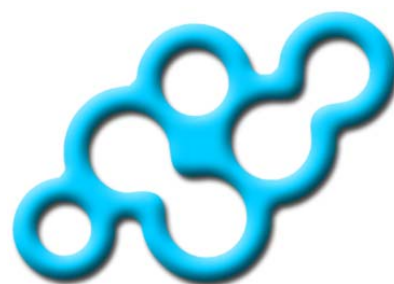




**Universidade da Beira Interior**



**Centro de Investigação em  
Ciências da Saúde**

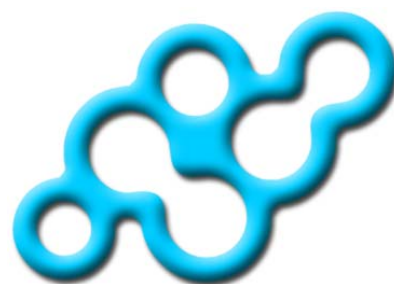
# **Biosíntese de androgénios no Plexo Coróide: O papel da 5 $\alpha$ -Reductase**

**Ângela Patrícia Rosa Rodrigues**

Covilhã 2009



**Universidade da Beira Interior**



**Centro de Investigação em  
Ciências da Saúde**

# **Biosíntese de androgénios no Plexo Coróide: O papel da 5 $\alpha$ -Reductase**

**Orientador**

Professora Doutora Sílvia Cristina da Cruz Marques Socorro

**Co-orientador**

Professor Doutor José Eduardo Brites Cavaco

*Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior  
para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.*

*O conteúdo desta dissertação é da exclusiva  
responsabilidade da autora*

---

*(Ângela Patrícia Rosa Rodrigues)*

## Agradecimentos

---

É de enaltecer, que a realização deste trabalho só foi possível, em parte, pelo apoio, pela motivação, incentivo dado no decorrer do mesmo e pela colaboração desinteressada de várias pessoas amigas. Assim, gostaria de expressar os sinceros agradecimentos e reconhecimento, a todos aqueles que, quer de uma forma directa, quer de uma forma indirecta, contribuíram para a realização deste documento. Desses destaque:

A Professora Doutora Sílvia Cristina da Cruz Marques Socorro, pela orientação científica durante a realização deste trabalho, pelo apoio, motivação e disponibilidade demonstrados.

O Professor Doutor José Eduardo Brites Cavaco, por todo o apoio e motivação transmitidos ao longo do ano.

Os meus Pais, pelo carinho, compreensão e por todas as oportunidades concedidas para o sucesso de toda a minha formação.

A minha avó que sempre velou por mim, e que sei que continua e continuará a fazê-lo.

A minha irmã pela preocupação constante e apoio transmitidos, por tudo.

A Sara Correia, pela ajuda nos diversos trabalhos experimentais e o Carlos Gaspar e Portinha, os “informáticos”, pela ajuda prestada sempre que precisei, mas acima de tudo e simplesmente por serem meus amigos.

A Sandra Laurentino pela análise dos dados do Real-time PCR e a Elsa Couto pela ajuda prestada na Cromatografia.

A enzima 5 $\alpha$ -reductase (5 $\alpha$ -R) metaboliza a testosterona (T) a um androgénio activo, a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), em tecidos periféricos incluindo diversas regiões do cérebro. Recentemente o nosso grupo de investigação demonstrou a presença do mRNA da 5 $\alpha$ -reductase no plexo coróide (CP) de rato. O plexo coróide é responsável pela produção do fluido cerebrospinal e também apresenta capacidades neuroprotectoras. Durante o processo de envelhecimento, o CP apresenta um declínio em todos os aspectos da sua função, o que pode aumentar o risco de doenças neurodegenerativas. A presença da 5 $\alpha$ -R no CP sugere que a produção de androgénios pode ocorrer localmente neste órgão. Contudo, não há estudos que caracterizem a actividade da 5 $\alpha$ -R ou que identifiquem os factores que regulam a sua expressão no CP. Com o objectivo de começar a clarificar estas questões, foram delineados os seguintes objectivos: i) confirmar a presença da proteína 5 $\alpha$ -R no CP; ii) estudar a expressão da 5 $\alpha$ -R durante o envelhecimento; iii) demonstrar a bioactividade da 5 $\alpha$ -R no CP. As análises por Imunohistoquímica e Western Blot confirmaram a presença da proteína 5 $\alpha$ -R no CP de rato. Foram removidos CPs de ratos macho e fêmea com diferentes idades (3, 6, 9 e 12 meses), extraiu-se o RNA total usado posteriormente para síntese de cDNA. Por RT-PCR analisou-se a expressão da 5 $\alpha$ -R no CP de ratos durante o envelhecimento. Os resultados obtidos demonstraram que a expressão da 5 $\alpha$ -R é regulada positivamente aos 9 e 12 meses de idade em ratos macho ( $P < 0,005$ ), o que pode estar associado com a redução de produção de testosterona observada em animais destas idades<sup>1</sup>. A fim de obter informação sobre a actividade da 5 $\alpha$ -R, foram realizadas culturas *ex vivo* de CP com [3H]-T, monitorizando a sua conversão em [3H]-DHT por cromatografia em camada fina. O tecido de CP não apresenta uma conversão significativa de [3H]-T a [3H]-DHT, no entanto os resultados não foram conclusivos. Estudos futuros deverão ser realizados de modo a confirmar a actividade da 5 $\alpha$ -R no CP.

1. Zirkin et. al (1997). Leydig cell steroidogenesis in aging rats. *Exp. Gerontol.* **32** (4-5):529-37.

**Palavras chave:** 5 $\alpha$ -reductase, androgénio, plexo coróide, envelhecimento

The enzyme 5 $\alpha$ -reductase (5 $\alpha$ -R) metabolizes testosterone (T) to an active androgen, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT), in peripheral tissues, including several brain regions. Recently our research group demonstrated the presence of 5 $\alpha$ -R mRNA in rat choroid plexus (CP). CP is responsible for the production of cerebrospinal fluid and also displays neuroprotective capabilities. During the aging process the CP shows a decline in all aspects of its function, which may increase the risk for development of neurodegenerative diseases. The presence of 5 $\alpha$ -R in CP suggests that androgens production may occur locally in this organ. However, there are no studies directed to the characterization of 5 $\alpha$ -R activity or to the identification of factors that regulate its expression in CP. In order to start clarifying these issues the following objectives were delineated: i) to confirm the presence of 5 $\alpha$ -R protein in rat CP; ii) to study the expression of 5 $\alpha$ -R during aging; iii) to demonstrate the bioactivity of 5 $\alpha$ -R in CP. Immunohistochemistry and Western blot analysis confirmed the presence of 5 $\alpha$ -R protein in rat CP. CPs were removed from male and female rats at different postnatal ages (3, 6, 9 and 12 month-old), total RNA was extracted and used for cDNA synthesis. Real-time PCR was used to analyze the expression of 5 $\alpha$ -R in rat CP during aging. The obtained results demonstrated that 5 $\alpha$ -R expression is up-regulated in 9 and 12 month-old male rats ( $P<0,005$ ), which may be associated with the reduced testosterone production observed in animals of these ages<sup>1</sup>. In order to obtain information on the 5 $\alpha$ -R activity, we have performed *ex vivo* cultures of CP and monitored by thin layer chromatography the conversion of [3H]-T into [3H]-DHT. The CP tissue displayed no significant conversion of [3H]-T to [3H]-DHT, although results are not conclusive. Further work is necessary to confirm the activity of 5 $\alpha$ -R in CP.

1. Zirkin et. al (1997). Leydig cell steroidogenesis in aging rats. *Exp. Gerontol.* 32 (4-5):529-37.

**Keywords:** 5 $\alpha$ -reductase, androgen, choroid plexus, aging

## Lista de abreviaturas

---

- 5 $\alpha$ -R** - 5 alpha Reductase
- 5 $\alpha$ -DHT** - 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona
- A $\beta$**  - péptido  $\beta$  amilóide
- AD** - doença de Alzheimer
- AF-1** - Unidade de activação 1
- AR** - receptor de androgénios
- bp** - pares de bases
- cDNA** - DNA complementar
- CECs** - células epiteliais coroidais
- CNS** - sistema nervoso central
- CP** - plexo Coróide
- ARE** - elementos específicos de resposta a androgénios
- ATP** - trifosfato de adenosina
- BSA** - albumina sérica bovina
- DAB** - diaminobenzidina
- DBD** - domínio central de ligação ao DNA
- DEPC** - dietilpirocarbonato
- DHT** - dihidrotestosterona
- HRE** - elementos de resposta à hormona
- IHC** - imunohistoquímica
- LBD** - domínio de ligação ao ligando
- LCR** - líquido cefalorraquidiano
- LH** - hormona luteinizante
- RNases** - ribonucleases
- RNA<sub>t</sub>** - RNA total
- T** - testosterona
- TTR** - transtirretina

## Índice de figuras

---

<b>Figura I.1.</b> Esquema representativo da localização do plexo coróide, no sistema nervoso central e barreira sangue-líquido cefalorraquidiano .....	1
<b>Figura I.2.</b> Aspecto histológico do plexo coróide .....	2
<b>Figura I.3.</b> Via enzimática da biosíntese de androgénios em tecidos periféricos .....	6
<b>Figura I.4.</b> Estrutura do receptor de androgénios, AR .....	7
<b>Figura I.5.</b> Modelo clássico do mecanismo de actuação das hormonas esteróides .....	8
<b>Figura III.1.</b> Exemplo do preenchimento dos poços da placa de cultura, com os tecidos dos seis ratos utilizados, numerados de 1 a 6 .....	23
<b>Figura IV.1</b> - IHC de secções de CP de rato usando o anticorpo anti 5 $\alpha$ -R 1 .....	25
<b>Figura IV.2</b> - Detecção da proteína 5 $\alpha$ -reductase tipo 1 no CP de rato por Western blot .....	26
<b>Figura IV.3.</b> Expressão da 5 $\alpha$ -R tipo 1 no CP de ratos macho durante o envelhecimento (3, 6, 9 e 12 meses) determinada por Real-time PCR .....	27
<b>Figura IV.4.</b> Expressão da 5 $\alpha$ -R tipo 1 no CP de ratos fêmea durante o envelhecimento (3, 6, 9 e 12 meses) determinada por Real-time PCR .....	27
<b>Figura IV.5.</b> Cromatograma correspondente à actividade da 5 $\alpha$ -R numa das amostras de próstata (controlo positivo) .....	28
<b>Figura IV.6.</b> Cromatograma correspondente à actividade da 5 $\alpha$ -R numa das amostras de fígado (controlo positivo) .....	29
<b>Figura IV.7.</b> Cromatograma correspondente à actividade da 5 $\alpha$ -R numa das amostras de plexo coróide .....	29

<b>Tabela III.1.</b> Reagentes e volumes presentes na <i>Mix</i> utilizada para a síntese de cDNA .....	17
<b>Tabela III.2.</b> Características dos <i>primers</i> específicos para a 5 $\alpha$ -R 1, usados na reacção de PCR: sequência, tamanho do fragmento amplificado e condições da reacção de PCR .....	17
<b>Tabela III.3.</b> Reagentes necessários para a preparação dos géis de electroforese para separação de proteínas e posterior análise por Western Blot .....	19
<b>Tabela III.4.</b> Sequência dos <i>primers</i> específicos para a 5 $\alpha$ -R, $\beta$ -actina e GAPDH e condições usadas nas reacções de Real-time PCR .....	21
<b>Tabela III.5.</b> Constituintes da reacção geral de Real-time PCR .....	22

Agradecimentos.....	I
Resumo .....	II
Abstract .....	III
Lista de abreviaturas .....	IV
Índice de figuras .....	V
Índice de tabelas.....	VI
Índice .....	VII
I. Introdução .....	1
1. Caracterização anatomo-funcional do plexo coróide .....	1
1.1. Organização estrutural do Plexo Coróide .....	1
1.2. Função do plexo coróide .....	2
1.2.1. Produção de LCR.....	2
1.2.2. Alterações do LCR ao longo do processo de envelhecimento .....	3
1.2.3. Produção de proteínas .....	4
1.3. Androgénios e Plexo Coróide .....	5
1.3.1. Síntese de Androgénios.....	5
1.3.2. Mecanismo de actuação dos androgénios.....	6
1.3.3. O papel dos androgénios no SNC/CP .....	8
2. 5 $\alpha$ -reductase no SNC.....	10
2.1. Caracterização estrutural do gene/proteína da 5 $\alpha$ -Reductase .....	10
2.2. Distribuição da 5 $\alpha$ -Reductase nos tecidos.....	11
2.3. Funções da 5 $\alpha$ -Reductase .....	11
2.4. Regulação da expressão da 5 $\alpha$ -Reductase.....	13
II. Objectivos .....	14

III. Material e métodos .....	15
1. Animais.....	15
2. Extração de RNAt.....	15
3. Síntese de cDNA .....	16
4. Reacção em cadeia da polimerase.....	17
5. Western Blot .....	18
6. Imunohistoquímica .....	19
7. Real-time PCR.....	20
8. Cultura <i>ex vivo</i> de Plexo Coróide .....	22
9. Extração de metabolitos.....	23
10. Cromatografia em camada fina (TLC) .....	23
IV. Resultados .....	25
1. Expressão da proteína 5 $\alpha$ -reductase no Plexo Coróide.....	25
2. Expressão da 5 $\alpha$ -reductase no Plexo Coróide durante o envelhecimento ..	26
3. Bioactividade da 5 $\alpha$ -R no CP .....	28
V. Discussão .....	30
VI. Conclusão e perspectivas futuras.....	32
VII. Referências Bibliográficas .....	33

# Introdução

---

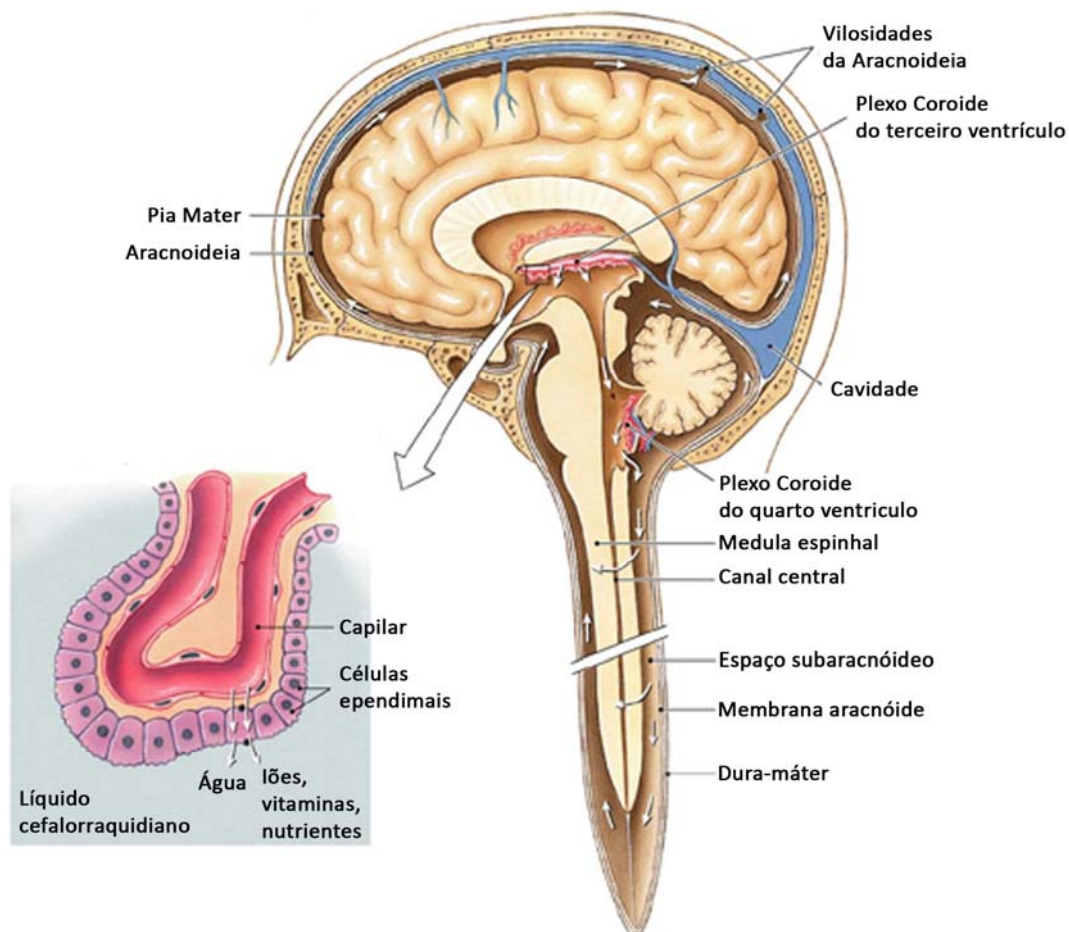


## I. Introdução

### 1. Caracterização anatomo-funcional do plexo coróide

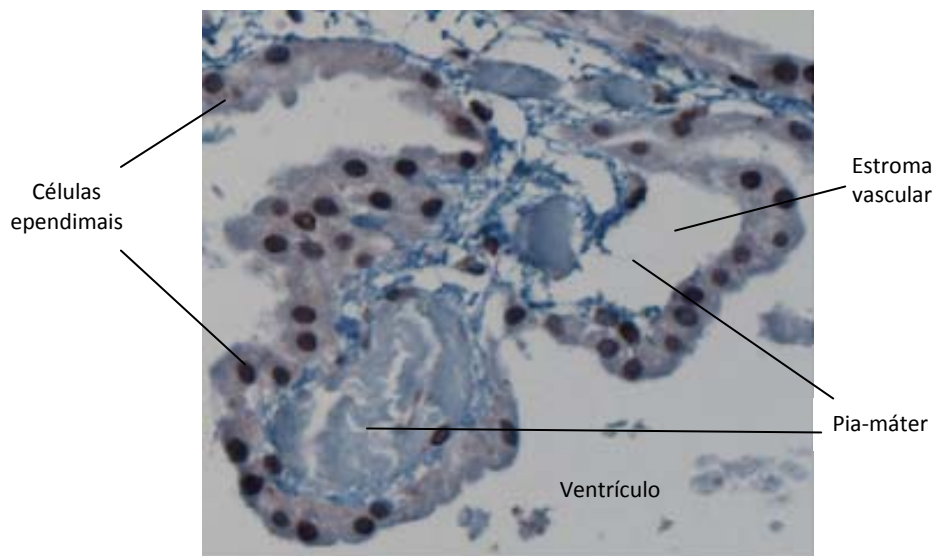
#### 1.1. Organização estrutural do Plexo Coróide

Os plexos coróides (CPs) estão localizados em todo o sistema ventricular do cérebro e formam extensões de células epiteliais cobrindo a superfície ventricular (Figura I.1, Strazielle e Gherzi-Egea, 2000 e Emerich *et al.*, 2005).



**Figura I.1.** Esquema representativo da localização do plexo coróide, no sistema nervoso central e barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (adaptado de <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/image/09-5.jpg>).

Os CPs são estruturas ramificadas altamente vascularizadas com uma camada de células epiteliais secretoras projectando numerosas vilosidades nos quatro ventriculos do cérebro (Davson e Segal, 1996). Todos os plexos consistem numa monocamada externa de células epiteliais coroidais (CECs), as quais são originárias de células do epitélio e estão unidas por tecido conjuntivo. A membrana apical das CECs está em contacto com o líquido cefalorraquidiano (LCR), e a membrana basolateral localiza-se sob a lâmina basal e mais internamente sob o estroma de tecido conjuntivo composto por uma rede de fibras de colagénio que incorpora grandes capilares fenestrados e as células leptomeningiais especializadas (Thouvenot *et al.*, 2006).



**Figura I.2.** Aspecto histológico do plexo coróide (adaptado de Altura *et al.*, 2003).

## 1.2. Função do plexo coróide

### 1.2.1. Produção de LCR

Os CPs estão envolvidos em várias funções do sistema nervoso central (CNS) devido á sua arquitectura única e localização na interface entre o sangue e compartimentos de LCR (Strazielle e Gherzi-Egea, 2000 e Emerich *et al.* 2005).

O tecido conjuntivo do epitélio coróide fornece uma base anatômica à barreira sangue-LCR que constitui a barreira sangue-cérebro ao nível do plexo coróide (CP). O CP é também o local de maior produção de LCR, secretando cerca de dois terços do

volume total deste fluido fisiológico. Além disso, os CPs desempenham um papel essencial na depuração de catabolitos neurotransmissores e produtos celulares de LCR. A localização dos CPs facilita também a distribuição de moléculas para o cérebro, tanto a nível local como global, através do fluxo de massa de LCR. Isto inclui nutrientes como vitamina C, ácido fólico e vitamina B12 que são secretados no LCR por mecanismos específicos de transporte (Thouvenot *et al.*, 2006).

### **1.2.2. Alterações do LCR ao longo do processo de envelhecimento**

Parece que o normal envelhecimento do CP afecta o seu metabolismo, uma vez que um estudo em ratos revelou que a actividade da K-ATPase foi significativamente mais alta nos homogeneizados de CPs de ratos adultos jovens (6-8 meses) comparado com os mais velhos (26-28 meses) (Kvitnitskaia-Ryzhov e Shkapenko, 1992). Mais recentemente a expressão do mRNA da K-ATPase pareceu diminuir no CP de ratos mais velhos (Masseguin *et al.*, 2005), juntamente com a expressão do mRNA e proteína da aquaporina. Estas alterações são susceptíveis de afectar a taxa de secreção de LCR, uma vez que depende da translocação de água e iões. No entanto, a medição da taxa de secreção de LCR total em seres humanos tem produzido resultados conflituosos. May *et al.* (1990) demonstraram que houve uma redução significativa na secreção de LCR num grupo de indivíduos saudáveis entre os 67-84 anos, quando comparados aos de 21-36 anos de idade. Por outro lado, Gideon *et al.* (1994), utilizando técnicas mais sofisticadas de MRI, mediram a produção supratentorial de LCR in vivo, esta é quase idêntica em jovens e idosos saudáveis com taxas de produção entre 900-1000 mL por 24 h. Isto é contraditório aos achados de Stoquart-EISankari *et al.* (2007), que utilizaram sequências de pulso MRI com sensibilidade de contraste aqueductal e cervical, e revelaram volumes de LCR significativamente reduzidos no grupo de idosos. No entanto, não estava claro se isto se reflectia na função do CP, ou se foi uma consequência da atenuação do fluxo sanguíneo cerebral relacionado com a idade (Stoquart-EISankari *et al.*, 2007). Estudos que mediam os níveis de proteínas do LCR revelaram um aumento de proteínas provenientes do plasma (Reiber, 2003) em idosos saudáveis. Estes dados sugerem que o processo normal de envelhecimento pode levar a alterações numa série de funções do CP (Chen *et al.*, 2009).

### 1.2.3. Produção de proteínas

Muitos polipeptídeos e/ou proteínas com localização extracelular conhecida são também sintetizados pelas CECs e libertados por uma via secretora vesicular. Isto inclui o transporte de várias proteínas tais como a transtirretina (TTR), o maior transportador da hormona tiróide. No cérebro, a TTR é sintetizada exclusivamente pelo epitélio do CP e representa mais de 20% das novas proteínas sintetizadas e 50% das novas proteínas secretadas por este órgão. A produção da TTR no CP é essencial para a transferência da hormona da tiróide do sangue para o cérebro, e para a manutenção da homeostase da mesma (Chodobski e Szmydynger-Chodobska, 2001).

O epitélio do CP é também o maior local de produção de transferrina no cérebro. A transferrina sintetizada pelas CECs liga-se ao ferro intracelularmente e é posteriormente libertada no LCR (Tsutsumi *et al.*, 1989). A síntese e secreção de transferrina pelas CECs é regulada positivamente pela serotonina através da via de activação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, no entanto o aumento do cAMP intracelular prejudica a produção da transferrina (Esterle e Sanders-Bush, 1992).

O epitélio do CP também secreta um número de factores de crescimento importantes para o crescimento da célula, orientação dos axónios e migração dos neurónios. Por exemplo, os CPs são a principal fonte de IGF-II e IGFBP-2 no CNS (Chodobski e Szmydynger-Chodobska, 2001). O IGF-II produzido pelos CPs no desenvolvimento do cérebro liga-se aos receptores de IGF localizados nas células e contribui para a orientação e crescimento do axónio da medula espinhal. Da mesma forma, a proteína Slit2, identificada como uma das proteínas libertadas pelos CPs, actua como um factor químicorepulsivo que guia a migração dos neurónios corticais da superfície ventricular. Além disso, mudanças no padrão de secreção proteica do CP ocorrem em condições patológicas. Com efeito, o aumento da regulação transitória da secreção de IGF-II no LCR foi observado na fase aguda da lesão cerebral, resultando num aumento do transporte de péptidos neurotróficos, ligados ao IGFBP-2, para a área lesada, enquanto o local de síntese do IGF-II ocorre principalmente nos locais lesados numa fase posterior (Walter *et al.*, 1999).

Em conjunto, estes exemplos mostram a importância das proteínas derivadas do CP no desenvolvimento e fisiologia do cérebro assim como nos distúrbios do CNS (Thouvenot *et al.*, 2006).

### **1.3. Androgénios e Plexo Coróide**

#### **1.3.1. Síntese de Androgénios**

Todas as hormonas esteróides derivam do colesterol que é fornecido pelo sangue, como lipoproteínas de baixa e alta densidade. Uma pequena percentagem de colesterol também pode ser produzida directamente nas células esteroidogénicas a partir do acetato.

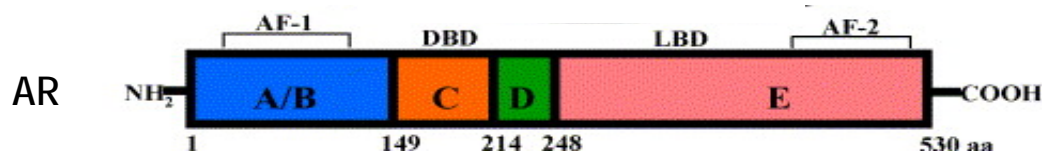
As reacções bioquímicas responsáveis pela síntese de esteróides são controladas por diferentes famílias de enzimas incluindo hidroxilases (desmolases), oxidoreductases (desidrogenases), sulfotransferases (sulfocinases), e sulfúriltransferases. A clonagem molecular de enzimas responsáveis pela síntese de hormonas esteróides revelou para algumas destas enzimas, a existência de múltiplas isoformas que são diferencialmente expressas em tecidos esteroidogénicos (Miller, 1988). Também foi demonstrado que vários órgãos periféricos, como o aparelho digestivo, o fígado e a próstata, podem expressar a um baixo nível vários genes que codificam enzimas esteroidogénicas, sugerindo que a produção de esteróides bioactivos não se restringe a glândulas endócrinas esteroidogénicas (Miller, 1988 e Penning, 1997).

Os androgénios, são os principais esteróides sexuais masculinos, sintetizados em grande parte, pelos testículos e, em menor medida, pelas glândulas adrenais (Figura 1.3). Estes esteróides são os factores críticos responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo masculino durante a embriogénese, e para a realização da maturação sexual na puberdade. Na idade adulta, os androgénios permanecem essenciais para a manutenção da função reprodutiva masculina e comportamento sexual.

Além dos seus efeitos sobre a reprodução, os androgénios afectam uma grande variedade de tecidos como a pele, ossos, músculos, sangue e tecido adiposo (Hannelore *et al.*, 2006). Os androgénios afectam o crescimento e desenvolvimento de uma ampla variedade de tipos de células, em ambos os sexos, masculino e feminino. A



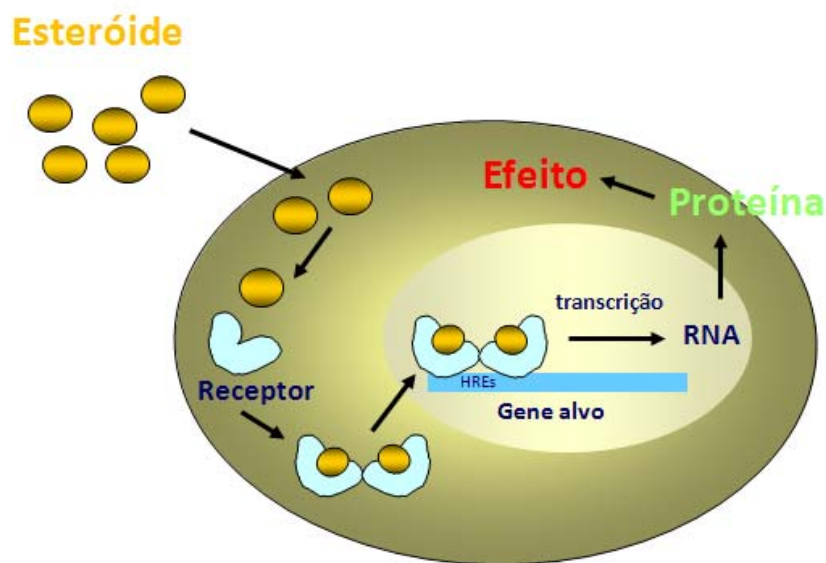
receptores a sequências de DNA específicas na região promotora dos genes alvo, os elementos de resposta à hormona (HRE). A região D é a região que separa o DBD e o domínio de ligação ao ligando, LBD. A flexibilidade na estrutura secundária desta região permite mudanças conformacionais na molécula do receptor durante a activação, e é importante para a dimerização do receptor (Pearce *et al.*, 2003). O C-terminal dos receptores engloba o domínio de ligação ao ligando (LBD ou domínio E), o qual possui a propriedade essencial de reconhecimento da hormona e assegura a especificidade e selectividade da resposta fisiológica (Mangelsdorf *et al.*, 1995).



**Figura I.4.** Estrutura do receptor de androgénios, AR. As caixas coloridas representam os diferentes domínios: região N-terminal (A/B), região DBD (C) conservada, região “hinge” variável (D), um LBD (E) conservado. Estão também assinaladas as unidades de activação da transcrição, AF-1 e AF-2 (adaptado de Lewis *et al.*, 2005).

Os androgénios agem como ligandos e são capazes de ligar e activar o AR. A ligação do ligando ao AR resulta em mudanças conformacionais, dissociação de proteínas, fosforilação, homodimerização, e subsequentes interacções com elementos específicos de resposta a androgénios (ARE) na região promotora dos genes alvo (Figura I.5). A actividade transcricional está dependente da libertação de repressores e do recrutamento de co-activadores (Holzbeierlein *et al.*, 2004). A regulação da transcrição exige a participação de pelo menos três classes de proteínas: proteínas que reconhecem sequências específicas de DNA, proteínas que são recrutadas para promotores de interacções proteína-proteína e agem como co-ativadores ou co-repressores da transcrição, e proteínas que alteram a arquitectura da cromatina. Para iniciar a transcrição, a sequência nucleotídica e factores específicos, como o AR, têm de comunicar com os componentes do complexo de transcrição basal (Janne *et al.*, 2000). Outro factor envolvido é a medição das vias de transdução do sinal que também podem influenciar a sinalização de androgénios. Estas interacções e complexos de multi-subunidades poderão vir a ser responsáveis pela diversidade de regulação pelos

androgénios e especificidade do contexto celular das células (Holzbeierlein *et al.*, 2004). A modulação da transcrição, dependente do ligando, pelo complexo receptor-ligando, foi denominada genómica e é sensível a inibidores da transcrição e tradução. Em contraste à acção esteróide genómica, os efeitos não genómicos são caracterizados, principalmente, pela sua insensibilidade a inibidores da transcrição e da síntese proteica (Falkenstein *et al.*, 2000), bem como pelos seus efeitos mais rápidos (apectos revisto por (Michels e Hoppe, 2008).



**Figura 1.5.** Modelo clássico do mecanismo de actuação das hormonas esteróides. HREs - elementos de resposta à hormona, sequência específica de DNA reconhecida pelo receptor (Adaptado de Socorro, S., 2001).

### 1.3.3. O papel dos androgénios no SNC/CP

Perdas de memória a longo prazo são características do envelhecimento humano e podem assinalar doenças neurodegenerativas iminentes. A manutenção de elementos neurais no sistema nervoso cerebral que suportam a memória, tais como a formação de sinapses no córtex pré-frontal e hipocampo, são importantes para a saúde cognitiva no envelhecimento (Janowsky, 2005).

Os androgénios têm sido reconhecidos como neuroprotectores ou neuromoduladores no envelhecimento, sendo importantes para a manutenção de

sistemas importantes para a memória. A privação de androgénios provoca uma perda significativa de sinapses no hipocampo, em roedores e primatas, aumenta a deposição amilóide em modelos humanos e roedores e provoca mudanças da neurotransmissão no córtex pré-frontal em modelos de roedores (Janowsky, 2005).

Trabalhos recentes sugerem que estas alterações modificam perdas cognitivas relacionadas com a idade, particularmente na memória dos homens. Além disso, a conversão da testosterona nos seus metabolitos androgénicos pode desempenhar um papel importante na preservação da memória no envelhecimento (Janowsky, 2005).

Os androgénios reduzem a acumulação do péptido  $\beta$  amilóide ( $A\beta$ ), podendo contribuir para um efeito neuroprotector, promovendo a viabilidade dos neurónios, sendo importantes no tratamento de doenças onde a neurodegeneração é predominante, como a doença de Alzheimer (AD), Parkinson ou epilepsia (Pike *et al.*, 2007 e Wojtal *et al.*, 2006).

Os níveis de TTR e de  $A\beta$  no LCR parecem estar inversamente correlacionados com o aparecimento e progressão da doença de Alzheimer. A privação de androgénios aumenta os níveis plasmáticos de  $A\beta$ , o que indica que os androgénios podem reduzir os níveis de  $A\beta$  solúvel, o péptido é amplamente implicado no início da AD, no entanto, os mecanismos subjacentes são ainda pouco compreendidos. Recentemente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a  $5\alpha$ -DHT aumenta os níveis de TTR em CECs e no CP de ratos castrados (Quintela *et al.*, 2008).

Muitas observações sugerem a importância dos esteróides neuroactivos no controlo de diversas funções no sistema nervoso. Em particular, foi demonstrado que o sistema nervoso é capaz de sintetizar hormonas esteróides e possui a capacidade de converter diversos esteróides em metabolitos neuroactivos (Celotti *et al.*, 1992). Estes metabolitos podem ocasionalmente ser mais eficazes que os seus precursores, ou podem ter actividades biológicas totalmente diferentes (Melcangi *et al.*, 2001).

Os neuroesteróides participam em importantes funções biológicas no cérebro, durante a embriogénese e fase adulta, tais como a mielinização, organogénese, memória, neuroprotecção, entre outras (Mellon e Griffin, 2002). O termo "neuroesteróide", não faz referência a uma determinada classe química de esteróides, indica apenas que o seu local de síntese e acção é no SNC (Pinna *et al.*, 2008).

Embora a síntese de neuroesteróides esteja demonstrada noutras regiões do cérebro (Mensah-Nyagan *et al.*, 1999), no CP não existem dados sobre a sua capacidade esteroidogénica. Os androgénios regulam a expressão de péptidos neuroprotectores em vários tecidos em que o AR é expresso, incluindo o cérebro. Estudos recentes mostram que o CP é um tecido responsivo a androgénios. Foi descrito que células epiteliais de CP contêm mRNA e proteína do AR. Além disso, foi demonstrado que o AR é regulado negativamente pela DHT no CP de rato (Alves *et al.*, 2009), o que reforça a importância dos androgénios na fisiologia deste órgão.

## **2. 5 $\alpha$ -reductase no SNC**

### **2.1. Caracterização estrutural do gene/proteína da 5 $\alpha$ -Reductase**

A enzima 5 $\alpha$ -R é uma proteína microsomal dependente de NADPH, catalisa a transferência de dois hidrogénios do NADPH, causando a redução da ligação dupla C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> e formação de metabolitos da 5 $\alpha$ -R (Mensah-Nyagan *et al.*, 1999).

As duas isoenzimas da 5 $\alpha$ -reductase possuem diferente localização cromossomal, diferentes parâmetros de cinética enzimática e diferente padrão de expressão nos tecidos (Occhiato *et al.*, 2004). Até à data, duas isoenzimas 5 $\alpha$ -R foram clonadas e caracterizadas em humanos e ratos. Estas isoenzimas são codificadas por genes independentes sendo designadas isoformas tipo 1 e tipo 2 (Jin e Penning, 2001).

Nos humanos o gene da 5 $\alpha$ -R tipo 1 está localizado no cromossoma 5, é composto por cinco exões e quatro intrões e produz uma proteína de 259 aminoácidos, com em peso molecular de aproximadamente 29,5 kDa. O gene da 5 $\alpha$ -R tipo 2 está localizado no cromossoma 2, tem uma estrutura similar, mas as proteínas resultantes são compostas por 254 aminoácidos, com um peso molecular de aproximadamente 28,4 kDa (Thigpen e Russell, 1992 e Yuan-Shan *et al.*, 2008). As duas isoformas possuem 50% de homologia na composição dos aminoácidos (Yuan-Shan *et al.*, 2008) e têm diferente pH óptimo: a isoforma tipo 1 é activa a um pH entre 5 e 8, enquanto a isoforma tipo 2 possui um pH óptimo por volta de 5, com uma baixa actividade a pH 7,5. As duas isoenzimas também demonstram uma sensibilidade

diferencial em relação a inibidores sintéticos, como a finasterida (Thigpen e Russell, 1992). A 5 $\alpha$ -R tipo 1 é mais sensível a este composto devido aos quatro aminoácidos presentes no segmento amino terminal, o qual pode formar uma porção de domínio de ligação do substrato (Thigpen e Russell, 1992). Ambas as isoformas são hidrofóbicas, e possuem preferências de substrato semelhantes. O substrato mais importante, a testosterona, tem uma alta afinidade para a isoenzima tipo 2 ( $K_m$ = 4-50 nM) enquanto a afinidade para a 5 $\alpha$ -R tipo 1 é relativamente baixa ( $K_m$ =1-5  $\mu$ M) (Occhiato *et al.*, 2004).

## 2.2. Distribuição da 5 $\alpha$ -Reductase nos tecidos

Ao nascimento, a 5 $\alpha$ -redutase tipo 1 é detectada no fígado e na pele não genital, e está presente ao longo da vida. A sua expressão nos tecidos embrionários, porém, é bastante baixa. Na idade adulta, é expressa na pele não genital, fígado e certas regiões cerebrais; contudo a sua presença na próstata, pele genital, epidídimo, vesículas seminais, testículos, adrenais e rim é reduzida (El-Awady *et al.*, 2004). Recentemente foi identificada a presença do mRNA da 5 $\alpha$ -R tipo 1 no CP de rato (Rocha, 2008).

A 5 $\alpha$ -R tipo 2 é expressa em tecidos genitais externos no início da gestação (Thigpen *et al.*, 1993). Na idade adulta, a sua expressão na próstata, pele genital, epidídimo, vesículas seminais e fígado é relativamente elevada, embora seja muito baixa noutros tecidos. Esta isoenzima também parece estar expressa no ovário e folículos pilosos (Eicheler *et al.*, 1995).

## 2.3. Funções da 5 $\alpha$ -Reductase

A enzima 5 $\alpha$ -R tem um importante papel fisiológico na conversão da testosterona nos seus derivados bioactivos como a 5 $\alpha$ -DHT em tecidos responsivos a androgénios (Ito *et al.*, 2002). Assim, mutações no AR e na 5 $\alpha$ -R podem afectar o desenvolvimento sexual masculino. A 5 $\alpha$ -R é também crucial para sobrevivência fetal e parto em ratos. Inibidores da 5 $\alpha$ -redutase são cada vez mais utilizados para o tratamento de alguns distúrbios derivados da acção dos androgénios.

Diversos estudos indicam que a 5 $\alpha$ -R se encontra presente no SNC (Poletti *et al.*, 1998b). Esta enzima foi identificada no córtex, gânglios basais, hipotálamo, tálamo, cerebelo, medula espinhal, pituitária, espinha dorsal e sistema nervoso periférico (Mellon e Griffin, 2002). A 5 $\alpha$ -DHT é o androgénio com maior afinidade de ligação ao AR, sendo a principal responsável pelos efeitos provocados nos órgãos alvo. Esta hormona parece exercer papéis organizacionais específicos em populações neuronais e deste modo, está possivelmente envolvida no processo de diferenciação sexual de algumas regiões do cérebro (Occhiato *et al.*, 2004 e Poletti *et al.*, 1998b).

Todas as influências da 5 $\alpha$ -R cerebral dependem da disponibilidade e abundância de substratos, da quantidade e localização dos sistemas enzimáticos de conversão e dos produtos esteróides formados (Lephart *et al.*, 2001). A importância fisiológica da 5 $\alpha$ -R no cérebro pode resultar de duas das suas propriedades: a sua capacidade de converter a testosterona no androgénio mais potente, a 5 $\alpha$ -DHT, e sua capacidade de converter progesterona e desoxicorticosterona (DOC) nos respectivos derivados da 5 $\alpha$ -R, precursores da alopregnanolona e tetrahydroDOC, potentes modeladores alostéricos do receptor ácido  $\gamma$ -aminobutírico, (GABA<sub>A</sub>-R) (Mellon e Griffin 2002) que participa na regulação de diversos fenómenos psicossomáticos (Patte-Mensah *et al.*, 2005).

A enzima 5 $\alpha$ -R existe em duas isoformas, 5 $\alpha$ -R tipo 1 e 5 $\alpha$ -R tipo 2, ambas estão presentes no cérebro e aparentam desempenhar diferentes papéis fisiológicos e regular distintos processos cerebrais. A espécie de mRNA predominante no cérebro de rato é a 5 $\alpha$ -R tipo 1, a qual tem sido proposta como uma enzima constitutiva que desempenha essencialmente um papel catabólico e neuroprotector. A 5 $\alpha$ -R tipo 2 participa em funções de dimorfismo sexual do sexo masculino, como no desenvolvimento da próstata, de órgãos genitais externos e na diferenciação do SNC (Poletti *et al.*, 1998b).

A 5 $\alpha$ -R, parece então, ser uma enzima chave reguladora que controla várias funções distintas no cérebro, e que, em cooperação com outros sistemas enzimáticos, pode contribuir para o catabolismo de esteróides potencialmente neurotóxicos (por exemplo, os glucocorticóides, que, quando presentes em excesso, podem induzir processos apoptóticos em determinadas populações neuronais do hipocampo) (Sapolsky *et al.*, 1988 e Behl *et al.*, 1997).

## 2.4. Regulação da expressão da 5 $\alpha$ -Reductase

A 5 $\alpha$ -R tipo 1 é expressa ao longo da vida e não aparenta ser controlada por androgénios. Estes acontecimentos não suportam os últimos relatos de que a abundância do mRNA da 5 $\alpha$ -R em rato, estava sob controlo de esteroides sexuais como testosterona, e estradiol em animais após o nascimento. Pelo contrário a 5 $\alpha$ -R tipo 2, cujas funções estão inicialmente directamente relacionadas com acontecimentos ontogenéticos relacionados com o desenvolvimento sexual e parece ser regulada por androgénios, pelo menos nos machos (El-Awady *et al.*, 2004).

Recentemente, foi demonstrado que as isoenzimas 5 $\alpha$ -R são reguladas no SNC de machos de uma maneira adversa por androgénios, sugerindo que as isoenzimas podem desempenhar um papel no dimorfismo sexual do SNC, além de outras funções (Torres e Ortega, 2006).

# Objetivos

---



## II. Objectivos

O CP está envolvido em várias funções do SNC devido á sua arquitectura única e localização na interface sangue-LCR. A principal função do CP é a produção do LCR, e muitos polipeptídeos e/ou proteínas com funções de neuroprotecção são também sintetizados pelas células epiteliais coróides. Actualmente, sabe-se que os androgénios regulam a expressão de algumas destas moléculas. Para além disso, tem sido indicada a ocorrência de síntese de androgénios em diferentes regiões do SNC. No entanto, a possibilidade da biossíntese de androgénios no CP ainda não foi determinada. Num trabalho anterior do grupo de investigação, demonstrou-se a presença do mRNA da 5 $\alpha$ -R no CP, sugerindo que a produção de androgénios pode ocorrer localmente neste tecido. Com o intuito de caracterizar a actividade da 5 $\alpha$ -R e identificar os factores que regulam a sua expressão no CP delinearam-se os seguintes objectivos: i) confirmar a presença da proteína 5 $\alpha$ -R no CP; ii) estudar a expressão da 5 $\alpha$ -R durante o envelhecimento; iii) demonstrar a bioactividade da 5 $\alpha$ -R no CP.

# Material e Métodos

---



### III. Material e métodos

#### 1. Animais

Neste trabalho foram usados ratos (*Rattus Norvegicus*) machos e fêmeas da estirpe Wistar com diferentes idades: 2, 3, 6, 9 e 12 meses. Os animais foram mantidos sob fotoperíodo natural, sendo-lhes fornecido água e alimentos *ad libitum*.

Os animais foram anestesiados com uma mistura injectável de 8,75 mL de cetamina (Clorketam 1000; Vetoquinol, França) com 1,25mL de xilazina, (Vetoxilase 20, Dopharma, Portugal) via peritonial (100 µL/100 g) e sacrificados por decapitação. De seguida recolheram-se os CPs e também amostras de fígado e próstata, para serem incluídas como controlos positivos nalguns dos protocolos experimentais.

Todos os procedimentos de manutenção, manuseamento e amostragem obedeceram ao estabelecido pelas regras da União Europeia para o cuidado e manutenção de animais de laboratório (Directiva 86/609/EEC).

Os tecidos destinados à extracção de RNA e proteína foram congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C até posterior utilização.

As amostras para Imunohistoquímica (IHC) foram fixadas em PFA 4%/PBS 1X ou formol, para posteriormente, se proceder ao processamento histológico e à montagem de lâminas.

#### 2. Extracção de RNAt

A extracção do RNA total (RNAt) foi efectuada utilizando o TRI reagent™ (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Os tecidos foram homogeneizados em 500µL de TRI, utilizando-se para o efeito um homogeneizador Ultra-Turrax T25 basic (IKA). Após a homogeneização do tecido, incubaram-se as amostras à temperatura ambiente durante 5 minutos e procedeu-se a uma extracção orgânica, pela adição de 200 µL de Clorofórmio (Sigma). Agitou-se vigorosamente durante 15 segundos e incubou-se à temperatura ambiente durante 15 minutos. A

mistura foi centrifugada a 4°C a 12000g durante 15 minutos, com a finalidade de se obter uma fase aquosa que contém o RNA. Esta fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual se adicionou 250 µL de Isopropanol (Ameresco), incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 4°C a 12000g durante 10 minutos.

Obteve-se, então, o RNAt sob a forma de um precipitado branco, que foi lavado duas vezes por adição de 500 µL de etanol a 75%. Após se deixar secar os *pellets* ao ar, durante cerca de 5 a 10 minutos, rehidrataram-se, em 50µL água tratada com dietilpicrocarbonato (DEPC, água DEPC, anexo) (Sigma, EUA) e armazenaram-se a -80°C.

De forma a determinar a qualidade e a concentração do RNAt extraído efectuaram-se leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech). Através do ratio das absorvâncias a 260 e 280nm é possível determinar a qualidade do RNAt extraído, o qual deverá estar compreendido entre 1.7 e 2.0.

A integridade do RNAt extraído foi ainda verificada através de electroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio.

Para assegurar a pureza do RNAt, reduzindo ao máximo a actividade das Ribonucleases (RNases) em todos os passos da extracção foi usado material estéril, e todas as soluções foram preparadas com água DEPC.

### **3. Síntese de cDNA**

O cDNA (DNA complementar) é um DNA sintético, resultante da transcrição reversa do mRNA, por acção da enzima transcriptase reversa, ficando-se assim com uma cópia exacta do gene sem intrões. A enzima usada para a transcrição reversa das amostras no presente trabalho foi a iScript reverse transcriptase (BIO-RAD).

Para a síntese de cDNA preparou-se a mistura (*Mix*) descrita na tabela III.1. Preparam-se as misturas com volumes de reagentes para n+1 reacções. Ao volume apropriado de RNAt (1 µg) adicionou-se 7 µL da *Mix* e água livre de nucleases até um volume total de 20 µL. Incubaram-se as amostras a 25°C durante 5 minutos, seguindo-se uma incubação a 42°C durante 30 minutos. Inactivou-se a reacção através do aquecimento das amostras a 85°C durante 5 minutos. Guardou-se o cDNA a -20°C.

**Tabela III.1.** Reagentes e volumes presentes na *Mix* utilizada para a síntese de cDNA

	Reagente	Volume ( $\mu\text{L}$ ) para cada Reacção
Mix	5x iScript select reaction mix(Bio-Rad)	4
	Random Primers(Bio-Rad)	2
	iScript reverse transcriptase (Bio-Rad)	1

#### 4. Reacção em cadeia da polimerase

A expressão da 5 $\alpha$ -R tipo 1 no CP de rato foi analisada através da técnica de RT-PCR. Para tal, as reacções decorreram num volume total de 24  $\mu\text{L}$  contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão *Vi Buffer A 10x* (Vivantis), 0,25  $\mu\text{L}$  de mistura de dNTPs (10 mM, Amersham), 0,75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM, Vivantis), 0,25  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (tabela III.2) e 0.2  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA Polimerase 5 U/ $\mu\text{L}$  (Vivantis). A esta mistura foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de cDNA. A amplificação ocorreu num termociclador (Px2 Thermo Hybaid, RU). Paralelamente, amplificou-se também o 18S como controlo interno. O número de ciclos e a temperatura de emparelhamento dos *primers* foram otimizados, estando as condições usadas na tabela III.2.

Os produtos amplificados por PCR foram visualizados por electroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio usando o software Molecular Imager FX Pro Plus Multilmager (Biorad, Hercules, USA) acoplado ao sistema de aquisição de imagem Vilber Lourmat.

**Tabela III.2.** Características dos *primers* específicos para a 5 $\alpha$ -R 1, usados na reacção de PCR: sequência, tamanho do fragmento amplificado e condições da reacção de PCR.

Primers	Sequência	Fragmento	Ciclo PCR
5 $\alpha$ -R 1 (rato)	"foward" 5'-TGCTCGACATGCTGGTCTAC-3'	194bp	95°C: 1min 94°C: 30 seg 52°C: 30 seg 72°C: 20 seg 72°C: 5 min
	"reverse" 5'-GGCTGCAGGACGAATGTACT-3'		
		} 45x	

## 5. Western Blot

A técnica de Western Blot é aplicada a proteínas e baseia-se na separação das proteínas em gel, as quais são transferidas do gel para uma membrana e posteriormente detectadas com processos apropriados.

Procedeu-se à extracção de proteína de CP e fígado de rato com três e dois meses respectivamente, através de homogeneização em tampão de extracção (20 µL para uma pool de 10 CPs e 2 mL por grama de tecido de fígado) contendo 0,1 M de Tris (Riedel-de-Haen), 10 mM de EDTA (Sigma) e 0,05 mM de PMSF (Sigma). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 4000g durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recolhido e centrifugado, novamente, a 10000g durante 15 minutos (CP) e 5 minutos (fígado) a 4°C. A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford utilizando como padrão a albumina sérica bovina (BSA, Sigma).

A composição dos géis de electroforese, o gel de resolução e o gel de concentração está indicada na tabela III.3.

As amostras de proteína foram desnaturadas a 100°C durante 5 minutos e de seguida foram aplicadas no gel. Adicionou-se também um marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards (BIO-RAD)) e deixou-se correr a 120 V durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, as membranas de PVDF (Hybond-P, Amersham) foram cortadas à medida (6x9 cm) e activadas sequencialmente em metanol durante 5 segundos, água durante 5 minutos e solução de electrotransferência (10 mM CAPS em metanol 10%, pH 11) durante 5 a 15 minutos. Posteriormente, retirou-se o gel do sistema de electroforese, removeu-se o gel de concentração e colocou-se em tampão de electrotransferência durante 5 segundos. Colocou-se o papel de filtro, o gel e a membrana na sanduiche e efectuou-se a electrotransferência a 4°C e 750 mA durante 30 minutos. Após a electrotransferência, retirou-se a membrana do sistema e procedeu-se ao seu bloqueio com TBS (ver anexo) contendo Tween 20 (Applichem, Darmstadt, Germany, TBS-T) e 5% leite (Regilait, France) durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação constante. De seguida, incubou-se a membrana com o anticorpo primário anti 5α-R 1 de rato produzido em cabra (SC-203999, Santa Cruz Biothecnology), diluído

1:200 em TBS- T durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação constante e lavou-se 3x10 minutos com TBS-T. Depois, incubou-se a membrana com o anticorpo secundário (conjugado com fosfatase alcalina) anti IgG de cabra produzido em burro (SC-2022, Santa Cruz Biothecnology), diluído de 1:20000 em TBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação constante e lavou-se novamente 3x10 minutos com TBS-T.

A revelação foi realizada com o substrato ECF (*Western Blotting Reagent Packs*, Amersham), colocando para isso cerca de 300 µl do mesmo por membrana sobre um plástico e incubando no máximo durante 5 minutos, tendo o cuidado de colocar o lado que contém as proteínas em contacto directo com o reagente. A fluorescência foi detectada no sistema *Molecular Imager FX Pro Plus Multimager* (Biorad).

**Tabela III.3.** Reagentes necessários para a preparação dos géis de electroforese para separação de proteínas e posterior análise por Western Blot

Gel de Resolução	Gel de Concentração
4,15 mL acrilamida (40%)	1,75 mL acrilamida (40%)
3,75 mL Tris-HCl 1.875M pH 8.8	1,25 mL Tris-HCl 1.25M pH 6.8
1,8 mL Água	6,9 mL Água
0,1 mL SDS 10%	1,0 mL SDS 10%
125 µL Persulfato de amónia (PSA)	250 µL Persulfato de amónia (PSA)
7,5 µL TEMED	7,5 µL TEMED

## 6. Imunohistoquímica

A técnica de IHC localiza proteínas em secções de tecido. Foram utilizadas lâminas de CP de ratos de 6 meses de idade, previamente fixados em formol.

As lâminas foram mergulhadas, sequencialmente, em: xileno 2x5 minutos; etanol a 100% 2x3 minutos; etanol a 95% durante 3 minutos; etanol a 80% durante 3 minutos e água destilada durante 30 segundos. Após se retirar o excesso de água, as lâminas foram colocadas em solução de citrato (10mM) a uma temperatura constante entre

80-85°C, durante 30 minutos. Seguidamente deixa-se arrefecer as lâminas à temperatura ambiente e colocam-se em água durante 5 minutos em agitação. Cada secção foi incubada com 100 µL de peróxido de hidrogénio a 3%, durante 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida lavadas num banho de PBS 1X.

As secções foram incubadas com soro de burro 1,5%/PBS 1X (ver anexo) durante uma hora, e fez-se uma nova lavagem durante 10 minutos em PBS. De seguida, incubaram-se com 100 µL de anticorpo primário anti 5α-R 1 de rato produzido em cabra (sc-203999, Santa Cruz Biothecnology), diluído de 1:50 e 1:100 em solução de PBS 1X com BSA 1%, overnight a 4°C. As lâminas foram, então, lavadas com PBS 1X num banho com agitação durante 2 minutos. Seguiu-se a incubação de todas as lâminas com 100 µL de anticorpo secundário anti IgG de cabra feito em burro (sc-2042, Santa Cruz Biothecnology), biotinilado, diluído de 1:200 em solução de PBS 1X com BSA 1%, durante 30 minutos à temperatura ambiente e nova lavagem com PBS 1X num banho com agitação durante 2 minutos. A detecção foi efectuada com o kit Extravidin-Peroxidase (Sigma). Em cada secção foram colocados 100 µL de Extravidin-Peroxidase (diluição 1:20 em PBS 1X com BSA 1%, ver anexo) e efectuou-se uma incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de serem lavadas com PBS 1X, a solução de diaminobenzidina (DAB, ver anexo) foi colocada em cada secção até ao desenvolvimento de marcação.

As lâminas foram coradas com hematoxilina durante 10 segundos e lavadas em água corrente. Seguidamente foram desidratadas, montadas, observadas ao microscópio e fotografadas.

O controlo negativo foi obtido através da omissão do anticorpo primário.

## **7. Real-time PCR**

A análise da expressão da 5α-R no CP de rato durante o envelhecimento foi realizada por Real-time PCR. A técnica de Real-time PCR permite o acompanhamento da reacção e a apresentação dos resultados de forma mais rápida e precisa em relação ao RT-PCR convencional que apresenta resultados apenas qualitativos. Os primers utilizados foram optimizados em termos de temperatura e concentração antes de se

proceder às reacções de análise de expressão (tabela III.4). A expressão da 5 $\alpha$ -R foi normalizada utilizando 2 *housekeeping genes*, nomeadamente, a  $\beta$ -actina e o Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH).

As reacções foram preparadas num volume final de 20  $\mu$ l tal como indicado na tabela III.5. Após a distribuição das amostras pelos poços da placa, a reacção teve lugar no termociclador (*iCycler iQ<sup>TM</sup> system*, Biorad) com um software que permite a aquisição dos dados e a análise final da reacção.

Para se determinar o nível de expressão da 5 $\alpha$ -R comparativamente aos *housekeepings* os dados obtidos foram analisados pelo método proposto por Vandesompele (Vandesompele *et al.*, 2002), em que a expressão de um gene é determinada através de um factor de normalização, o qual é a média geométrica dos dois *housekeepings* utilizados. O tratamento estatístico utilizado, foi One Way ANOVA, seguido pelo teste T de Bonferroni, com  $p < 0,05$ .

**Tabela III.4.** Sequência dos *primers* específicos para a 5 $\alpha$ -R,  $\beta$ -actina e GAPDH e condições usadas nas reacções de Real-time PCR

<i>Primers</i>	Sequência	Ciclo
r5 $\alpha$ -R 1 FW r5 $\alpha$ -R 1 RV	FW:5'-TACACACTGCTGGAGAGG-3' RV:5'- CACAATGGACACGAAGGC-3'	94°C: 30 s } 72°C: 10 s } 40x 60°C: 30 s }
r $\beta$ -actina FW r $\beta$ -actina RV	FW:5'-ATGGTGGGTATGGGTCAG-3' RV:5'-CAATGCCGTGTTCAATGG -3'	94°C: 30 s } 72°C: 10 s } 40x 60°C: 30 s }
rGAPDH FW rGAPDH RV	FW:5'-GTTCAACGGCACAGTCAAG-3' RV:5'-CTCAGCACCAGCATCACC-3'	94°C: 30 s } 72°C: 10 s } 40x 60°C: 30 s }

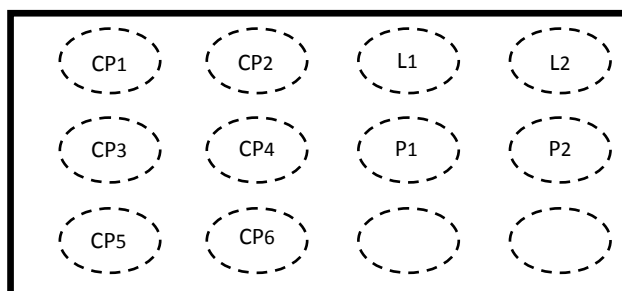
**Tabela III.5.** Constituintes da reacção geral de Real-time PCR.

Mistura reaccional	( $\mu$ l)
<i>Syber green</i> (BIO-RAD)	10
Primer FW	0,8
Primer RV	0,8
cDNA	1
Água estéril	7,4

## 8. Cultura *ex vivo* de Plexo Coróide

Os CPs de seis ratos com três meses de idade (2/poço), e também a próstata (fragmentos de 2mm<sup>3</sup>) e o fígado (fragmentos de 2 mm<sup>3</sup>), para utilização como controlo positivo, foram distribuídos em caixas de cultura, tal como indicado na Figura III.1. Utilizaram-se caixas de 12 poços (Nunclon™ Delta Surface, Nunc™, Dinamarca), com 500 $\mu$ L ou 2 mL de meio DMEM F-12 a 37°C, respectivamente para as amostras de CP, e de próstata e fígado.

Posteriormente as amostras foram incubadas com os mesmos volumes de meio, ao qual foi adicionado 1  $\mu$ L de testosterona tritiada ([3H]-T, 9,25MBq). A incubação realizou-se durante 6 horas a 37°C com uma atmosfera de 5%CO<sub>2</sub>/95%Ar numa incubadora (NUAIRE™ DHD AutoFlow CO<sub>2</sub> Air-Jacketed Incubator, Labocontrolo, Lisboa). A incubação é finalizada com a remoção do meio de cultura para um tubo de ensaio, onde são adicionados 5mL de diclorometano e 2mL de água estéril. As amostras são guardadas a -20°C para posterior extracção de esteróides e análise cromatográfica.



**Figura III.1.** Exemplo do preenchimento dos poços da placa de cultura, com os tecidos dos seis ratos utilizados, numerados de 1 a 6. CP- Plexo coróide, L – Fígado, P - Próstata.

## 9. Extracção de metabolitos

Agitou-se durante 5 minutos todo o conteúdo dos tubos de ensaio resultantes da experiência de cultura *ex vivo* de CP, contendo meio de cultura, 5mL de diclorometano e 2mL de água estéril. Procedeu-se à centrifugação de todos os tubos durante cerca de 2 minutos à temperatura ambiente, com a finalidade de obter uma fase aquosa inferior onde se encontram os metabolitos em diclorometano, tendo sido desprezado o sobrenadante, correspondente ao meio utilizado.

## 10. Cromatografia em camada fina (TLC)

Foram colocados 10µL do padrão T em cada tubo de ensaio e colocaram-se a 40-42°C com azoto líquido durante aproximadamente 20 minutos. Adicionaram-se a cada uma das amostras 1 mL de diclorometano e retiraram-se 500µL para novos tubos. A tina de cromatografia foi preparada com 49.5:0.5 (clorofórmio:metanol). Na placa de cromatografia (Whatman, LK6DF Silica Gel 60A) foram carregados 15µl dos padrões (5α-T e 5β-T (Sigma)). À amostra evaporada adicionou-se um total de 70 µL de clorofórmico (Sigma), agitou-se vigorosamente durante 15 segundos e carregou-se na placa. Procedeu-se à corrida em cromatografia de camada fina, que no caso dos controlos positivos ocorreu durante 1 hora, no caso das amostras extraídas dos plexos coróides ocorreu durante 1h30m. A testosterona foi revelada na luz UV e os padrões

revelaram-se com spray de cromatografia (Zimmerman reagent). Seguidamente a placa de cromatografia foi revelada no scanner Bioscan (System 200 Imaging Scanner).

# Resultados

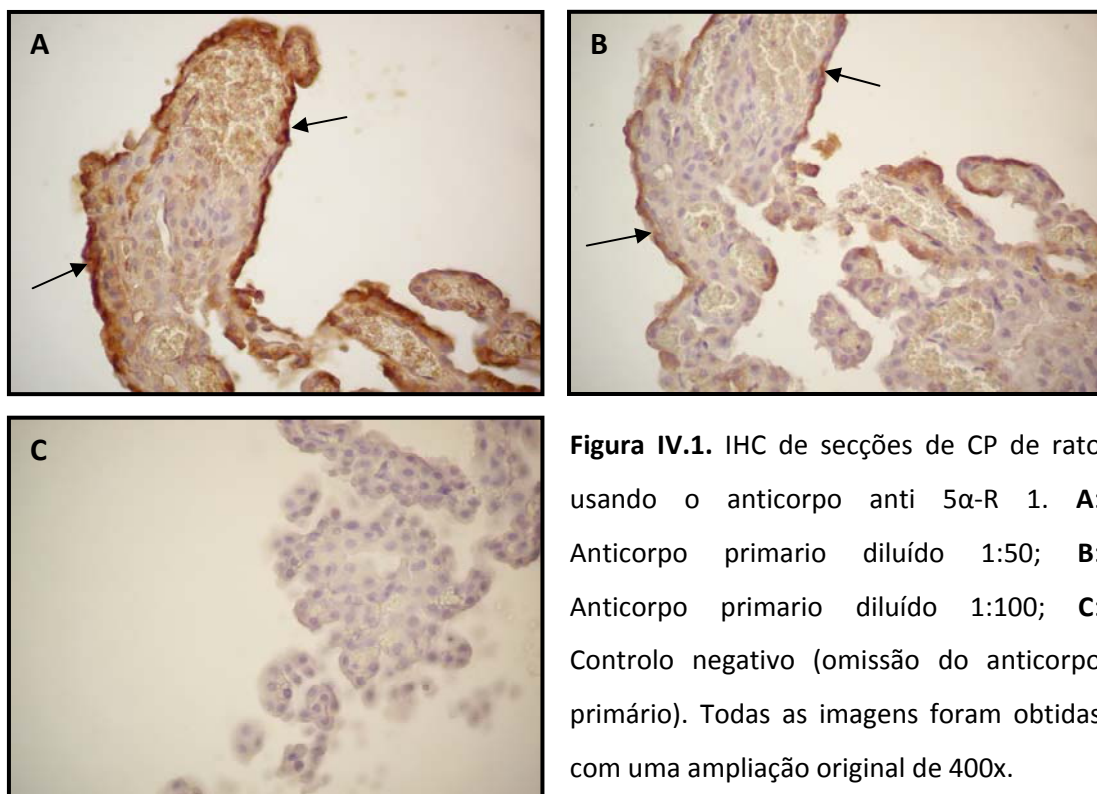
---



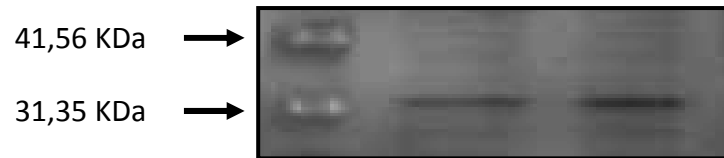
## IV. Resultados

### 1. Expressão da proteína 5 $\alpha$ -reductase no Plexo Coróide

A técnica de IHC permitiu identificar a presença da proteína 5 $\alpha$ -R no CP de rato. As secções incubadas com o anticorpo primário anti 5 $\alpha$ -R 1 (1:50, figura IV.1.A e 1:100, figura IV.1.B), apresentam uma coloração castanha, indicando a localização da proteína nas células epiteliais. Na secção onde se omitiu o anticorpo primário (controlo negativo), não se verificou qualquer marcação (figura IV.1.C).



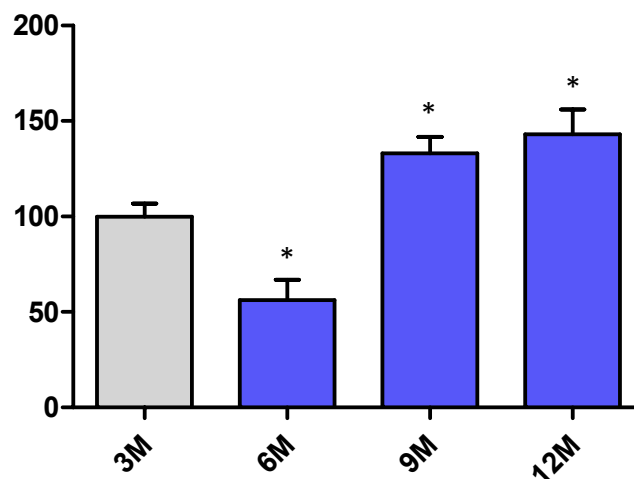
Na figura IV.2 está representado o resultado da análise efectuada por Western Blot. É possível identificar a banda correspondente á proteína 5 $\alpha$ -R tipo 1 com aproximadamente 31 Kda no CP de ratos macho e fêmea.



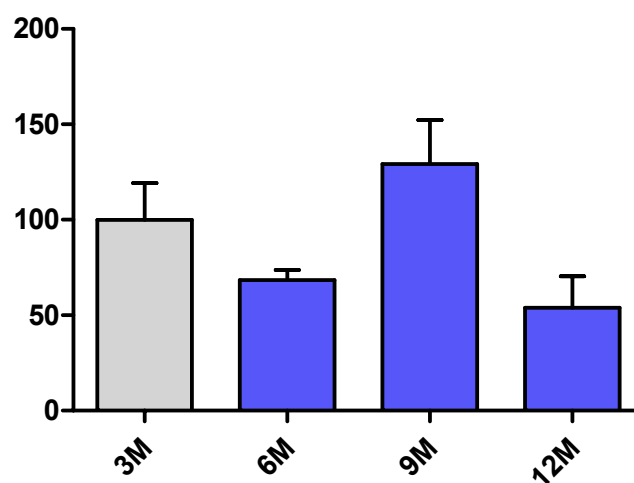
**Figura IV.2.** Detecção da proteína 5 $\alpha$ -reductase tipo 1 no CP de rato por Western blot. **M**- marcador de peso molecular Kaleidoscope Prestained Standards; **CP $\text{\textcircled{M}}$** - CP de rato macho; **CP $\text{\textcircled{F}}$** - CP de rato fêmea. Utilizaram-se para anticorpo primário anti 5 $\alpha$ -R 1 (1:200) e anticorpo secundário anti 5 $\alpha$ -R 1 (1:20 000). A revelação foi realizada com o substrato ECF e a fluorescência detectada no sistema *Molecular Imager FX Pro Plus Multimager*.

## 2. Expressão da 5 $\alpha$ -reductase no Plexo Coróide durante o envelhecimento

A análise da expressão da 5 $\alpha$ -R tipo 1 no CP de ratos macho e fêmea durante o envelhecimento foi realizada por Real-time PCR (figura IV.3 e IV.4), sendo a sua expressão normalizada através de dois housekeeping genes, nomeadamente,  $\beta$ -actina e GAPDH. Aos 9 e 12 meses de idade, verifica-se para os machos um aumento da expressão da 5 $\alpha$ -R tipo 1 ao longo do processo de envelhecimento, apresentando valores significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) do grupo controlo de 3 meses (expressão = 1). Para as fêmeas não se obteve valores significativamente diferentes do grupo controlo, verificando-se no entanto um comportamento semelhante ao dos machos aos 6 e 9 meses de idade.



**Figura IV.3.** Expressão da 5 $\alpha$ -R tipo 1 no CP de ratos macho durante o envelhecimento (3, 6, 9 e 12 meses) determinada por Real-time PCR. O grupo de 3 meses foi utilizado como grupo controle, considerando-se a expressão igual a 1. \*- Significativamente diferente relativamente ao grupo de 3 meses ( $P < 0,05$ ).

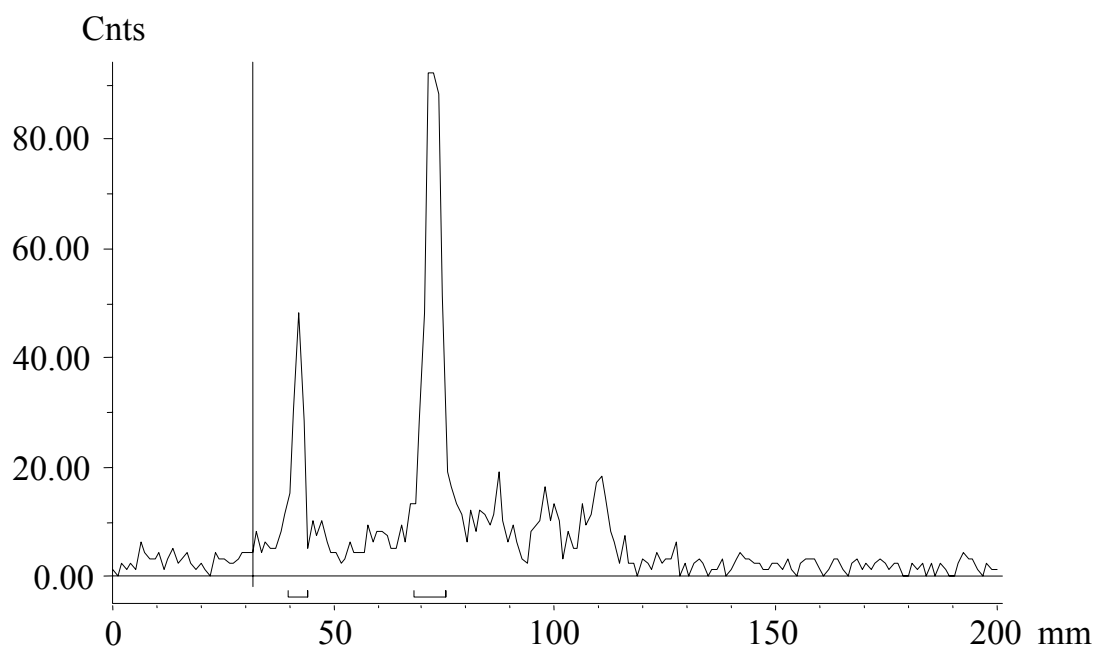


**Figura IV.4.** Expressão da 5 $\alpha$ -R tipo 1 no CP de ratos fêmea durante o envelhecimento (3, 6, 9 e 12 meses) determinada por Real-time PCR. O grupo de 3 meses foi utilizado como grupo controle, considerando-se a expressão igual a 1.

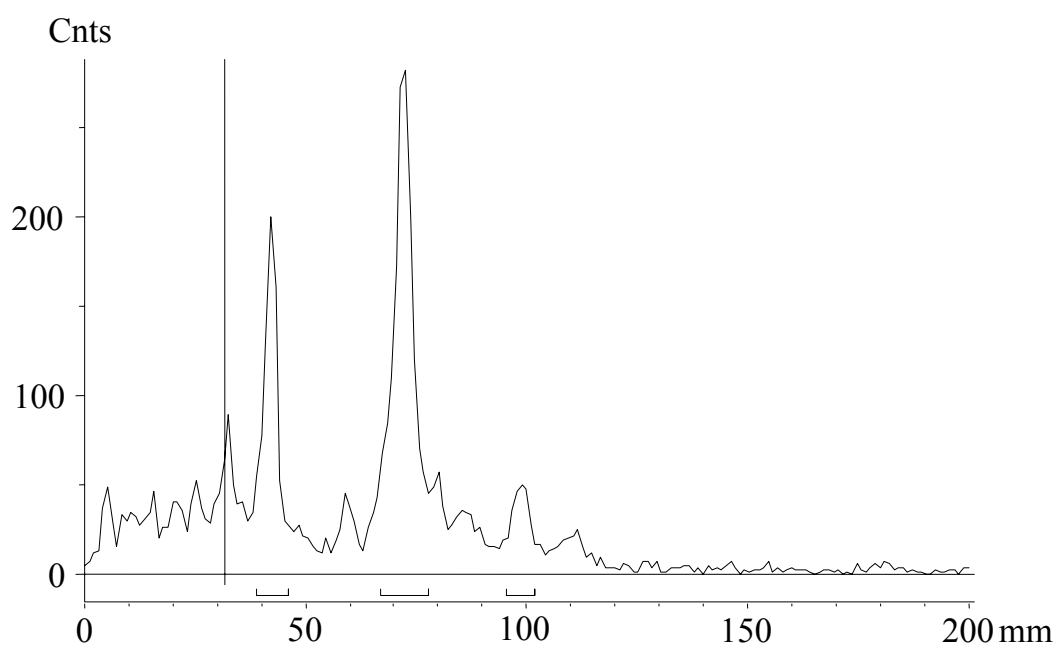
### 3. Bioactividade da 5 $\alpha$ -R no CP

Para caracterizar a actividade da 5 $\alpha$ -R no CP de ratos, realizaram-se culturas *ex vivo* com [3H]-T, monitorizando a sua conversão em [3H]-DHT por cromatografia em camada fina. Foram utilizados para todas as amostras os padrões 5 $\alpha$ -T e 5 $\beta$ -T. Para os controlos positivos, próstata e fígado (Figura IV.5 e Figura IV.6) respectivamente, verifica-se a presença de um pico entre os 70-75 mm, correspondente à testosterona, observa-se também um pico menos saliente entre os 40-45mm podendo corresponder a um metabolito da testosterona com mais um oxigénio, existindo também indícios de pequena produção de 5 $\alpha$ -DHT.

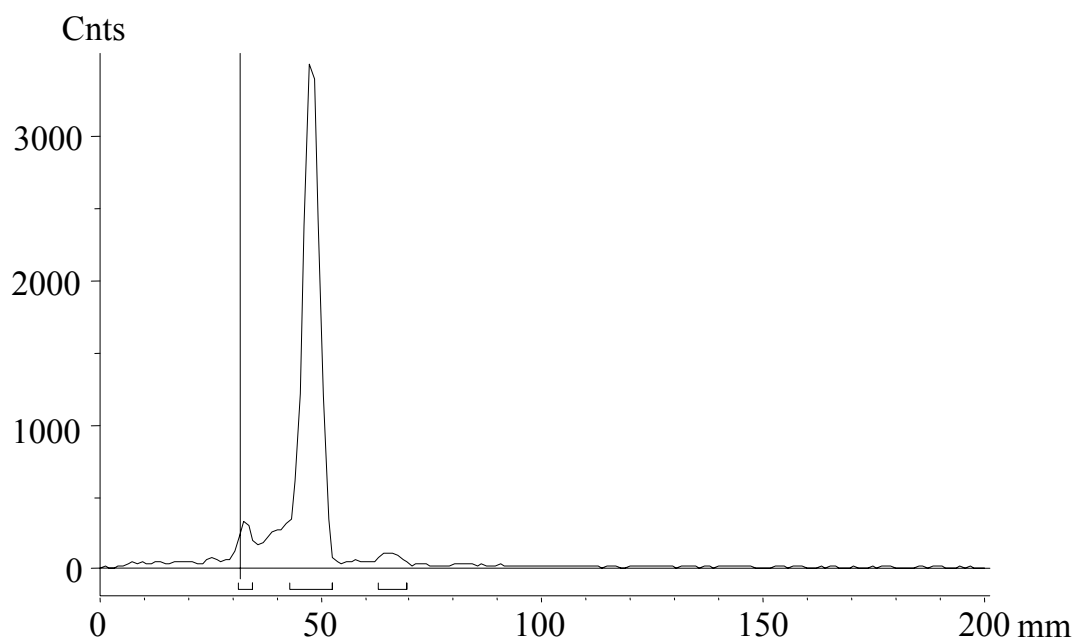
No caso das amostras de plexo coróide (Figura IV.7), observa-se apenas um pico correspondente à testosterona tritiada entre os 70-75 mm.



**Figura IV.5.** Cromatograma correspondente à actividade da 5 $\alpha$ -R numa das amostras de próstata (controlo positivo). Padrões: Testosterona: 70-75 mm, 5 $\beta$ -DHT: 77-84 mm, 5 $\alpha$ -DHT: 85-93 mm.



**Figura IV.6.** Cromatograma correspondente à actividade da  $5\alpha$ -R numa das amostras de fígado (controlo positivo). Padrões: Testosterona: 70-75 mm,  $5\beta$ -DHT: 77-84 mm,  $5\alpha$ -DHT: 85-93 mm.



**Figura IV.7.** Cromatograma correspondente à actividade da  $5\alpha$ -R numa das amostras de plexo coróide. Padrões: Testosterona: 70-75 mm,  $5\beta$ -DHT: 77-84 mm,  $5\alpha$ -DHT: 85-93 mm.

# Discussão

---



## V. Discussão

Recentemente o nosso grupo de investigação demonstrou a presença do mRNA da 5 $\alpha$ -reductase no plexo coróide (CP) de rato. A presença da 5 $\alpha$ -R no CP sugere que a produção de androgénios pode ocorrer localmente neste órgão. Contudo, não há estudos que caracterizem a actividade da 5 $\alpha$ -R ou que identifiquem os factores que regulam a sua expressão no CP.

No presente estudo por Imunohistoquímica e Western Blot foi possível verificar a presença da proteína 5 $\alpha$ -R tipo 1 no CP de ratos macho e fêmea. Detectou-se a proteína com uma localização epitelial. Isto poderá indicar que existe síntese local de androgénios no CP caso a 5 $\alpha$ -R se encontre activa.

Durante o processo de envelhecimento, o CP sofre alterações morfológicas e funcionais apresentando um declínio em todos os aspectos da sua função, o que pode aumentar o risco de doenças neurodegenerativas. Os androgénios têm sido reconhecidos como neuroprotectores ou neuromoduladores no envelhecimento (Janowsky, 2005), daí o interesse em analisar a expressão da 5 $\alpha$ -R durante o envelhecimento. A expressão da 5 $\alpha$ -R em animais machos e fêmeas, de diferentes grupos etários, foi analisada por Real-time PCR. Nos machos verificou-se que aos 9 e 12 meses há um aumento da expressão da 5 $\alpha$ -R tipo 1, apresentando valores significativamente diferentes do grupo controlo de 3 meses, o que poderá estar relacionado com a redução de produção de testosterona pelas células de Leyding, observada em animais destas idades (Zirkin *et. al.*, 1997), regulando positivamente a expressão da 5 $\alpha$ -R. A mesma explicação se poderá dar para a expressão mais reduzida da 5 $\alpha$ -R aos 6 meses, altura que poderá coincidir com os níveis mais elevados de testosterona. No caso das fêmeas não se obteve diferenças significativas do grupo controlo, existindo no entanto uma expressão semelhante á dos machos aos 6 e 9 meses.

A fim de obter informação sobre a actividade da 5 $\alpha$ -R, foram realizadas culturas *ex vivo* de CP com [3H]-T, monitorizando a sua conversão em [3H]-DHT por cromatografia em camada fina, tendo sido utilizados como controlo positivo, próstata e fígado. Verificou-se que não houve qualquer metabolização da testosterona no caso

das amostras de CP, observando-se apenas um pico correspondente à testosterona tritiada. Para os controlos positivos, parece haver indícios de pequena produção de 5 $\alpha$ -DHT, no entanto também pouco evidentes, o que indica que as condições experimentais deverão ser optimizadas. Assim, embora não se tenha demonstrado a actividade da 5 $\alpha$ -R, a sua presença permite continuar a considerar a possibilidade dos androgénios serem secretados localmente no CP, à semelhança do que acontece noutras regiões do SNC.

# Conclusão e Perspectivas Futuras

---



## VI. Conclusão e perspectivas futuras

Com a realização deste trabalho podemos concluir que a proteína 5 $\alpha$ -R tipo 1 é expressa no CP de rato, localizando-se nas células epiteliais. A análise da expressão da 5 $\alpha$ -R tipo 1 ao longo do processo de envelhecimento, demonstrou para os machos um aumento da expressão nos grupos mais velhos. Quanto a bioactividade da 5 $\alpha$ -R tipo 1 no CP, não se verificou metabolização de [3H]-T a [3H]-DHT no entanto os resultados não foram conclusivos.

Estudos futuros deverão ser realizados de modo a confirmar a actividade da 5 $\alpha$ -R tipo 1 na biossíntese de androgénios no CP, e a identificar os factores que regulam a sua expressão.

# Referências Bibliográficas



## VII. Referências Bibliográficas

**Altura** RA, Olshefski RS, Jiang Y, Boué DR: Nuclear expression of Survivin in paediatric ependymomas and choroid plexus tumours correlates with morphologic tumour grade. *British Journal of Cancer* 2003, **89**: 1743-1749

**Alves** CH, Gonçalves I, Socorro S, Baltazar G, Quintela T e Santos C: Androgen Receptor is Expressed in Murine Choroid Plexus and Downregulated by 5alpha-Dihydrotestosterone in Male and Female Mice. *Journal of Molecular Neuroscience* 2009, **38**: 41-49

**Behl** C, Lezoualc'h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, Holsboer F: Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons *in vitro*. *Endocrinology* 1997, **138**:101-106

**Celotti** F, Melcangi RC, Martini C: The 5 $\alpha$ -reductase in the brain: Molecular aspects and relation to brain function. *Front neuroendocrinal* 1992, **13**: 163-215

**Chen** RL, Kassem NA, Redzic ZB, Chen CPC, Segal MB, Preston JE: Age-related changes in choroid plexus and blood–cerebrospinal fluid barrier function in the sheep. *Experimental Gerontology* 2009, **44**: 289-296

**Chodobski** A, Szmydynger-Chodobska J: Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microscopy research and technique* 2001, **52**: 65-82

**Davson** H, Segal MB: Physiology of the CSF and Blood–Brain Barriers. *CRC Press* 1996

**Eicheler** W, Dreher M, Hoffmann R, Happle R, Aumuller G: Immunohistochemical evidence for differential distribution of 5 alpha-reductase isoenzymes in human skin. *British Journal of Dermatology* 1995, **133**:371-376

**El-Awady** MK, El-Garf W, El-Houssiney L: Steroid 5 $\alpha$  Reductase mRNA type 1 is differentially regulated by androgens and glucocorticoids in the rat liver. *Endocrine Journal* 2004, **51**:37-46

**Eriksson** L, Westermark P: Intracellular neurofibrillary tangle-like aggregations. A constantly present amyloid alteration in the aging choroid plexus. *The American Journal of Pathology* 1986, **125**: 124-129

**Esterle** TM, Sanders-Bush E: Serotonin agonists increase transferrin levels via activation of 5-HT<sub>1C</sub> receptors in choroid plexus epithelium. *Journal of Neuroscience* 1992, **12**: 4775-4782

**Falkenstein** E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M: Multiple Actions of Steroid Hormones -A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacological Reviews* 2000, **52**: 513-555

**Greenspan** FS, Gardner DG (2003). Basic and Clinical Endocrinology. The McGraw-Hill Companies, seventh edition

**Hannelore** V, Heemers, Guido Verhoeven, and Johannes V. Swinnen: Androgen Activation of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein Pathway: Current Insights. *Molecular Endocrinology* 2006, **20**: 2265-2277

**Hiipakka** RA, Liao Shutsung: Molecular mechanism of androgen action. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 1998, **9**: 317-324

**Holzbeierlein** J, Lal P, LaTulippe E, Smith A, Satagopan J, Zhang L, Ryan C, Smith S, Scher H, Scardino P, Reuter V, Gerald WL: Gene Expression Analysis of Human Prostate Carcinoma during Hormonal Therapy Identifies Androgen-Responsive Genes and Mechanisms of Therapy Resistance. *American Journal of Pathology* 2004, **164**: 217-227

**Ito K**, Suzuki T, Akahir JI, Moriya T, Kaneko C, Utsunomiya H, Yaegashi N, Okamura K, Sasano H: Expression of androgen receptor and 5 $\alpha$ -reductases in human normal endometrium and its disorders. *International journal of cancer* 2002, **99**:652-657

**Janne OA**, Moilanen AM, Poukka H, Rouleau N, Karvonen U, Kotaja N, Hakli M, Palvimo JJ: Androgen-receptor-interacting nuclear proteins. *Biochemical Society Transactions* 2000, **28**: 401-405

**Janowsky JS**: The role of androgens in cognition and brain aging in men. *Neuroscience* 2005, **138**: 1015-1020

**Kvitnitskaia-Ryzhov T**, Shkapenko AL: A comparative ultracytochemical and biochemical study of the ATPases of the choroid plexus in aging. *Tsitologiya* 1992, **34**: 81-87

**Lephart ED**, Lund TD, Horvath TL: Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. *Brain Research Reviews* 2001, **37**: 25-37

**Lewis JS**, Jordan VC: Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutation Research* 2005, **591**:247-263

**Liao S**, Hiipakka RA: Selective inhibition of steroid 5-alpha-reductase isoenzymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995, **214**: 833-838

**Mangelsdorf DJ**, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schittq G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evan RM: The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* 1995, **83**: 835-839

**Masseguin C**, LePanse S, Corman B, Verbavatz JM, Gabion J: Aging affects choroidal proteins involved in CSF production in Sprague-Dawley rats. *Neurobiology of Aging* 2005, **26**: 917-927

**Masserman JH**: Cerebrospinal hydrodynamics. IV. Clinical experimental studies. *Journal of Neurology and Psychiatry* 1934, **32**: 524-553

**Melcangi RC**, Magnaghi V, Galbiati M, Martini L: Formation and effects of neuroactive steroids in the central and peripheral nervous system. *International review of neurobiology* 2001, **46**: 145-173

**Mellon SH**, Griffin LD: Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2002, **13**: 35-43

**Mensah-Nyagan AG**, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H: Neurosteroids: Expression of Steroidogenic Enzymes and Regulation of Steroid Biosynthesis in the Central Nervous System. *Pharmacological Reviews* 1999, **51**:1

**Michels G**, Hoppe UC: Rapid actions of androgens. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2008, **29**: 182-198

**Miller WL**: Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Reviews* 1988, **9**:295-318

**Normington K**, Russell DW: Tissue distribution and Kinetic characteristics of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase isoenzymes. *Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**:19548-19554.

**Occhiato EG**, Guarna A, Danza G, Serio M: Selective non-steroidal inhibitors of 5 $\alpha$ -reductase type 1. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2004, **66**:1-16

**Park JS, Yeom MH, Park WS, Joo KM, Rho HS, Kim DH, Chang IS:** Enzymatic Hydrolysis of Green Tea Seed Extract and Its Activity on 5 $\alpha$ -reductase Inhibition. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2006, **70**:387-394

**Park WS, Lee CH, Lee BG, Chang IS:** The extract of Thujae occidentalis semen inhibited 5 $\alpha$ -reductase and androchronogenetic alopecia of B6CBAF1/j hybrid mouse. *Journal of dermatological science* 2003, **31**:91-98

**Patte-Mensah C, Kibaly C, Mensah-Nyagan AG:** Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: a potential component of nociception. *PNAS* 2005, **102**: 9044-9049

**Pearce ST, Jordan VC:** The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2003, **50**:3-22

**Penning TM:** Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine Reviews* 1997, **18**: 281-305

**Pike CJ, Nguyen T-V, Ramsden M, Yao M, Murphy MP, Rosario ER:** Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions. *Hormones and Behavior* 2008, **53**: 693-705

**Pinna G, Agis-Balboa RC, Pibiri F, Marianela N, Guidotti A, Costa E:** Neurosteroid Biosynthesis Regulates Sexually Dimorphic Fear and Aggressive Behavior in Mice. *Neurochemical Research* 2008, **33**: 1990-2007

**Poletti A, Negri-Cesi P, Rabuffetti M, Colciago A, Celotti F, Martini L:** Transient expression of the 5 alpha-reductase type 2 isozyme in the rat brain in late fetal and early postnatal life. *Endocrinology* 1998b, **139**:2171-2178

**Quintela** T, Alves H, Gonçalves I, Baltazar G, Saraiva MJ, Santos C: 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone up-regulates transthyretin levels in mice and rat choroid plexus via an androgen receptor independent pathway. *Brain Research* 2008, **1229**:18-26

**Reiber** H: Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restorative neurology and neuroscience* 2003, **21**: 79-96

**Rocha**, AS (2008). Expressão da 5 $\alpha$ -redutase no plexo coróide murina. Tese de Mestrado em Bioquímica, Universidade da Beira Interior

**Sapolsky** RM, Packan DR, Vale WW: Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. *Brain Research Reviews* 1988, **453**:369-371

**Schuchard** M, Landers JP, Sandhu NP e Spelsberg TC: Steroid Hormone Regulation of Nuclear Proto-oncogenes. *Endocrine Reviews* 2008, **14**:6

**Serot** JM, Bene MC, Foliguet B, Faure GC: Morphological alterations of the choroid plexus in late-onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2000, **99**:105-108

**Stoquart-ElSankari** S, Balédent O, Gondry-Jouet C, Makki M, Godefroy O, Meyer ME: Aging effects on cerebral blood and cerebrospinal fluid flows. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2007, **27**: 1563-1572

**Strazielle** NP, Ghersi-Egea JF: Choroid Plexus in the Central Nervous System: Biology and Physiopathology. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2000, **59**: 561-574

**Thigpen** AE, Russell DW: Four amino acid segment in steroid 5 $\alpha$ -reductase 1 confers sensitivity to finasteride, a competitive inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**:8577-8583

**Thigpen** AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW: Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme expression. *The Journal of Clinical Investigation* 1993, **92**:903-910

**Thouvenot** E, Lafon-Cazal M, Demetree E, Jouin P, Bockaert J, Marin P: The proteomic analysis of mouse choroid plexus secretome reveals a high protein secretion capacity of choroidal epithelial cells. *Proteomics* 2006, **6**: 5941-5952

**Torres** JM e Ortega E: Steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes in the adult female rat brain: central role of dihydrotestosterone *Journal of Molecular Endocrinology* 2006, **36**: 239-245

**Tsutsumi** M, Skinner M K, Sanders-Bush E: Transferrin Gene Expression and Synthesis by Cultured Choroid Plexus Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1989, **264**: 9626-9631

**Vandesompele** J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RTPCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002, **3**

**Walter** HJ, Berry M, Hill DJ, Cwyfan-Hughes S, Holly, Logan A: Distinct Sites of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-II Expression and Localization in Lesioned Rat Brain: Possible Roles of IGF Binding Proteins (IGFBPs) in the Mediation of IGF-II Activity. *Endocrinology* 1999, **140**: 520-532

**Wojtal** K, Tronjar MK, Czuczwar SJ: Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacological Reports* 2006, **58**: 335-340

**Yuan-Shan** Z, Guang-Huan S: 5 $\alpha$ -Reductase Isozymes in the Prostate. *Journal of Medical Sciences* 2005, **25**: 1-12

# Anexos

---



### **Água tratada com DEPC**

Adicionar DEPC (Sigma, EUA) a água destilada numa concentração final de 0,1%. Incubar durante a noite, com agitação, à temperatura ambiente e autoclavar durante 30 minutos para remover vestígios de DEPC.

### **Fixadora: 4% paraformaldeído (PFA) em PB**

Dissolver 8 g de PFA em 100 mL de água destilada. Aquecer para dissolver parcialmente, depois, adicionar NaOH 1 M gota a gota até a solução clarear. Adicionar 100 mL de PB 0,2 M, misturar e filtrar. Armazenar a 4°C. Um armazenamento prolongado (mais de 1 semana) requer a verificação do pH, o qual deve ser cerca de 7,4. Não autoclavar.

### **Tampão fosfato (PB) 0,2 M**

Adicionar 21,8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 6,4 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 800 mL de água destilada. Agitar para dissolver, perfazer o volume a 1 litro e ajustar o pH a 7,4. Autoclavar a solução e armazenar à temperatura ambiente.

### **Tampão fosfato salino (PBS) 10X**

Adicionar a 800 mL de água DEPC 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 2,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Ajustar o pH a 7,4 com HCl e adicionar água DEPC até 1 litro. Autoclavar.

**Tampão Tris salino (TBS) 10X (Tris HCl 100mM pH 7,5 e NaCl 150mM)**

Adicionar a 800 mL de água destilada 88 g de NaCl e 121 g de base Tris. Dissolver e ajustar o pH a 7,5 com, aproximadamente, 40 mL de HCl 0,1 N. Perfazer o volume até 1 litro. Autoclavar.

**DAB**

Dissolver uma pastilha de DAB (Sigma) em 15 mL de TBS1X (pH=7,6) e adicionar 6 µl de peróxido de hidrogénio 100%, colocar em agitação.

**Soro de burro 1,5%/PBS 1X**

Para 400µL adicionar 6µL de soro de burro a 394µL de PBS 1X

**Extravidine-peroxidase**

Para 1 mL de solução adicionar 50µL de Extravidine Peroxidase a 950µL de PBS/BSA 1%. Armazenar a 4°C.