere carga negativa às proteínas, 5% β-mercaptoetanol, um agente desnaturante que é responsável por quebrar as ligações dissulfureto das proteínas, 25% glicerol que confere densidade à amostra, 0,01% Azul de bromofenol que confere cor azul às amostras de forma a facilitar a observação da migração durante a eletroforese, em Tris-HCl, que é responsável por manter o pH da solução estável a 62,5mM, pH=6,8) e os extratos proteicos foram desnaturados à temperatura de 95°C, durante 5 minutos e posteriormente separados, através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), a 10%, e corridos a 90V no caso da AC3 e a 120V no caso dos recetores olfativos e Gaolf. Paralelamente às amostras, foi corrido um marcador de pesos moleculares com proteínas de peso molecular conhecido (NzyTech Color Marker Protein II, nzyTech). Este passo possibilita efetuar a separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular.

Após a eletroforese, é efetuada uma eletrotransferência de forma a transferir as proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose, embora possam ser utilizadas membranas de outros materiais. Neste projeto, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF 0,45µm de poro (Amersham), previamente ativadas em metanol 100% e equilibradas em água miliQ.

Desta forma, após a eletroforese, o gel foi colocado num dispositivo apropriado, em contato com a membrana sintética que possui uma elevada afinidade para as proteínas e estes entre folhas de papel absorvente, formando uma sanduíche. Este conjunto foi colocado dentro de

uma tina com tampão de eletrotransferência CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfônico), e após aplicação de uma corrente elétrica, promoveu-se a transferência das proteínas para a membrana.

O passo de eletrotransferência foi efetuado a 290mA, durante 1:30 horas no caso dos recetores olfativos, 750mA durante 45 minutos para a Gaolf e a 750mA durante 1:30 horas no caso da AC3, tendo-se, seguidamente, bloqueado as membranas com uma solução BSA 3% em TBS-T 0,1%, durante 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente ou com uma solução de leite magro em pó 5% diluído em TBS-T 0,05% durante 1:30 horas. A função destas soluções de bloqueio é impedir ligações inespecíficas dos anticorpos às membranas.

Após o bloqueio, as membranas são então incubadas com o anticorpo primário, específico para a proteína de interesse. A incubação das membranas ocorreu durante a noite a 4°C, com os anticorpos primários descritos na tabela 4.

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados para a deteção das proteínas AC3 e Gaolf e dos Recetores Olfativos em Intestino e EO de Rato, pela técnica de Western Blotting.

Proteína	Anticorpo primário	Diluição usada no WB
AC3	anti-adenilciclase III (C-20: sc-588, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:500
Gaolf	anti-gnal (ab 74049, Abcam)	1:500
OR19 (MOR 140-1)	anti-olfactory receptor 19 (ab 101619, Abcam)	1:500
OR63 (MOR 267-1)	anti-olfactory receptor 63 (ab 101618, Abcam)	1:500
OR600 (MOR 39-1)	anti-olfactory receptor 600 (OSR00208W, Osenses)	1:300
OR620/624 (MOR 4-1/4-2P)	anti-olfactory receptor 620/624 (OSR00198W, Osenses)	1:500
OR1496 (MOR 167-1)	anti-olfactory receptor 1496 (ab 69187, Abcam)	1:500

Após incubação das membranas com os respetivos anticorpos primários efetuaram-se 3 lavagens de 15 minutos com TBS-T 0,1%, seguindo-se a incubação com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com a fosfatase alcalina (GE Healthcare), 1:20000, em TBS-T 0,1%, durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação constante e suave para a AC3, Gaolf e ORs. Foi, também, testado o método de revelação por HRP para os ORs sendo a incubação

com o anticorpo secundário efetuada durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz), 1:20000 em TBS-T 0,05%. As lavagens têm como função remover o excesso de anticorpo presente nas membranas.

Para finalizar, a membrana é incubada com ECF (ECF Western Blotting Reagent Packs, GE Healthcare), o substrato da fosfatase alcalina, durante 5 minutos, que quando excitado por uma fonte de luz adequada, emite fluorescência, permitindo a deteção de uma banda. A revelação da membrana é, por este motivo, efetuada por um aparelho de leitura de fluorescência onde a intensidade da banda é diretamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. A deteção das bandas foi realizada no Molecular Imager FX (FX Pro Plus, Bio-Rad).

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

No caso dos ORs testados com o método HRP, as membranas foram incubadas com ECL (Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate) (Millipore) durante 5 minutos, sendo a revelação efetuada pelo método de HRP e as membranas expostas a filme de autorradiografia (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare).

4. RESULTADOS

4.1 Detecção das proteínas AC3 e Golf e dos Recetores Olfativos OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496 no Intestino de Rato por Imunohistoquímica

A análise da expressão dos recetores olfativos, OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496 e da AC3 e Golf, proteínas envolvidas na via de transdução olfativa, foi efetuada pela técnica de IMQ, utilizando cortes histológicos das diferentes regiões de intestino (INT) de rato (duodeno, jejuno, íleo e colon).

A figura 12 mostra as IMQs com marcação nuclear dos cortes histológicos de epitélio olfativo (A e B) e das diferentes regiões do intestino: DUO (C e D), JEJ (E e F), IL (G e H) e CL (I e J) de rato. Os cortes A e B mostram as diferentes camadas celulares de epitélio olfativo de rato, usado como controlo positivo da via olfativa, em todo este projeto.

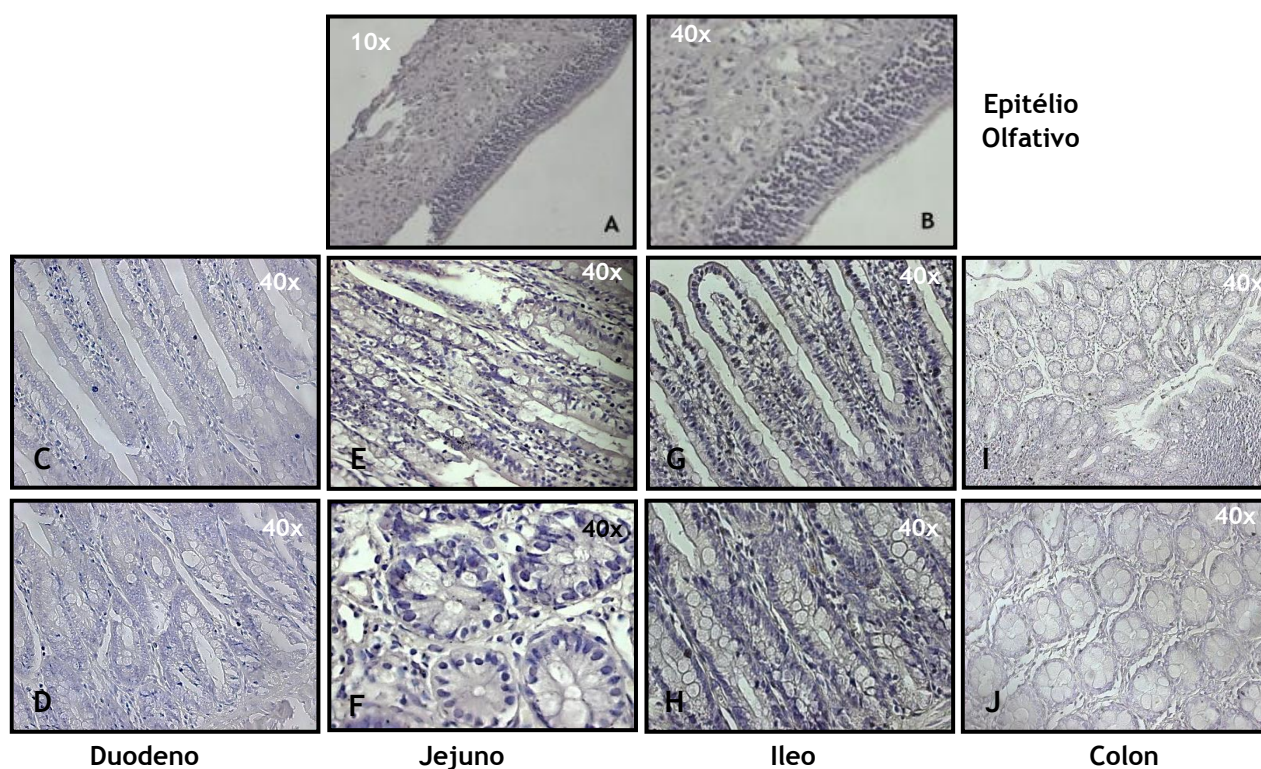
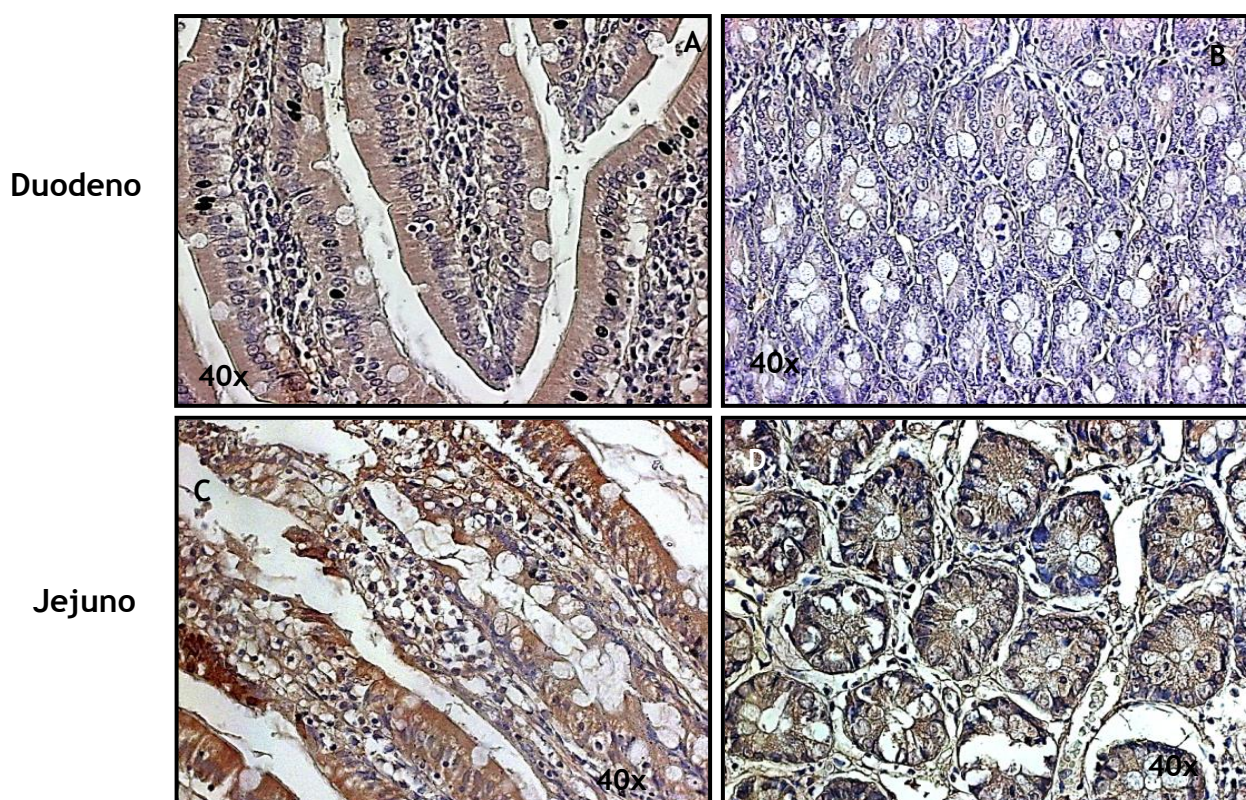


Figura 12. Cortes histológicos de epitélio olfativo (A e B) e de intestino (C-J) de rato com marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer, utilizados como controlos negativos em todas as IMQs realizadas ao longo do projeto.

4.1.1 OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496 no Intestino de Rato por Imunohistoquímica

As IMQs com os anticorpos **OR19 (MOR 140-1)**, **OR63 (MOR 267-1)**, **OR620/626 (MOR 4-1/MOR 4-2P)** e **OR1496 (MOR 167-1)** mostraram a presença destes ORs nos enterócitos das vilosidades intestinais e células caliciformes no DUO (A e B), JEJ (C e D) e IL (E e F), como apresentado nas figuras 13, 14, 16 e 17, respetivamente. Em todos os casos, a marcação aparentemente mais citoplasmática parece ter alguma expressão nuclear. Notou-se claramente um decréscimo na expressão ao nível do IL para todos os ORs, exceto para o OR1496, que apresentou níveis similares de expressão nas diferentes regiões do INT delgado. Adicionalmente, mostrou-se uma baixa expressão de todos os ORs em estudo nos enterócitos das células caliciformes de colón (CL) (G e H). As imagens 13/14/16/17-I e 13/14/16/17-J, mostram a presença do OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496, respetivamente nas diferentes camadas celulares de EO de rato, que foi utilizado como controlo positivo.

Na figura 15 é possível observar as IMQs realizadas com o anticorpo **OR600 (MOR 39-1)** que mostraram a presença deste OR nos enterócitos das vilosidades intestinais e células caliciformes no DUO (A e B), JEJ (C e D) e IL (E e F), parecendo, a expressão proteica ser mais forte ao nível do JEJ. É notável um decréscimo na expressão ao nível do IL e a marcação aparentemente mais citoplasmática, parece ter alguma expressão nuclear, seguindo o mesmo padrão que os restantes ORs em estudo. Mostrou-se também a presença deste OR nos enterócitos das células caliciformes de colón (G e H). As imagens I e J mostram a presença do OR600 nos cílios e células olfativas de EO de rato que foi usado como controlo positivo.



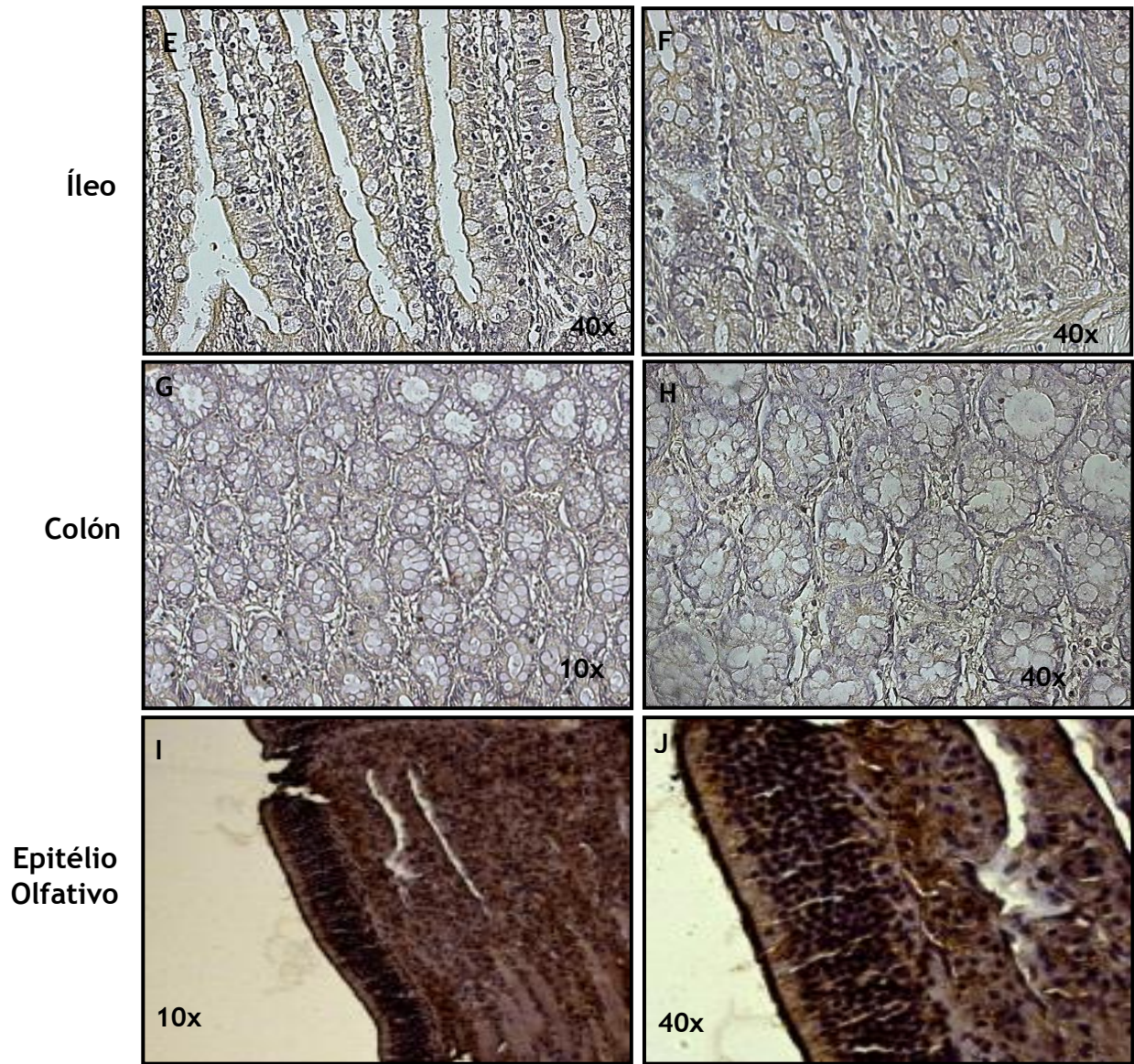
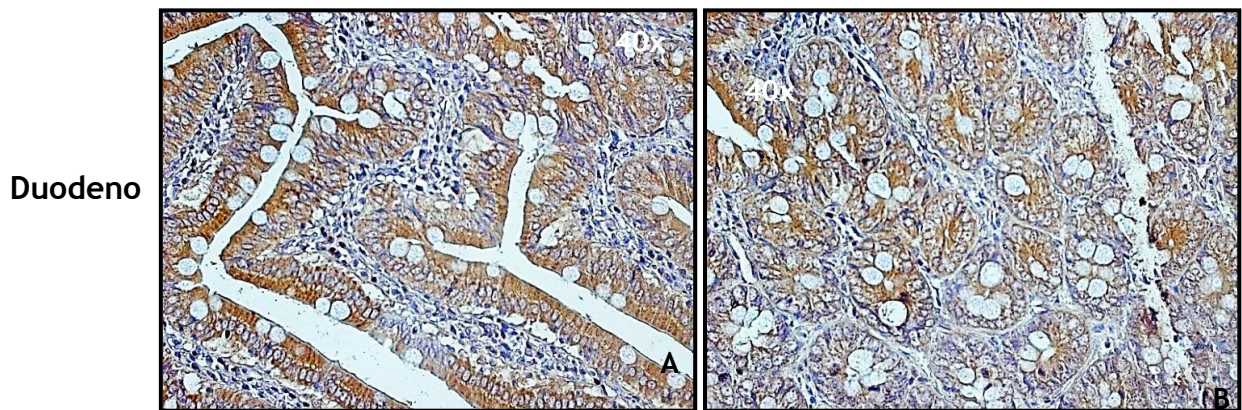


Figura 13. Expressão proteica da proteína OR 19 (MOR 140-1) em INT e EO de rato. (A a F) - IMQ de cortes histológicos de Intestino delgado de rato incubados com anti-Olfactory receptor 19 (1:500) e DAB. (G e H) - IMQ de cortes histológicos de Colón de rato incubados com anti-Olfactory receptor 19 (1:250) e DAB. (I e J) - IMQ de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-Olfactory receptor 19 (1:750) e DAB. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.



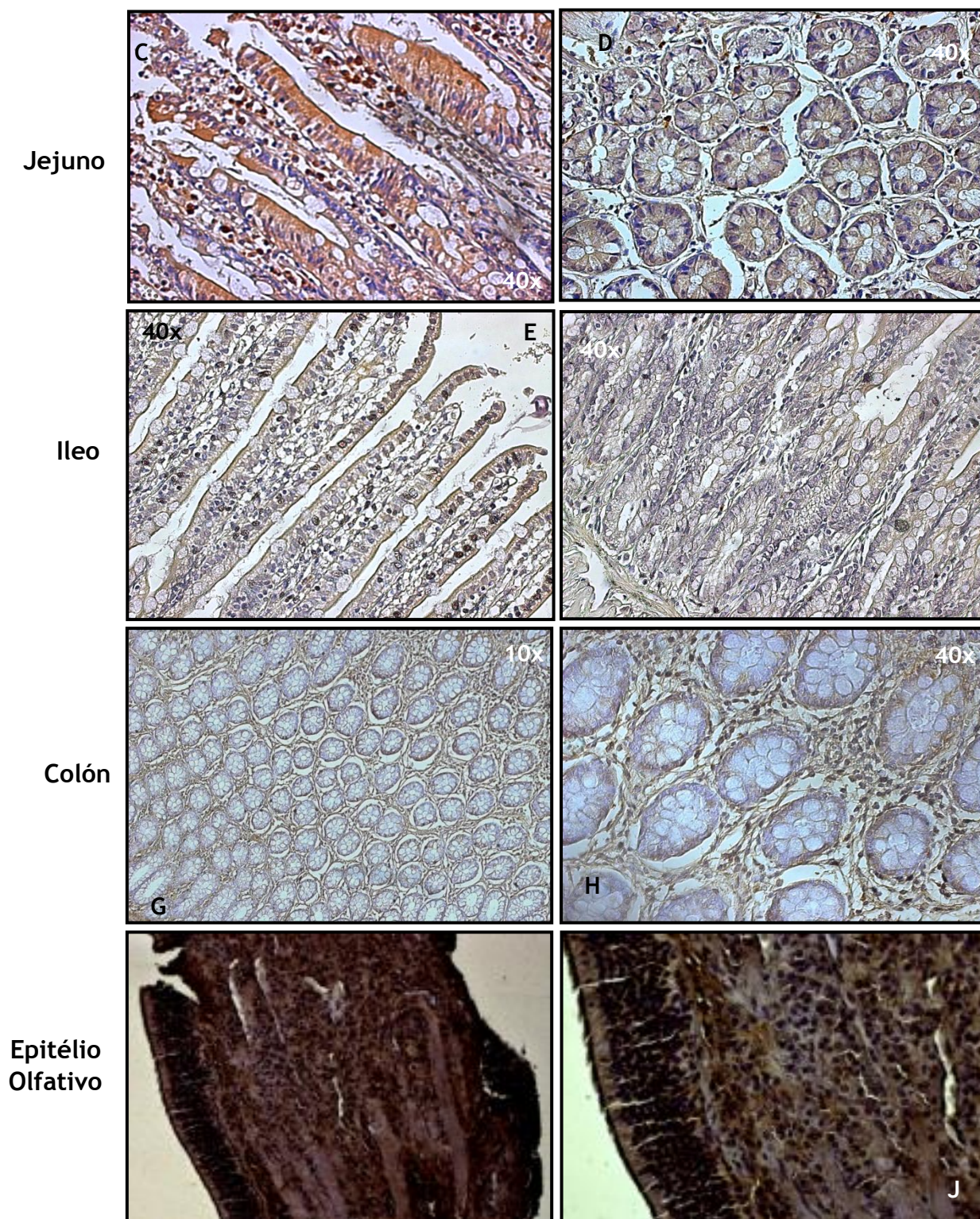


Figura 14. Expressão proteica da proteína OR 63 (MOR 267-1) em INT e EO de rato. (A a F) - IMQ de cortes histológicos de Intestino delgado de rato incubados com anti-Olfactory receptor 63 (1:500) e DAB. (G e H) - IMQ de cortes histológicos de Colón de rato incubados com anti-Olfactory receptor 63 (1:250) e DAB. (I e J) - IMQ de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-Olfactory receptor 63 (1:750) e DAB. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

Será que a maquinaria de transdução olfativa está presente no intestino?

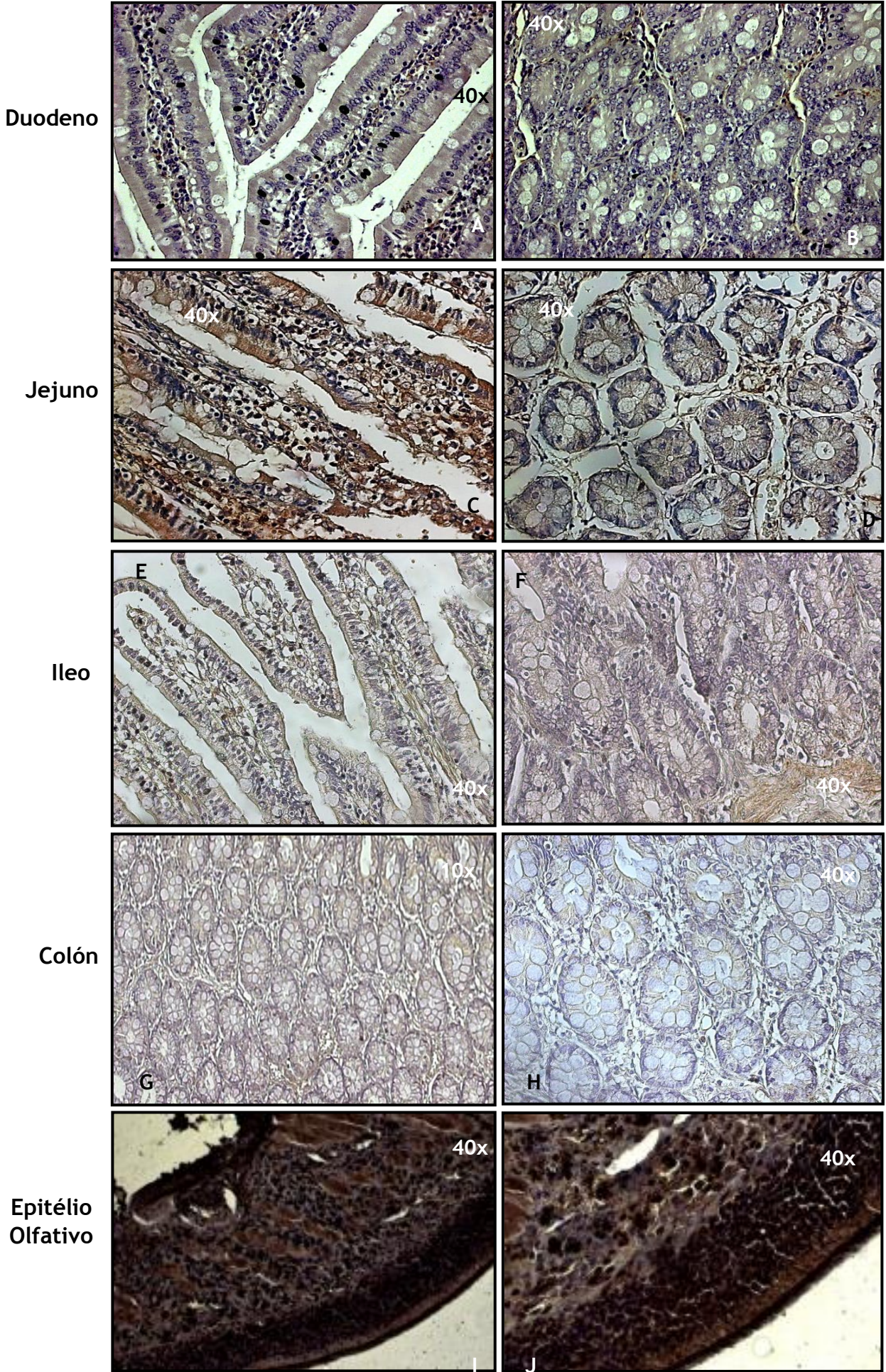
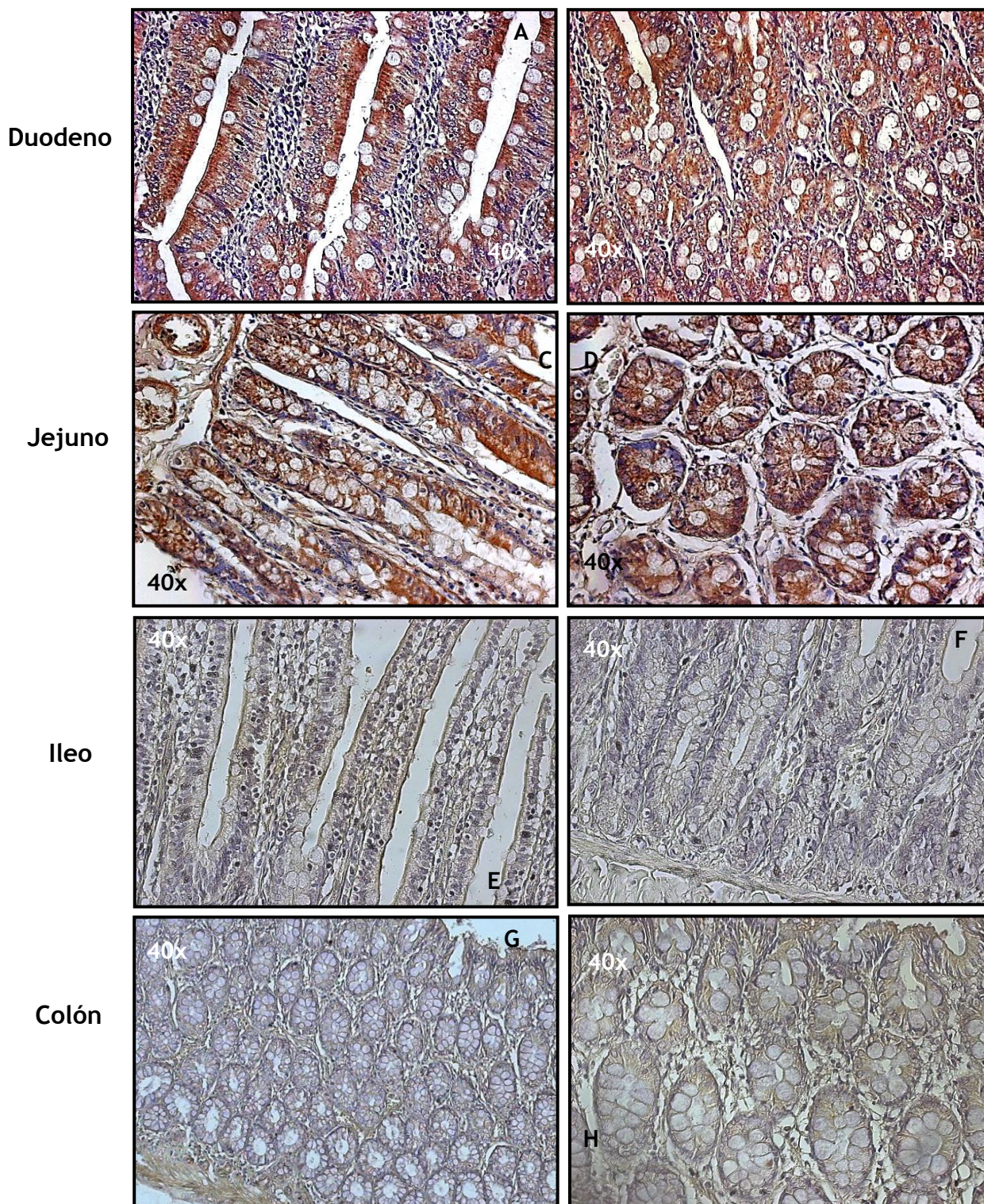


Figura 15. Expressão proteica da proteína OR 600 (MOR 39-1) em INT e EO de rato. (A a F) - IMQ de cortes histológicos de Intestino delgado de rato incubados com anti-Olfactory receptor 600 (1:500) e DAB. (G e H) - IMQ de cortes histológicos de Colón de rato incubados com anti-Olfactory receptor 600 (1:250) e DAB. (I e J) - IMQ de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-Olfactory receptor 600 (1:750) e DAB. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.



**Epitélio
Olfativo**

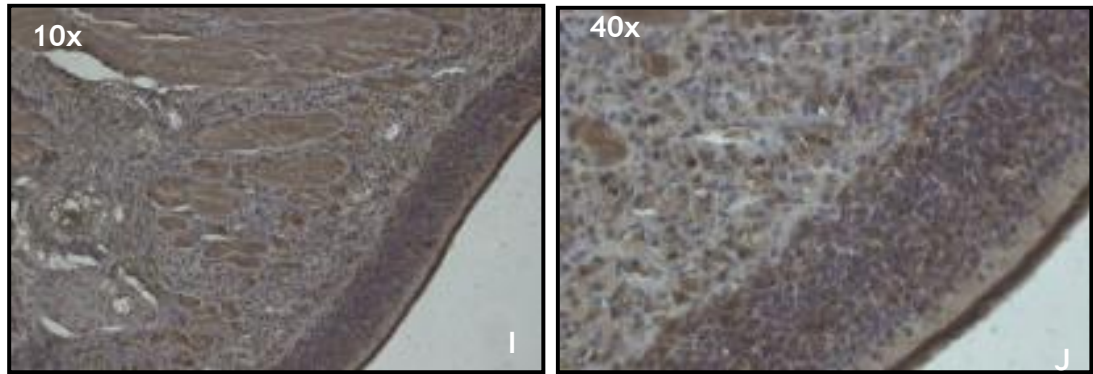
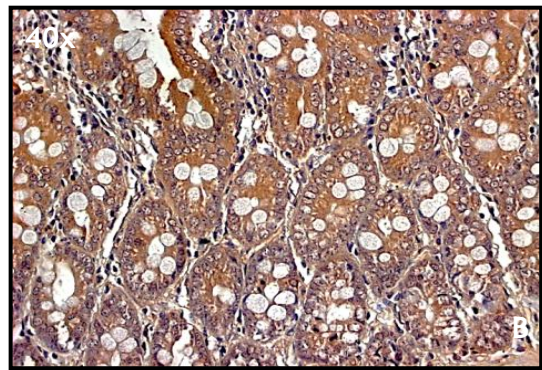
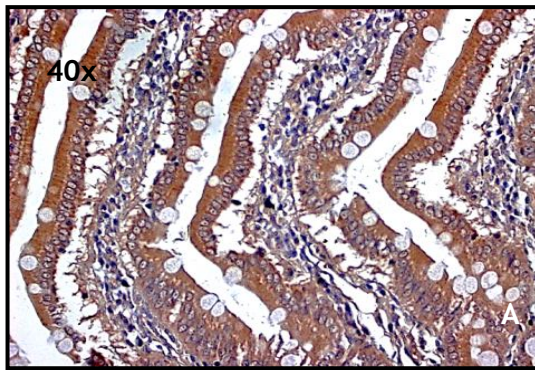
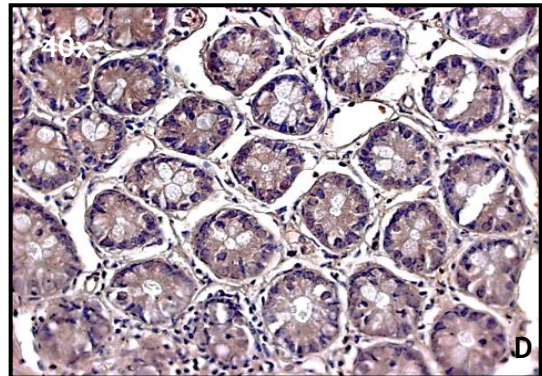
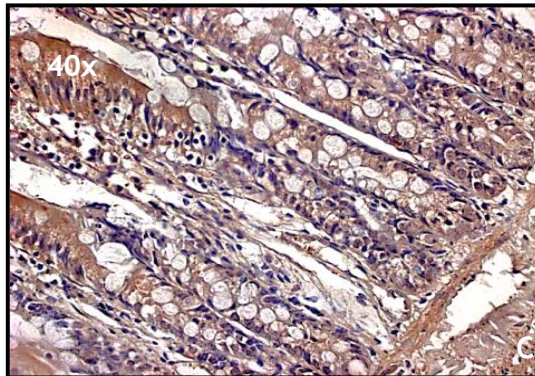


Figura 16. Expressão proteica da proteína OR 620/624 (MOR 4-1/MOR 4-2P) em INT e EO de rato. (A a F) - IMQ de cortes histológicos de Intestino delgado de rato incubados com anti-Olfactory receptor 620/624 (1:500) e DAB. (G e H) - IMQ de cortes histológicos de Colón de rato incubados com anti-Olfactory receptor 620/624 (1:250) e DAB. (I e J) - IMQ de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-Olfactory receptor 620/624 (1:750) e DAB. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

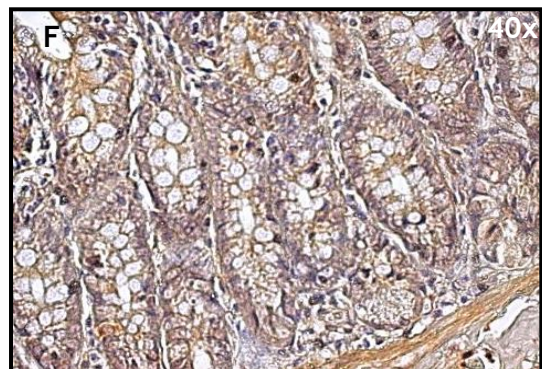
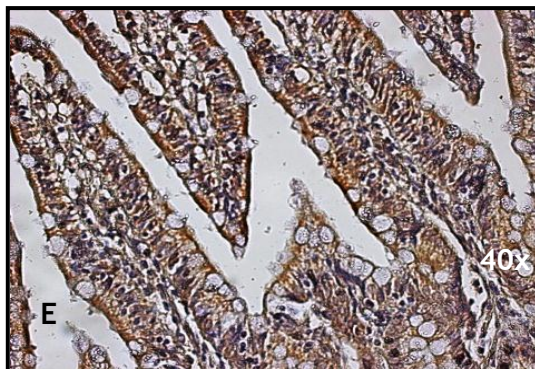
Duodeno



Jejuno



Ileo



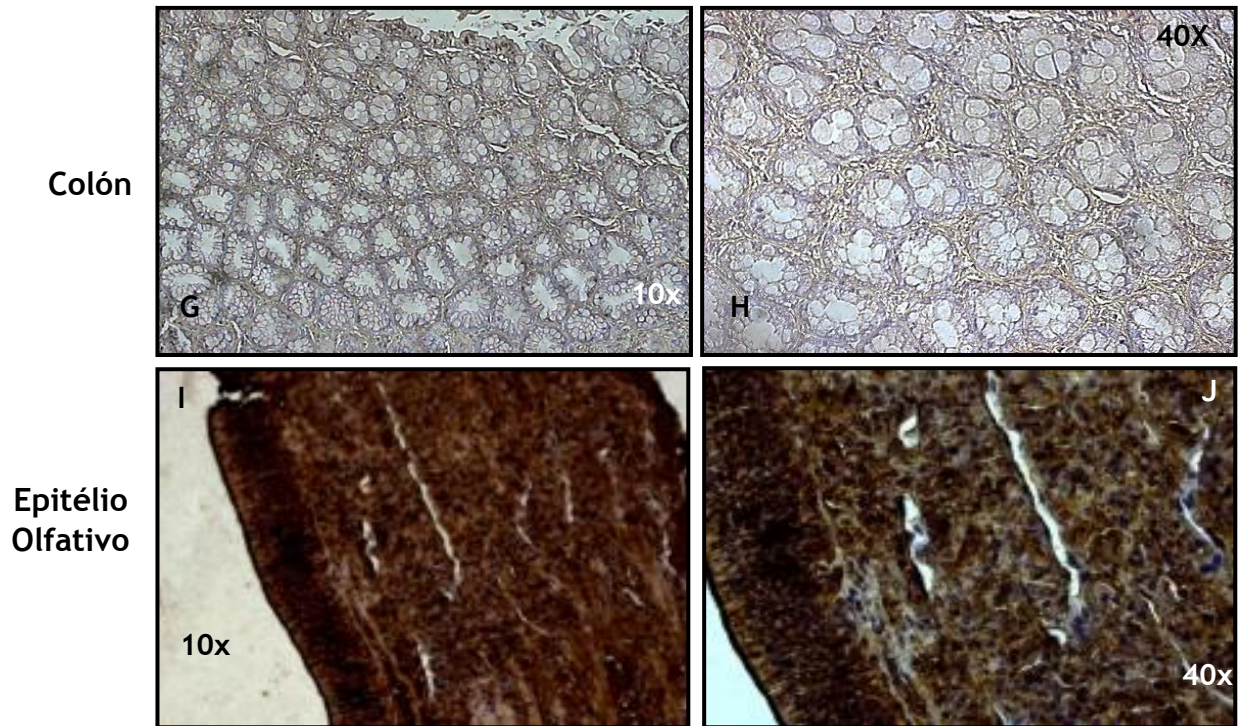
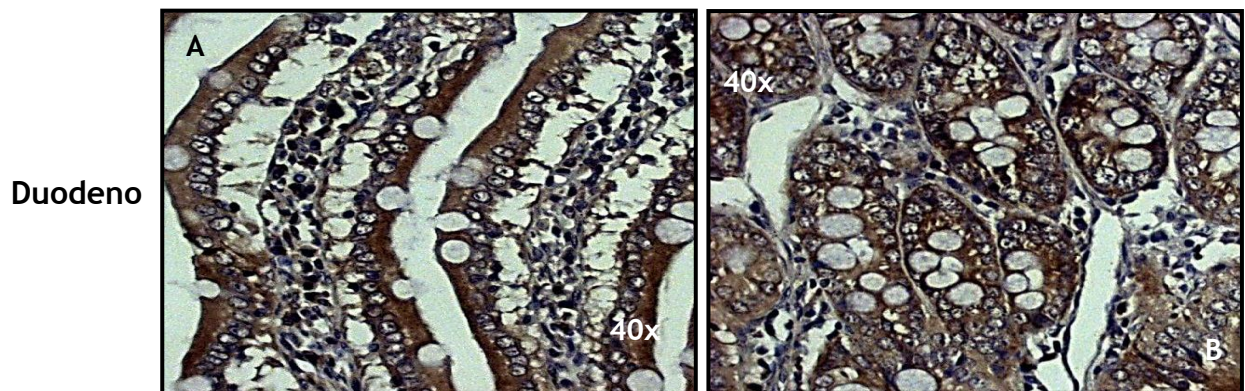


Figura 17. Expressão proteica da proteína OR 1496 (MOR 167-1) em INT e EO de rato. (A a F) - IMQ de cortes histológicos de Intestino delgado de rato incubados com anti-Olfactory receptor 1496 (1:500) e DAB. (G e H) - IMQ de cortes histológicos de Colón de rato incubados com anti-Olfactory receptor 1496 (1:250) e DAB. (I e J) - IMQ de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-Olfactory receptor 1496 (1:750) e DAB. Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

4.1.2 AC3 e $G\alpha_{olf}$ no Intestino de Rato por Imunohistoquímica

As IMQs, na figura 18 e na figura 19, realizadas com o anticorpo AC3 e o anticorpo $G\alpha_{olf}$, respetivamente, mostraram a presença destas duas proteínas nos enterócitos das vilosidades intestinais e células caliciformes no DUO (A e B), JEJ (C e D) e IL (E e F) de rato. Notou-se claramente um decréscimo na expressão proteica ao nível do IL. As imagens 18/19-G e 18/19-H mostram, respetivamente, revelam a presença da AC3 e $G\alpha_{olf}$ nas diferentes camadas celulares de EO de rato, que foi usado utilizado como controlo positivo.



Será que a maquinaria de transdução olfativa está presente no intestino?

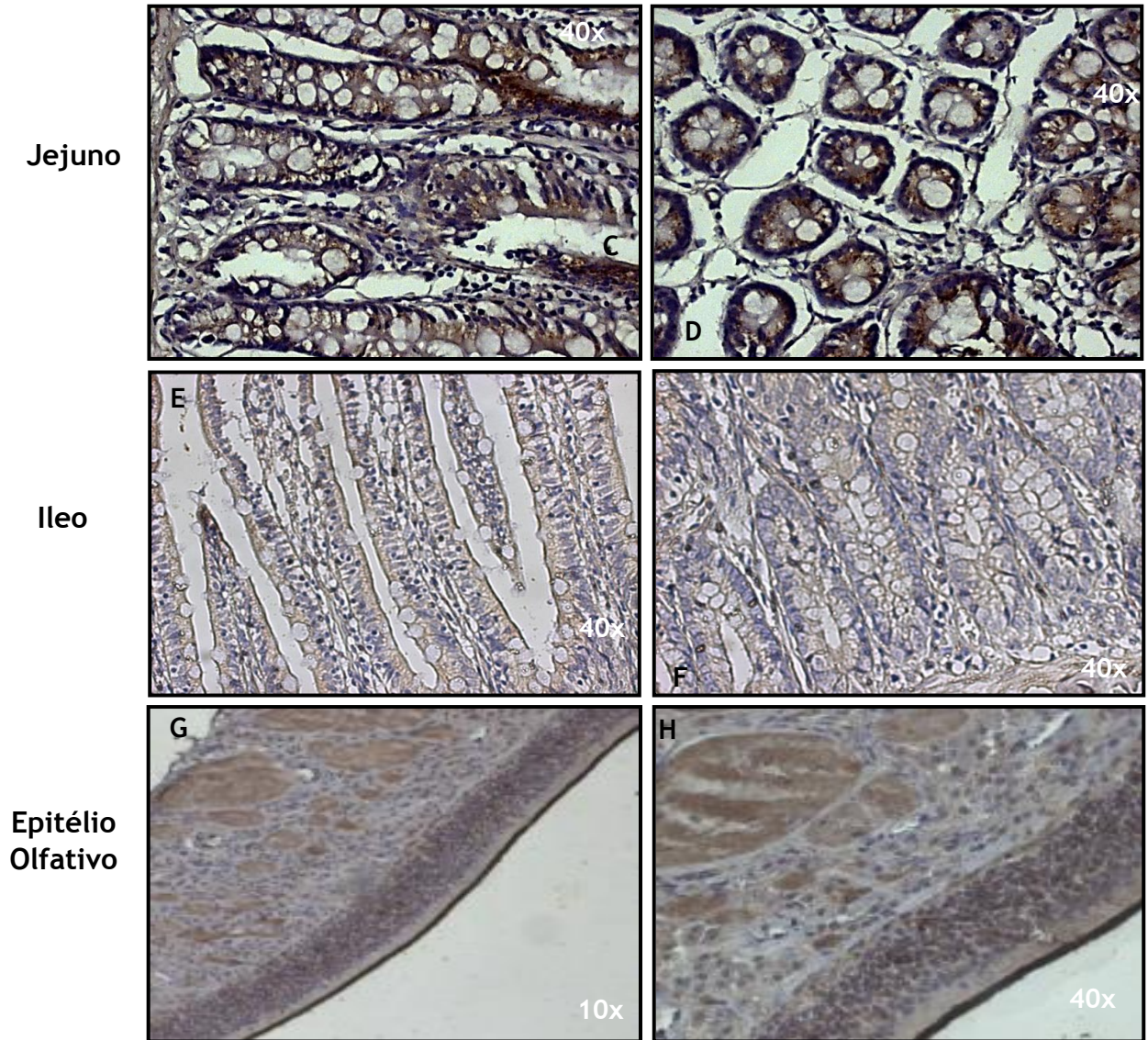
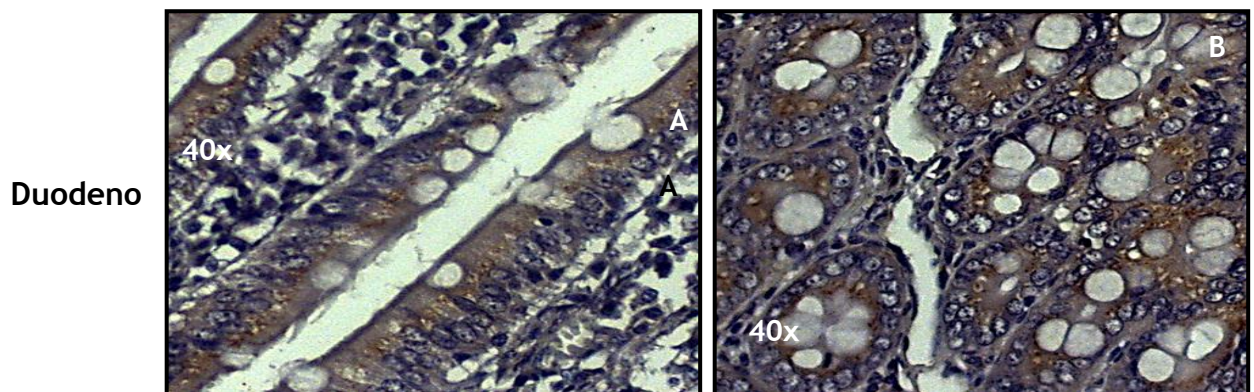


Figura 18. Expressão proteica da adenilciclase 3 (AC3) em INT e EO de rato. (A a F) - IMQ de cortes histológicos de intestino de rato incubados com anti-ACIII (1:100) e DAB. (G e H) - IMQ de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-ACIII (1:750). Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.



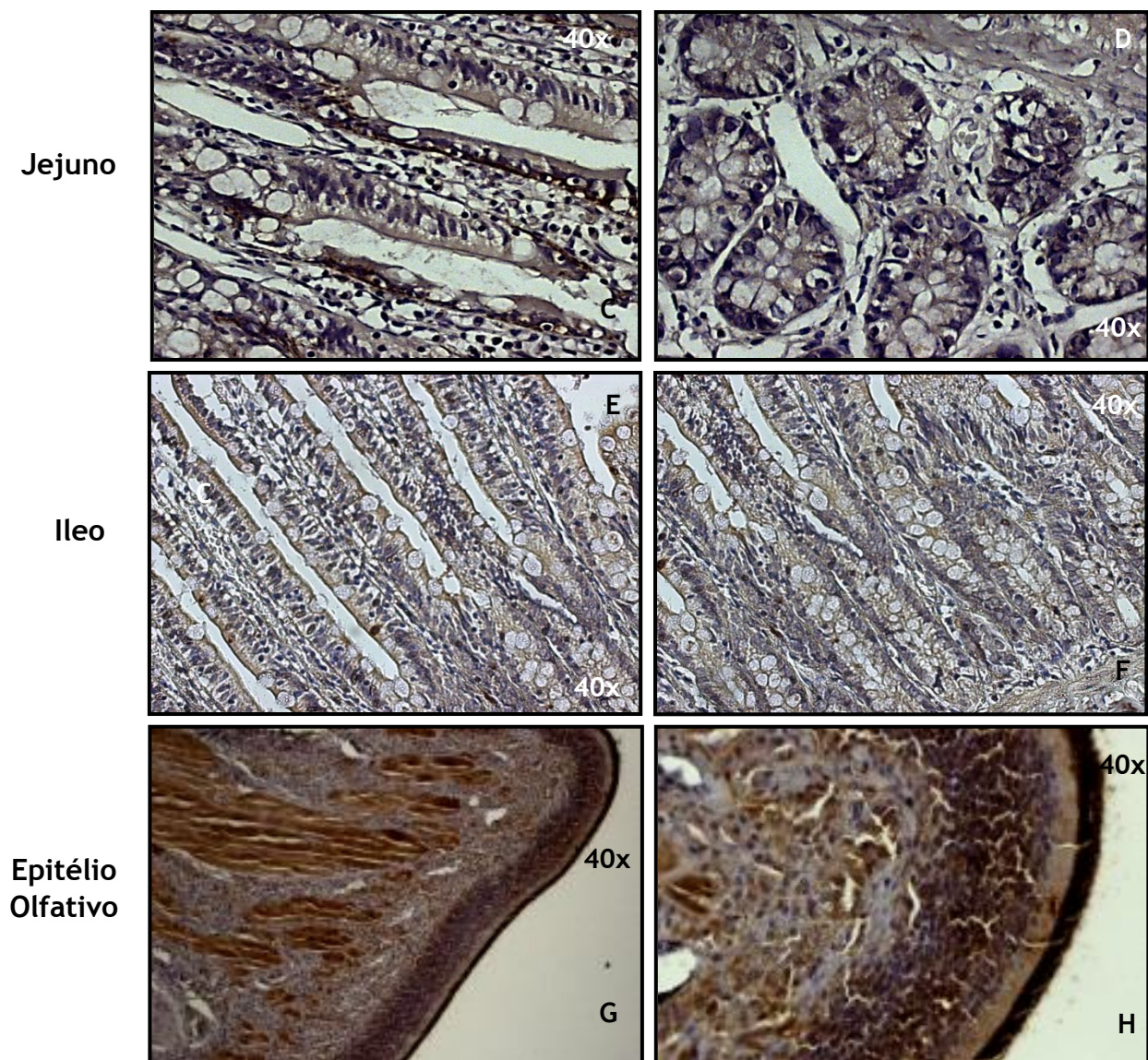


Figura 19. Expressão proteica da subunidade α da proteína G (Gaolf) em INT e EO de rato. (A a F) - IMQ de cortes histológicos de intestino de rato incubados com anti-Gnal (1:1000) e DAB. (G e H) - IMQ de cortes histológicos de EO de rato incubados com anti-Gnal (1:1000). Marcação nuclear com Hematoxilina de Mayer.

4.2 Deteção das proteínas AC3 e Gaolf em Intestino de Rato por Western Blotting

A figura 20 mostra o resultado dos Western blots efetuados com extratos de proteína total de EO e INT de rato incubados com anticorpos específicos para as proteínas AC3 e Gaolf.

A figura 20-A ilustra a incubação com anti-ACIII revelando a existência de uma proteína no DUO com um peso molecular estimado de 55kDa. No caso do EO, a incubação com o anticorpo anti-ACIII revelou a presença de duas bandas: uma a 55kDa e outra a 200kDa.

Será que a maquinaria de transdução olfativa está presente no intestino?

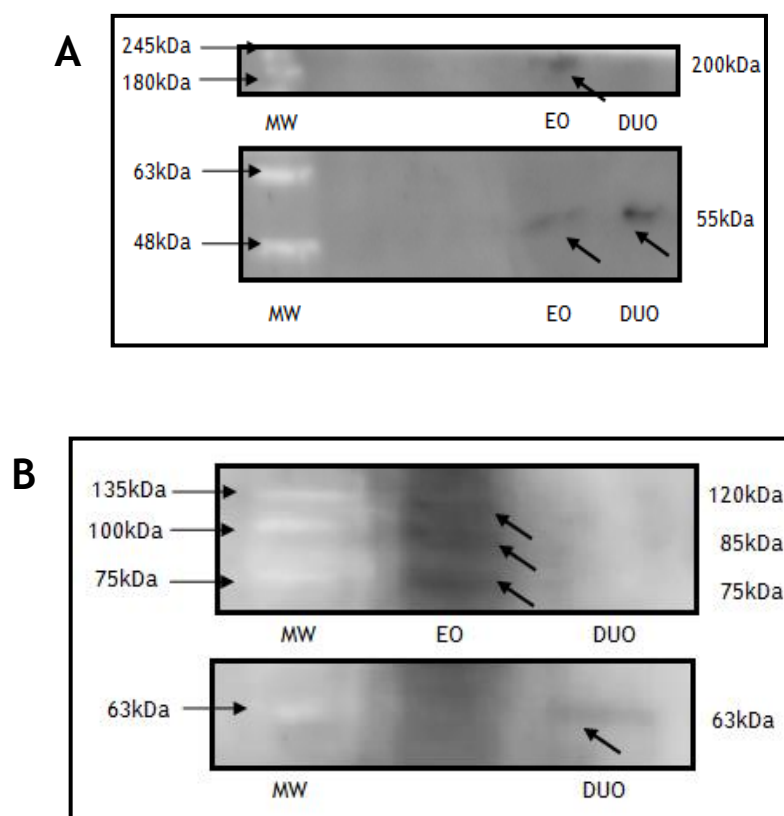


Figura 20. Western Blotting de extratos de proteína total de INT e de EO de rato, incubados com os anticorpos específicos anti-ACIII (A) e anti-Gaolf (B). MW - Marcador de pesos moleculares; EO - Epitélio Olfativo; DUO - Duodeno.

Relativamente à incubação com o anticorpo anti-Gaolf (figura 20-B) é observada a presença de uma banda com um peso molecular aproximado de 63kDa no DUO. Para o EO foram, reveladas bandas com pesos moleculares aproximados de 75kDa, 85kDa e 120kDa.

4.3 Deteção dos recetores olfativos OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496 no Intestino de Rato por Western Blotting

A figura 21 mostra o resultado dos Western blots efetuados com extratos de proteína total das diferentes regiões do INT delgado (DUO, JEJ e IL) e do EO de rato, e incubados com anticorpos específicos para as proteínas OR19, OR63, OR600, OR620/624 e OR1496.

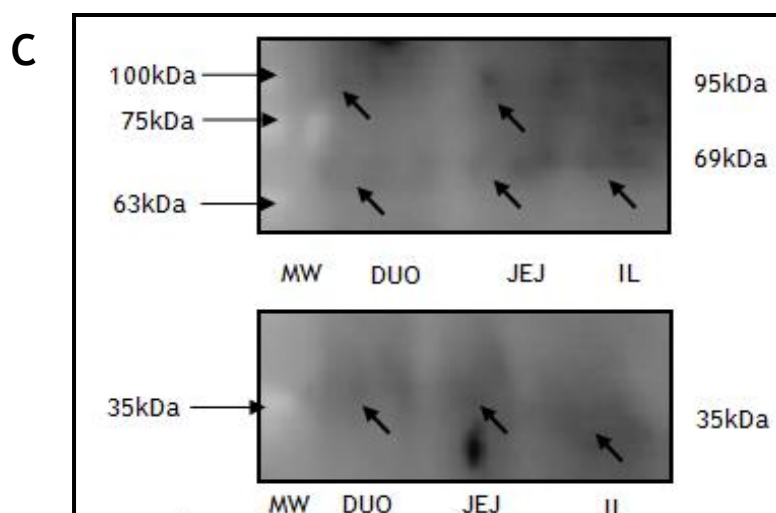
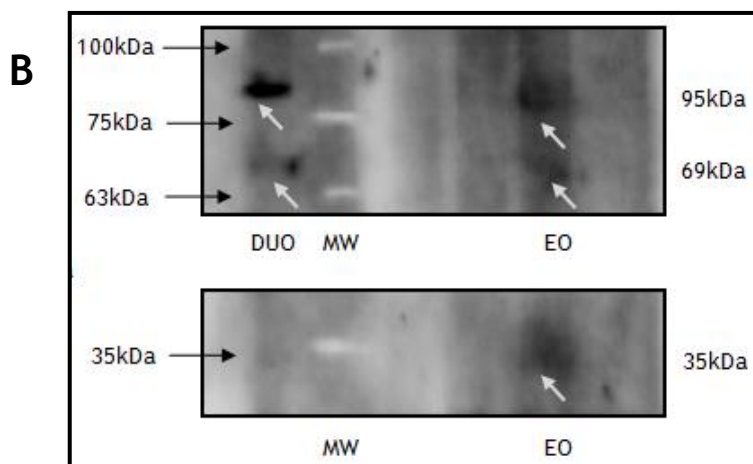
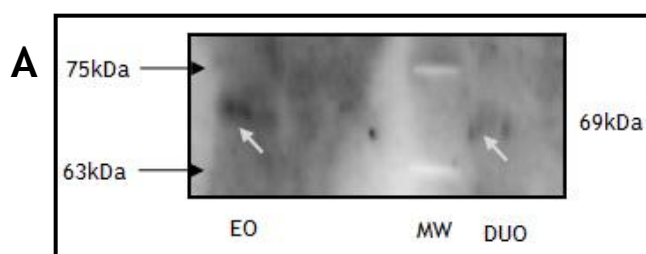
A figura 21-A ilustra a incubação com anti-OR19 revelando a existência de uma proteína com peso molecular aproximado de 69kDa tanto em EO como em DUO.

A figura 21-B mostra a incubação com anticorpo anti-olfactory 63, revelando a existência de uma proteína no EO e em DUO com um peso molecular próximo de 69kDa e 95kDa. No caso do EO foi ainda revelada uma banda a 35kDa.

A figura 21-C ilustra a incubação com anti-OR600 mostrando a presença de uma proteína no DUO, JEJ e IL com um peso molecular aproximado de 35kDa, ocorrendo, ainda, bandas adicionais a 69kDa para todas as três regiões de INT delgado e a 95kDa para DUO e JEJ.

A figura 21-D ilustra a incubação com anti-OR620/624 observando-se a existência de uma proteína de peso molecular aproximado de 30kDa no DUO, JEJ e IL. No caso do JEJ foi revelada uma banda adicional a 69kDa.

A figura 21-E mostra a incubação com o anticorpo anti-olfactory 1496, revelando a presença de uma proteína com 35kDa nas três regiões do INT delgado (DUO, JEJ e IL).



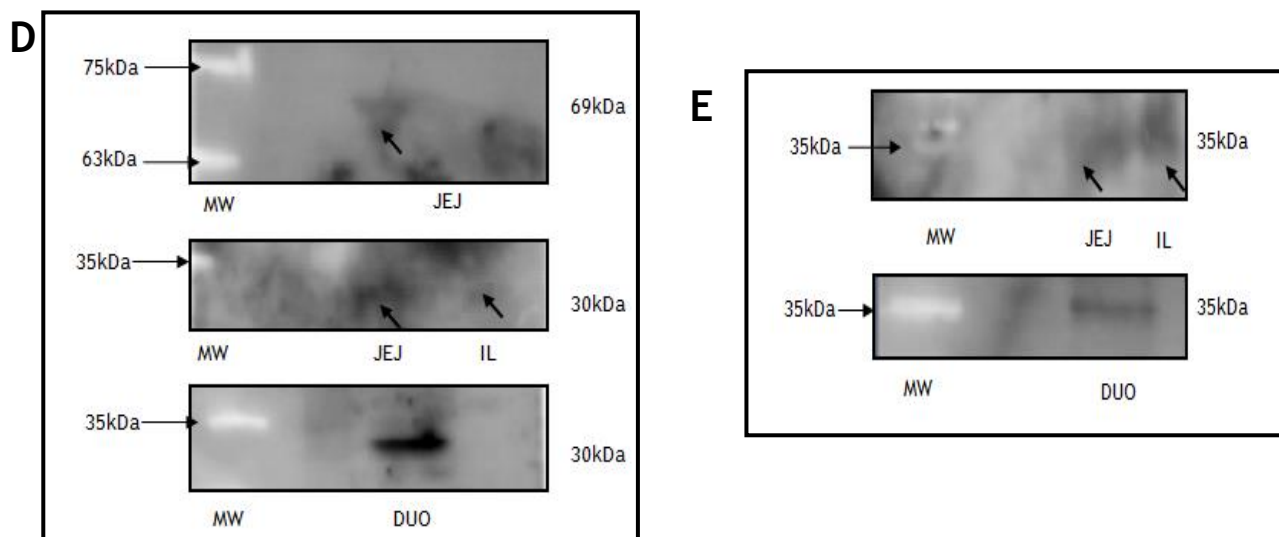


Figura 21. Western Blotting de extratos de proteína total de INT de rato, incubados com os anticorpos específicos anti-OR19 (A), anti-OR63 (B), anti-OR600 (C), anti-OR620/624 (D) e anti-OR1496 (E). MW - Marcador de pesos moleculares; EO - Epitélio olfativo; DUO - Duodeno; JEJ - Jejunio; IL - Íleo.

4.4 Expressão dos genes OR por PCR Convencional com “primers” degenerados

Após otimização das condições de PCR com primers degenerados (conOR - primers *consensus* para ORs), foi obtida uma banda de aproximadamente 525pb. Os resultados parecem mostrar que existe expressão de ORs, ao nível do mRNA, no DUO de rato (figura 22).

Os produtos de PCR foram purificados com o *Kit Wizard® SV Gel end PCR Clean-Up System* (Promega), clonados em pGEM-T Easy, enviados para sequenciar à Stabvida Portugal, e aguardamos os resultados da sequenciação.

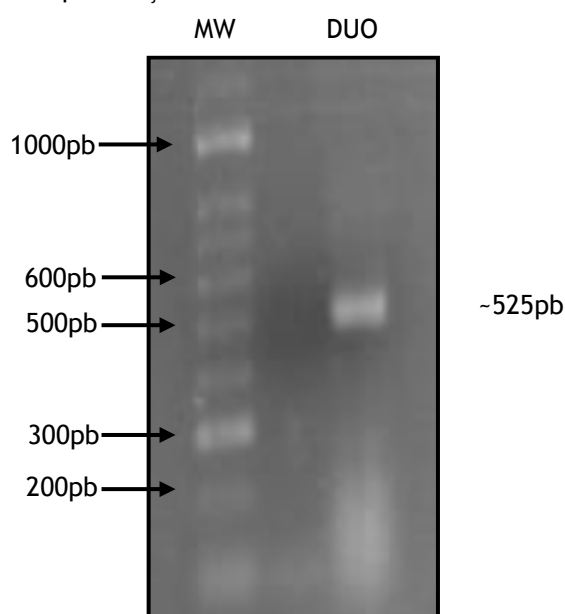


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 1%, coloração com GreenSave, do produto de PCR com os primers conOR. MW - Marcador de Peso Molecular; DUO - Duodeno: 10µL de produto de PCR.

4.5 Expressão génica de $G\alpha_{olf}$ por PCR Convencional com “primers” específicos

Após a otimização das condições de PCR utilizando primers específicos para a $G\alpha_{olf}$, foi obtida uma banda de aproximadamente 300pb. Desta forma, os resultados parecem mostrar que existe expressão, ao nível do mRNA, da proteína $G\alpha_{olf}$, no DUO de rato (figura 23).

O produto de PCR foi enviado para sequenciar à Stabvida Portugal, e aguardamos os resultados da sequenciação.

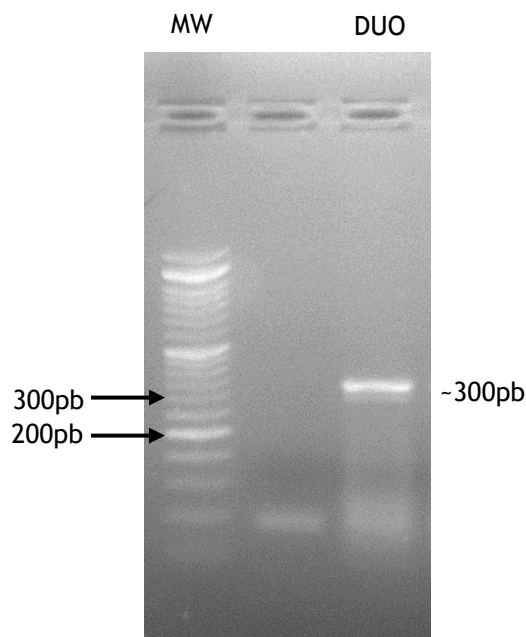


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 1%, coloração com GreenSave, do produto de PCR com os primers específicos para a $G\alpha_{olf}$. MW - Marcador de Peso Molecular; DUO - Duodeno: 10 μ L de produto de PCR.

Será que a maquinaria de transdução olfativa está presente no intestino?

5. DISCUSSÃO

A via da transdução olfativa já foi identificada em vários tecidos, que não o epitélio olfativo, como o rim, a placenta, o coração em desenvolvimento, os pulmões, o baço, a língua, o encéfalo, os espermatozoides (Itakura S. *et al.*, 2006; Pluznick, Zou *et al.*, 2008; NaNa Kang e JaeHyung Koo, 2012), o pâncreas e o fígado (NaNa Kang e JaeHyung Koo, 2012). Todos estes tecidos, tal como o intestino, são tecidos de barreira que respondem a estímulos externos.

Pluznick e seus colaboradores (2008) desenvolveram um estudo no rim, para averiguar a expressão de algumas proteínas chave da via da transdução olfativa neste tecido e a sua funcionalidade, já que o rim é um órgão que monitoriza a composição química do fluido tubular. Este estudo mostrou que as proteínas Golf, AC3 e alguns ORs se encontram expressos nas células do rim. Testes funcionais realizados pelos mesmos autores, desenvolvidos em ratinhos *knockout* para AC3, mostraram que a ausência desta via de sinalização compromete a função do rim, apresentando uma diminuição da taxa de filtração glomerular.

Um outro estudo desenvolvido por Itakura *et al.* (2006) mostrou a presença da proteína Golf da via da transdução olfativa na placenta. Este estudo sugere, ainda, que ORs permitem a deteção de sinais químicos presentes na interface mãe/filho que é criada pela placenta e que a transdução desses sinais induz respostas em função das necessidades fisiológicas do feto.

Diferentes ORs foram também identificados no córtex cerebral por estudo realizado por Otaki e colaboradores (2003), sugerindo que pequenas moléculas químicas ambientais que circulam no sangue periférico podem atravessar a barreira hemato-encefálica, e ser detetadas localmente pelo encéfalo. Além disso, a presença de ORs no córtex cerebral pode permitir a deteção de químicos produzidos endogenamente na vizinhança.

Com base em todos estes dados pensa-se que a presença de todos os componentes da via da transdução olfativa no intestino permita o reconhecimento de estímulos químicos presentes no lúmen intestinal como moléculas tóxicas e citocinas expressos em situações fisiológicas normais e também de patologia/trauma, induzindo uma resposta celular que permita colmatar as necessidades fisiológicas do organismo. Desta forma, este trabalho experimental foi efetuado com o objetivo de analisar a presença de algumas das proteínas que constituem a via da transdução olfativa no intestino de rato e inferir acerca do possível papel que esta via desempenha neste tecido.

Para caracterizar as proteínas da via transdução olfativa no intestino de rato foram efetuados ensaios de **Western Blotting** de forma a caracterizar o peso molecular das proteínas, e de **Imunohistoquímica**, de forma a determinar a localização destas proteínas de acordo com a morfologia tecidual.

Segundo a literatura, as adenilato ciclases transmembranares das células somáticas possuem pesos moleculares que podem variar entre 120kDa a 200kDa de acordo com modificações pós-tradução que estas proteínas possam sofrer, tais como glicosilações e fosforilações (Baxendale and Fraser, 2003).

Em tecidos não olfativos encontra-se descrito que a proteína AC3 pode ser representada pelas bandas de Western Blotting a 55kDa, 90kDa e 130kDa (Itakura, Ohno *et al.*, 2006; Pluznick, Zou *et al.*, 2009). Por outro lado, no tecido olfativo, a forma glicosilada da AC3 migra segundo um peso molecular entre 180 e 200 kDa (Gautier-Courteille, Salanova *et al.*, 1998). No entanto, se o extrato de epitélio olfativo for tratado com o péptido glicohidrolase N-glicosidase F (PNGase F) a mobilidade da AC3 altera-se de 200kDa para 130kDa, uma vez que a PNGase cliva o resíduo de aspargina ligado aos oligossacarídeos das glicoproteínas levando a AC3 a perder a sua forma glicosilada (Wei, Zhao *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos, neste trabalho, por Western Blotting mostram uma banda com 55 kDa para a AC3 no duodeno de rato, enquanto no EO observam-se duas bandas: uma com 200kDa e outra com 55kDa. Estes resultados mostram que a AC3 é expressa no intestino, apresentando um peso molecular de 55kDa que se encontra descrito na bibliografia, para a forma não-glicosilada.

Relativamente à proteína *Gaolf* encontra-se descrito na literatura que, para tecidos que não o epitélio olfativo, esta pode ser representada por uma banda de 42-45kDa e por uma banda de 77kDa (Itakura, Ohno *et al.*, 2006; Pluznick, Zou *et al.*, 2009).

Neste projeto foram identificadas bandas com cerca de 75kDa, 85kDa e 120kDa para a *Gaolf* do EO de rato, ao passo que para o duodeno foi encontrada uma banda a 63kDa. Uma vez que este resultado não se encontra de acordo com os resultados descritos na literatura, tentou-se avançar uma possível justificação. Pensa-se que os 85kDa, podem corresponder ao peso molecular da conformação nativa da proteína G, incluindo os 42-45kDa da subunidade α , 35kDa da subunidade β e 8-10kDa da subunidade γ (Milligan e Kostenis 2006). Os resultados obtidos sugerem a necessidade de uma otimização em relação à desnaturação eficiente do extrato proteico.

De acordo com a literatura, os *recetores olfativos* apresentam um peso molecular de aproximadamente 30-35kDa. No entanto, é possível, que fora do epitélio olfativo, estas proteínas possam representar-se por bandas com um peso molecular de aproximadamente 69kDa e 95kDa, caso as proteínas se encontrem na forma de dímero ou trímero, respetivamente (Elina NEKRASOVA, *et al.*, 1996).

Inicialmente os western blots dos ORs foram efetuados apenas em EO e DUO de rato. Após observação de bandas de WB para os 5 ORs nestes dois tecidos, decidiu-se fazer o estudo do WB nas diferentes regiões de intestino de rato. Para o OR600, OR620/624 e OR1496 foi possível identificar bandas nas três regiões de intestino delgado, ao passo que para o OR19 e OR63 apenas foram reveladas bandas no duodeno. Assim, é possível concluir que os resultados obtidos para os recetores olfativos vão de encontro ao esperado (Elina NEKRASOVA, *et al.*, 1996), mas os resultados obtidos sugerem a necessidade de uma otimização em relação à desnaturação do extrato proteico de forma a identificar apenas uma banda em todos os

tecidos, especialmente no caso do OR63 que por imunohistoquímica apresentou uma forte expressão nas diferentes regiões do intestino de rato.

Foi ainda efetuada a técnica de **Imunohistoquímica**, que permite comprovar a localização das proteínas da via olfativa no tecido. Os resultados das imunohistoquímicas comprovam a presença da AC3 e Gaolf nos enterócitos das vilosidades e das células caliciformes das diferentes regiões do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de rato.

Efetuaram-se ainda IMQs para detetar e localizar os OR19, OR63, OR600, OR 620/624 e OR1496 no intestino, tendo-se obtido marcação para todos os ORs em estudo nos enterócitos das células caliciformes e vilosidades de duodeno, jejuno, íleo e nos enterócitos das células caliciformes de cólon de rato. Com base nos resultados obtidos, é possível verificar que a expressão dos vários ORs é mais elevada ao nível do duodeno e do jejuno, baixando os níveis de expressão para o íleo e o colon de rato. Uma possível explicação para este fato poderá estar nas funções que as diferentes regiões do intestino desempenham: a digestão e a absorção de nutrientes ocorrem, principalmente, ao longo do intestino delgado, especialmente ao nível do duodeno e do jejuno, ao passo que no intestino grosso apenas ocorre absorção de uma pequena quantidade de água, vitaminas e iões.

Para fazer o **estudo dos ORs ao nível de mRNA**, foram sintetizados primers degenerados já descritos por outros autores (Thomas Braun, *et al.*, 2007), uma vez que estes possuem pequeníssimas diferenças nas suas sequências, pertencendo à maior família génica conhecida. Após PCR com os primers degenerados, foi verificada a presença do mRNA no duodeno de rato por RT-PCR, tendo-se obtido uma da banda de PCR com 525pb, tal como descrito por Braun e seus colaboradores (2007).

Numa segunda fase, foi ainda realizado um processo de clonagem do produto de PCR em pGEM-T Easy, para posterior sequenciação dos fragmentos clonados, que se espera corresponderem aos ORs expressos no duodeno de rato. Para isso, efetuou-se a ligação do produto de PCR purificado ao vetor pGEM-T Easy seguida da transformação de bactérias *E.coli* competentes e de plaqueamento em meio com LB+Amp+IPTG+X-Gal. Após incubação a 37°C verificou-se a existência de colónias azuis (não recombinantes) e colónias brancas (recombinantes). Foram selecionadas colónias brancas e cultivadas em meio líquido LB-broth contendo ampicilina. Após incubação a 37°C overnight, foi realizada a purificação do DNA plasmídico e efetuada a digestão enzimática com *EcoRI*, para verificação da clonagem. No entanto, não foi obtido, em eletroforese, a banda correspondente ao fragmento de interesse. Provavelmente estávamos em presença de falsos positivos. Desta forma, será necessário efetuar otimização do processo de clonagem e sequenciar alguns dos produtos de clonagem, para analisar alguns dos ORs que são expressos no intestino.

Ao nível de mRNA foram também estudados os genes AC3 e Gaolf, por utilização de primers específicos. Contudo não foram obtidos resultados, estando ainda por esclarecer se não existem mRNAs neste tecido ou se será necessário efetuar otimização das condições de PCR.

6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho, em que observamos expressão de componentes da via de sinalização olfativa no intestino, e face aos resultados de outros autores em diversos tecidos, sugerem que a via possa estar associada ao reconhecimento de estímulos químicos presentes no lúmen intestinal. Estes poderão corresponder a moléculas tóxicas e citocinas expressas em situações fisiológicas normais e também de patologia/trauma, que poderão estar associadas à indução de uma resposta celular que permita colmatar as necessidades fisiológicas do organismo.

A via transdução olfativa, ativa nas células de intestino, poderá também ter um papel crucial na deteção de moléculas químicas que circulam no lúmen intestinal, bem como na regulação da motilidade intestinal, funcionando, deste modo como um sistema vigilante e protetor do lúmen intestinal. Contudo os nossos estudos têm ainda de ser finalizados, especialmente no que diz respeito à análise do mRNA, e a relevância desta via de sinalização terá que ser comprovada por estudos funcionais.

Um possível estudo funcional a ser efetuado, poderá passar pela estimulação de culturas primárias de células de intestino, com diferentes moléculas químicas e analisar a resposta medindo por exemplo os níveis de Ca^{2+} intracelular.

Outros estudos passam pelo esclarecimento da expressão de AC3 e $G\alpha_{olf}$ a nível de mRNA no intestino de rato, utilizando primers específicos para estes genes, bem como da possibilidade de existência da via não canónica de transdução olfativa envolvendo os ORs e a fosfolipase C.

Thomas Braun e os seus colaboradores (2007) verificaram que o aumento dos níveis de cálcio induzido pela ligação de moléculas de odores a alguns ORs (OR73, hOR17-7/11, OR1G1, and hOR17-210) identificados nas células EC intestinais depende do influxo de cálcio e não do cálcio armazenado nas células. Este resultado sugere que os componentes envolvidos na transdução olfativa são os ORs, a PLC, os recetores para o IP_3 e os canais de cálcio do tipo L (Thomas Braun *et al.*, 2007). O envolvimento da PLC, dos recetores para o IP_3 e dos canais de cálcio do tipo L na cascata de transdução olfativa foi também observado nos neurónios sensoriais olfativos (Liu G. *et al.*, 2006; Thomas Braun *et al.*, 2007) o que nos faz pensar que existe a possibilidade de as duas vias de sinalização (via canónica e não canónica) estarem presentes no intestino.

Para o estudo da via olfativa a nível de mRNA, perspectiva-se, ainda, efetuar a metodologia de PCR em tempo real para ORs utilizando sondas Taqman comerciais altamente específicas, uma vez que os ORs pertencem a uma família génica que codifica cerca de 1000 genes, que partilham grande homologia entre si.

Num futuro próximo, e de forma a consolidar o estudo da via de transdução de sinal olfativa no intestino, pretende-se analisar a expressão do canal nucleotídico cíclico no intestino de rato, envolvido na ação de cAMP da transdução olfativa, um segundo mensageiro importante na ativação de vias de sinalização celular.

7. BIBLIOGRAFIA

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

Brinda C. Prasad *et al*, (1999). "Chemosensation in worms and mammals" TIG 15(4): 150-153

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

Elina NEKRASOVA, *et al.*, (1996). "Overexpression, solubilization and purification of rat and human olfactory receptors." Eur. J. Biochem. **238**: 28-37

Ferrufino Juan C. *et al*, (1996). "Histología normal del intestino delgado". Rev Med Hered **7**:46-57.

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

Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson. "Principles of Anatomy and Physiology"; 12th edition, 2009.

Gonçalves, C. e Bairos, V., Histologia, IU, 2009.

Hadley and Dahl, (1982). "Cytochrome P-450 dependent monooxygenase activity in rat nasal epithelial membranes". Toxicol Lett **10**:417-422.

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

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

Joerg Fleischer, Heinz Breer, Joerg Strotmann (2009). "Mammalian Olfactory Receptors". Frontiers in Cellular Neuroscience Vol3 (9): 1-10.

L. Dryer e A. Berghard (1999). "Odorant receptors: a plethora of G-protein-coupled receptors". TiPs **20**: 413-417

Liu G, Badeau RM, Tanimura A, Talamo BR (2006). "Odorant receptors directly activate phospholipase C/inositol-1,4,5-trisphosphate coupled to calcium influx in Odora cells". J Neurochem **96**: 1591-1605.

M. Ennis. K. A. Hamilton, A. Hayar. "Neurochemistry of the Main Olfactory System"; 139-182 (2007).

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

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

Mezei, L. M. and D. R. Storts (1994). "Purification of PCR products. In: PCR technology: current innovations, Griffin, H.J. and Griffin, A.M., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 21.

Michael T. Shipley, *et al.*, (2008). "The Olfactory System". Neuroscience in Medicine 611-622.

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

NaNa Kang e JaeHyung Koo, (2012). "Olfactory receptors in non-chemosensory tissues". BMB Reports 612-622.

Nathalie Ferrand *et al.*, (1999). "Olfactory Receptors, Gαolf and Adenylyl Cyclase mRNA Expressions in the Rat Heart During Ontogenic Development. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 31: 1137-1142.

Noe J. and Breer H. (1998). "Functional and molecular characterization of individual olfactory neurons". J. Neurochem. 71: 2286-2293

O. Matsuzaki, *et al.*, (1999). "Localization of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel subunit 1 in normal, embryonic and regenerating olfactory epithelium". Neuroscience 94: 131-140

Otaki *et al.*, (2003). "Odorant receptor expression in the mouse cerebral cortex". Journal of Neurobiology 58(3): 315-327.

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

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

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

Sambrook, J. and D. W. Russell; Molecular cloning, a laboratory manual; 3rd edition, 3vols, Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA, 2001.

Stuart Firestein (2001). "How the olfactory system makes sense of scents". Nature Vol43: 211-218.

Schmutz G., *et al.*, (2005). "Anatomie et imagerie du duodenum: Duodenum imaging: anatomical and radiological features." EMC-Radiologie 2: 256-271

Thomas Braun, *et al.*, (2007). "Enterochromaffin Cells of the Human Gut: Sensors for Spices and Odorants". Gastroenterology 132: 1890-1901.

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

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

Videira, A; "Engenharia Genética, princípios e aplicações"; 1ªed., Lidel, Lisboa, 2001.

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

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

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

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