



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Regulação dos genes circadianos Per1 e Per2 pelo estradiol em células epiteliais do Plexo Coróide

Tânia Cristina de Oliveira Albuquerque

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

Orientadora: Prof. Doutora Telma Quintela
Coorientadora: Prof. Doutora Cecília Santos

Covilhã, Junho de 2014

O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora

(Tânia Cristina de Oliveira Albuquerque)

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais pelo carinho, apoio e tudo o que me proporcionaram na vida. A eles devo o facto de ter chegado aqui.

À professora Doutora Telma Quintela, por me ter dado a oportunidade de poder fazer parte deste projeto, por todos os ensinamentos práticos e teóricos transmitidos, e disponibilidade sempre demonstrada. Um muito obrigada.

À professora Doutora Cecília Santos pela dedicação, bons conselhos e disponibilidade constante demonstrada ao longo da realização deste trabalho.

À professora Doutora Isabel Gonçalves e à Professora Doutora Helena Marcelino pelo apoio e por se mostrarem sempre disponíveis em ajudar.

A todos os meus colegas de laboratório expresso o meu obrigado por de alguma forma terem contribuído para a realização deste trabalho. O meu sincero agradecimento à Andreia Domingos, com quem partilhei este percurso desde o início. Juntas aprendemos muitas coisas e fomos um apoio uma para a outra nos momentos mais difíceis. Um obrigada à Daniela Talhada pela ajuda prestada nos momentos finais da realização deste trabalho.

Aos demais amigos e familiares que sempre estiveram presentes e são um apoio constante.

Por último, um agradecimento especial ao Daniel Rodrigues, pela motivação, compreensão, paciência e pelos bons momentos proporcionados ao longo dos anos.

Resumo

Nos mamíferos, o relógio circadiano central que gera os ritmos circadianos do organismo está localizado no núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo. A nível molecular, o SCN é controlado por circuitos de *feedback* que envolvem a transcrição e tradução dos genes *clock*. Os genes *clock* também estão presentes em vários tecidos periféricos, podendo exibir oscilações robustas.

Estudos em animais sugerem que os ciclos sono-vigília são modulados sobretudo pelos esteroides ováricos nas fêmeas. Os efeitos hormonais no ritmo circadiano são conhecidos, no entanto é importante perceber como o SCN integra essas influências hormonais.

Sabe-se que o SCN carece de recetores de estrogénio (ER). Como resultado, o estudo da influência dos esteroides femininos tem-se centrado principalmente em locais extra-SCN, abundantes em ERs e que projetam para o SCN. Em estudos anteriores verificou-se que os genes do ritmo circadiano são expressos no plexo coróide (CP) de ratos macho e fêmea, sugerindo assim que este tecido é um oscilador extra-SCN. Além disso, alguns desses genes (Per1 e Per2) são expressos diferencialmente entre machos e fêmeas, o que pressupõe uma regulação do ritmo circadiano por parte das hormonas sexuais. Com base nestes resultados, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do estradiol (E₂) e da progesterona (P₄) na expressão dos genes Per1 e Per2 em células epiteliais de plexo coróide (CPEC). Observou-se que o E₂, mas não a P₄, induz a expressão de Per1 e Per2. Além disso, o aumento da expressão destes genes foi revertido significativamente aquando da presença do antagonista do ER, o ICI 182 780. A expressão de Per1 e Per2 em ratos macho e fêmea também foi analisada quando os animais foram expostos a condições constantes de luz ou escuridão, observando-se um aumento na expressão de Per1 nos machos em condições de escuridão constante. Uma vez que os esteroides sexuais influenciam o ritmo circadiano no CP, este pode contribuir para a interpretação dos estímulos hormonais, agindo como um oscilador intermediário na passagem da informação hormonal para o relógio central.

Palavras-chave

Ritmo circadiano, plexo coróide, estradiol, Per1, Per2, núcleo supraquiasmático.

Abstract

In mammals, the master circadian clock generating the body's intrinsic rhythms lies in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus. At the molecular level, the SCN is controlled by *feedback* circuits involving transcription and translation of *clock* genes. The *clock* genes also exist in a variety of peripheral tissues throughout the body and display robust oscillations.

Early evidence from animals, suggests significant modulation of sleep-wake cycles by sex hormones, especially by ovarian steroids in females. The effects of gonadal hormones on circadian rhythmicity are clearly established; however, what is lacking is a clear understanding of how the SCN integrates these hormonal influences. The SCN has sparse estrogen receptor (ER) mRNA and protein. As a result, the role of steroids in females has focused primarily on extra-SCN sites of action that are estrogen receptor-rich and project to the SCN.

In previous work we found that several genes of the brain clock machinery are expressed in the choroid plexus (CP) of female and male rats, thus suggesting that this tissue is an extra-SCN oscillator. Moreover, some of those genes (e.g. Per1 and Per2) are differentially expressed between males and females, suggesting a regulation of these *clock* genes by sex hormones. Based on these results we questioned if estradiol (E₂) and progesterone (P₄) administration could regulate the expression of Per1 and Per2 in rat choroid plexus epithelial cells (CPEC).

We found that E₂, but not P₄, induced high expression of Per1 and Per2. Furthermore, the E₂ activated Per1 and Per2 expression was significantly repressed by the ER antagonist, ICI 182 780. We also analyzed Per1 and Per2 expression in female and male rats under constant disrupted circadian conditions (darkness or light) and observed that Per1 expression in males increased under constant darkness.

As sex hormones seem to influence circadian rhythms in CP, it could contribute to the interpretation of hormonal stimuli, acting as an extra-SCN clock participating in an indirect route to veinculate this information to the master clock.

Keywords

Circadian rhythm, choroid plexus, estradiol, Per1, Per2, suprachiasmatic nucleus.

Índice

I. Introdução	1
1. Ritmo Circadiano	1
1.1 Núcleo supraquiasmático, oscilador circadiano central	1
1.1.1 Aferências ao núcleo supraquiasmático.....	2
1.2 Osciladores circadianos no cérebro	4
1.3 Osciladores circadianos periféricos.....	6
1.3.1 Comunicação do SCN com alvos centrais e periféricos.....	6
1.4 Mecanismo molecular do ritmo circadiano	8
1.5 Efeitos das hormonas sexuais no ritmo circadiano.....	9
1.6 Disrupção do ritmo circadiano.....	11
2. Plexo coróide.....	12
2.1 Organização estrutural e morfologia	12
2.2 Funções	14
2.2.1 Produção e secreção de Líquido Cefalorraquidiano	15
2.2.2 Síntese proteica	16
2.2.3 Função protetora e imunológica	17
II. Objetivo	19
III. Metodologia	21
1. Animais.....	21
1.1 Cultura primária de células epiteliais de plexo coróide.....	21
1.1.1 Estímulo das CPEC com estradiol e progesterona.....	21
1.2 Disrupção do ritmo circadiano	22
2. RNA total	23
2.1 Extração de RNA total	23
2.2 Determinação da integridade do RNA total.....	24
2.3 Quantificação do RNA total.....	24
3. Síntese de DNA complementar	24
4. PCR convencional	25
5. PCR em tempo real	25
6. Imunocitoquímica por fluorescência	26
7. Whole-mount.....	27
IV. Resultados	29
1. Presença dos genes da via do ritmo circadiano Per1 e Per2 e respetivas proteínas no plexo coróide de rato	29
1.1 Análise da expressão dos genes Per1 e Per2 em células epiteliais de plexo coróide de rato	29

1.2	Localização das proteínas PER1 e PER2 no plexo coróide de rato	30
2.	Regulação dos níveis de Per1 e Per2 nas células epiteliais de plexo coróide de rato	31
2.1	Oscilações diárias da expressão dos genes Per1 e Per2	31
2.2	Efeito do estradiol na expressão dos genes Per1 e Per2	33
2.3	Efeito do antagonista do recetor de estradiol na expressão dos genes Per1 e Per2 .	34
2.4	Efeito do estradiol e do seu antagonista na localização das proteínas PER1 e PER2 .	35
2.4.1	Quantificação de fluorescência- Efeito do antagonista do recetor de estradiol na localização da proteína PER1	38
2.5	Efeito da progesterona na expressão dos genes Per1 e Per2	38
3.	Efeito da disrupção circadiana na expressão dos genes Per1 e Per2	40
V.	Discussão	43
VI.	Conclusões e Perspetivas Futuras	47
VII.	Referências Bibliográficas	49

Lista de Figuras

Figura 1. Principais vias aferentes do núcleo supraquiasmático.....	3
Figura 2. Representação de alguns osciladores circadianos no cérebro de mamíferos.....	5
Figura 3. Mecanismo molecular do ritmo circadiano nos mamíferos.....	9
Figura 4. Localização dos plexos coróides (CPs) no sistema nervoso central humano.....	13
Figura 5. Morfologia do plexo coróide do IV ventrículo cerebral.....	14
Figura 6. Expressão de mRNA dos genes da via do ritmo circadiano Per1 e Per2 em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato.....	29
Figura 7. Imunofluorescência das proteínas PER1 e PER2 no plexo coróide (CP) de rato.....	30
Figura 8. Variação da expressão do mRNA de Per1 em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato a diferentes horas.....	31
Figura 9. Variação da expressão do mRNA de Per2 em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato a diferentes horas.....	32
Figura 10. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per1 (A) e Per2 (B) em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato após estímulo com estradiol (E_2) a diferentes concentrações (0, 10, 100 e 500nM) durante 24 horas.....	33
Figura 11. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per1 (A) e Per2 (B) em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato após estímulo com estradiol (E_2) (500nM), ICI e E_2 com ICI (500nM).....	35
Figura 12. Imunofluorescência da proteína PER1 em células epiteliais de plexo coróide (CPEC) de rato com o anticorpo Per1.....	36
Figura 13. Imunofluorescência da proteína PER2 em células epiteliais de plexo coróide (CPEC) de rato com o anticorpo Per2.....	37
Figura 14. Quantificação da intensidade de fluorescência do núcleo das células epiteliais de plexo coróide (CPEC) de rato.....	38
Figura 15. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per1 (A) e Per2 (B) em células epiteliais de plexo coróide (CPEC) de rato após estímulo com progesterona (P_4) a diferentes concentrações (0, 10, 100 e 500nM) durante 24 horas.....	39
Figura 16. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per1 em plexo coróide (CP) de ratos fêmea (A) e macho (B) após exposição a ciclos de luz e escuridão constante.....	41
Figura 17. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per2 em plexo coróide (CP) de ratos fêmea (A) e macho (B) após exposição a ciclos de luz e escuridão constante.....	42

Lista de Acrónimos

5-HT	Serotonina
ANS	Sistema nervoso autónomo
AMY	Amígdala
AR	Recetor de androgénio
AVP	Arginina-vasopressina
BMAL1	<i>Brain and muscle-Arnt-like 1</i>
CKI	Caseína quinase I
CLOCK	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
CNS	Sistema nervoso central
CP	Plexo coróide
CPEC	Células epiteliais de plexo coróide
Cry1-2	Criptocromo 1-2
CSF	Líquido cefalorraquidiano
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DRN	Núcleo Dorsal da Rafe
E ₂	Estradiol
EE	Escuridão Constante
ER	Recetor de Estrogénio
FBS	Soro fetal bovino
GDX	Gonadectomia
GHT	Trato geniculohipotalâmico
Glu	Glutamato
GRP	Péptido de libertação da gastrina
ICC	Imunocitoquímica
IGL	Folheto intergeniculado
ipRGC	Células ganglionares fotossensíveis
L/E	Luz/Escuridão
LHb	Habenula lateral
LL	Luz Constante
MRN	Núcleo mediano da rafe
mRNA	RNA mensageiro
NPAS2	Proteína 2 de domínio PAS neuronal
OB	Bolbo olfativo
P ₄	Progesterona
PACAP	Polipéptido ativador da adenilato-ciclase Pituitária
pB	Pares de bases

PBS	Tampão de fosfato salino
Per1-2	Período 1-2
PFA	Paraformaldeído
PNS	Sistema nervoso periférico
Rev-Erb	Recetor nuclear
RHT	Trato retinohipotalâmico
RNases	Ribonucleases
ROR α	Recetor órfão relacionados com retinoide alfa
RNAt	RNA total
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SCN	Núcleo supraquiasmático
T	Testosterona
TJ	<i>Tight Junctions</i>
TTR	Transtirretina
VIP	Polipéptido Vasoativo Intestinal

I. Introdução

1. Ritmo Circadiano

A vida na Terra evoluiu na presença de um ciclo de dia e noite, e muitos dos organismos (desde arqueobactérias, a plantas e humanos) apresentam um ritmo interno que dita diferentes comportamentos, em diferentes momentos do dia (Dibner, Schibler et al. 2010). A maioria dos parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais exibidos por esses organismos mostram oscilações diárias e a maioria desses ritmos diários persistem em condições ambientais constantes, o que demonstra que são coordenados por osciladores endógenos (relógios circadianos). Esses ciclos biológicos que persistem em condições constantes por períodos de aproximadamente 24 horas são chamados de ritmos circadianos. De facto, o próprio termo circadiano deriva do latim “circa” que significa “aproximadamente” e “diem” que significa “dia” (Menaker, Moreira et al. 1997, Buhr e Takahashi 2013).

Os ritmos circadianos são controlados por relógios internos autossustentados (o que significa que os ritmos podem persistir mesmo na ausência de sinais exógenos), que podem ser sincronizados por informação externa, como o ciclo dia/noite, a temperatura e a ingestão de alimentos (Yang 2010).

Os relógios circadianos regulam uma ampla variedade de processos biológicos, entre os quais, ciclos de sono-vigília, temperatura corporal, metabolismo, pressão arterial, ciclo celular, secreção hormonal, entre outros (Kondratov, Gorbacheva et al. 2007). Certas patologias exibem também uma componente circadiana e, em alguns casos, podem resultar de uma disfunção nos relógios circadianos. Isto indica que os processos controlados pelos relógios circadianos desempenham papéis fundamentais na fisiologia humana e na fisiopatologia de várias doenças (Kondratova e Kondratov 2012).

1.1 Núcleo supraquiasmático, oscilador circadiano central

Os ritmos circadianos são controlados por relógios internos conservados evolutivamente, que residem na maioria dos tecidos do organismo. A persistência de um ritmo circadiano, mesmo na ausência de sinalização exógena, evidencia a presença de estruturas no sistema nervoso central (CNS) capazes de gerar ritmicidade circadiana intrínseca (Masri e Sassone-Corsi 2010).

Nos mamíferos o ritmo circadiano está organizado de forma hierárquica, sendo o núcleo supraquiasmático (SCN) considerado o oscilador central. Esta estrutura é formada por aglomerados de neurónios localizados na região periventricular do hipotálamo ventral anterior, sendo adjacente ao III ventrículo e dorsal ao quiasma ótico (Reppert e Weaver 2002, Cao, Butcher et al. 2013, Rocha, Frazão et al. 2014).

A composição neuroquímica interna do SCN é bastante complexa, uma vez que inclui populações de neurónios, fibras e terminações serotoninérgicas que produzem ou libertam várias substâncias neuroativas (Pinato, Allemandi et al. 2007). Entre as principais substâncias neuroativas encontram-se o polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP), o péptido de libertação da gastrina (GRP) e arginina-vasopressina (AVP), sendo os dois primeiros sintetizados por neurónios localizados na divisão ventrolateral do SCN, e a AVP sintetizada por neurónios da porção dorsomedial (Campos, Cruz-Rizzolo et al. 2014).

As evidências do papel fulcral do SCN no ritmo circadiano surgem de estudos em ratos e ratinhos nos quais se observou que muitas das funções fisiológicas eram suprimidas, ou perdiam a sua ritmicidade, devido a uma lesão do SCN. O transplante de células do SCN nos animais lesados restabelecia o seu ritmo circadiano (Ralph, Foster et al. 1990, Kondratov, Gorbacheva et al. 2007).

O SNC é sincronizado tanto por sinais internos como externos, como por exemplo a presença de luz, e sincroniza outros osciladores, presentes em outras áreas do cérebro e órgãos periféricos, através do sistema endócrino e do sistema nervoso periférico (PNS) (Akhtar, Reddy et al. 2002). Estes, por sua vez, produzem respostas a nível fisiológico e comportamental que permitem ao organismo reagir ao meio ambiente de forma adequada, num momento específico do dia (Mohawk e Takahashi 2011).

Nos mamíferos, o ciclo dia/noite é considerado o *Zeitgeber* (palavra alemã que significa “sincronizador”) mais importante. O termo *Zeitgeber* designa um sinal exógeno que sincroniza ou ajusta o ritmo circadiano. Além do ciclo claro/escuro a ingestão alimentar e a temperatura ambiente também podem agir de forma a sincronizar o sistema de manutenção endógeno (Masri e Sassone-Corsi 2013).

1.1.1 Aferências ao núcleo supraquiasmático

O SCN recebe informação através de três principais vias aferentes: o trato retinohipotalâmico (RHT), o trato geniculohipotalâmico (GHT), e as terminações serotoninérgicas (5HT) dos núcleos dorsal e mediano da rafe (DRN e MRN, respetivamente). O RHT responde à informação luminosa proveniente do exterior enquanto o GHT e os núcleos da rafe fornecem informações não luminosas para o SCN (Dibner, Schibler et al. 2010).

A percepção luminosa é realizada principalmente pelas células ganglionares da retina fotossensíveis (ipRGCs), que expressam o fotopigmento melanopsina. Estas células podem enviar a informação diretamente para o SCN através do RHT, cujas fibras terminam na porção ventrolateral do SCN, sobre os neurónios que expressam VIP. As moléculas envolvidas nesta sinalização são o neurotransmissor glutamato (Glu) e o polipéptido ativador da adenilato-ciclase pituitária (PACAP), libertadas nas sinapses terminais do RHT. Essa informação atinge posteriormente os neurónios da porção dorsomedial do SCN (Girardet, Blanchard et al. 2010, Albrecht 2012). Por outro lado, o RHT pode projetar também para o folheto intergeniculado (IGL), o qual por sua vez, projeta para o SCN através do GHT, transportando assim a informação luminosa para o SCN. O IGL também pode receber informação não luminosa do DRN, havendo portanto uma integração de sinais luminosos e não luminosos a este nível. As fibras serotoninérgicas provenientes do DRN e do MRN que terminam no SCN participam na regulação não luminosa deste núcleo. Como consequência, o SCN processa a informação e transmite-a para os osciladores periféricos de forma a poder sincronizar os ritmos endógenos (Figura1) (Dibner, Schibler et al. 2010).

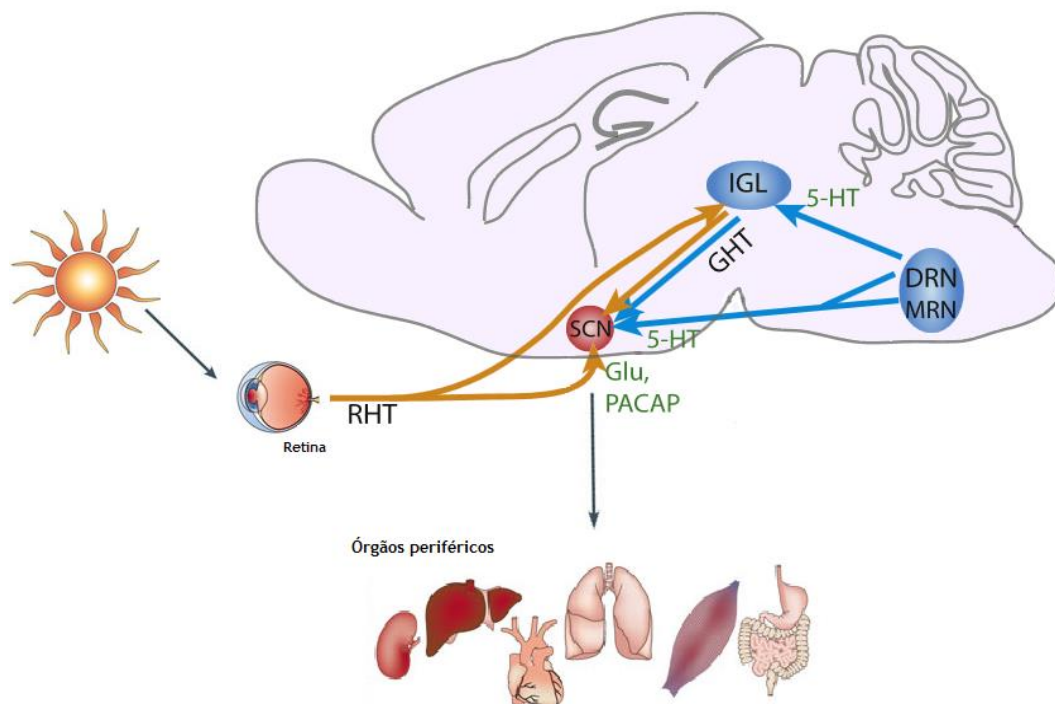


Figura 1. Principais vias aferentes do núcleo supraquiasmático.

As alterações na luz devido ao ciclo de dia/noite são detetadas diretamente pelas células ganglionares da retina fotossensíveis (ipRGCs). A informação luminosa é transmitida para o núcleo supraquiasmático (SCN), no hipotálamo anterior, pelo trato retinohipotalâmico (RHT). O SCN funciona como um oscilador circadiano central que gera ritmicidade circadiana, sendo necessário para a sincronização dos outros osciladores periféricos.

5-HT, serotonina; DRN, núcleo dorsal da rafe, IGL, folheto intergeniculado; GHT, trato geniculohipotalâmico; Glu, glutamato; MRN, núcleo mediano da rafe; PACAP, polipéptido ativador da adenilato-ciclase pituitária; RHT, trato retinohipotalâmico; SCN, núcleo supraquiasmático. As setas cor de laranja representam a entrada de informação luminosa e as setas azuis representam a entrada de informação não luminosa no SCN. Adaptada de Albrecht 2012.

O SCN é o oscilador circadiano central nos mamíferos, sendo necessário para a formação da maioria dos ritmos diários que controlam o comportamento e fisiologia dos organismos (Abe, Herzog et al. 2002). No entanto, tem sido demonstrado que os mecanismos moleculares subjacentes à geração destes ritmos estão presentes não só no SCN mas também em outras regiões do cérebro e em tecidos periféricos, como o fígado, rim, útero, pâncreas, músculo esquelético, intestino e tecido adiposo (Yamamoto, Nakahata et al. 2004, Guilding, Hughes et al. 2009, Bass e Takahashi 2010).

Apesar do SCN ser considerado o oscilador principal e ser necessário para a sincronização dos outros osciladores, estudos recentes demonstraram que muitos desses osciladores são capazes de gerar oscilações circadianas mesmo na ausência do controlo do SCN, ou seja, são autossustentados (Tahara, Kuroda et al. 2012).

1.2 Osciladores circadianos no cérebro

Além do SCN, foram identificadas outras áreas no cérebro dos mamíferos incluindo o bulbo olfativo (OB), o córtex cerebral, a amígdala (AMY), a habenula lateral (LHb), o plexo coróide (CP) e vários núcleos hipotalâmicos, que expressam genes envolvidos na geração dos ritmos circadianos (Abe, Herzog et al. 2002, Rath, Rohde et al. 2012, Quintela, Sousa et al. 2014).

O SCN pode coordenar o comportamento circadiano de outros osciladores dependendo das suas características, o que permite classificá-los como osciladores semiautónomos ou osciladores designados de “escravos”. Os osciladores semiautónomos são capazes de gerar ritmos de forma autónoma, no entanto requerem um oscilador principal para a sua sincronização. Pelo contrário, os osciladores designados de “escravos” são apenas capazes de oscilar sob o controlo de osciladores centrais ou semiautónomos (Figura 2) (Guilding e Piggins 2007).

Apesar da importância do SCN como oscilador central, estudos recentes evidenciaram a existência de osciladores extra-SCN, como a retina, a LHb e o OB, capazes de manter ritmicidade mesmo na ausência do oscilador central. Assim, o OB pode ser considerado um oscilador autónomo, importante para regular o nível de sensibilidade dos neurónios olfativos. Estudos *in vitro* mostraram que o OB gera ritmicidade de forma autónoma, independente do SCN (Albrecht 2012, Montúfar-Chaveznava, Hernández-Campos et al. 2012).

1.3 Osciladores circadianos periféricos

Após a descoberta dos genes responsáveis pelo mecanismo molecular circadiano, tornou-se claro que esses genes estavam presentes não só no SCN mas também na maioria dos tecidos periféricos (Yamazaki, Numano et al. 2000). Além disso, observou-se que a ritmicidade na expressão desses genes se mantinha em cultura, mostrando que os tecidos periféricos contêm osciladores circadianos endógenos (Welsh, Yoo et al. 2004).

Diversos órgãos, como o fígado, pulmões, rim, pâncreas e coração, mostraram um padrão de expressão desses genes, no entanto estes tecidos apenas conseguem manter oscilações durante alguns dias na ausência do oscilador central (Yoo, Yamazaki et al. 2004).

Assim, o SCN é necessário para controlar os osciladores periféricos, uma vez que na sua ausência os genes *clock* tornam-se dessincronizados. Uma vez sincronizados, os osciladores periféricos regulam localmente os ritmos fisiológicos e comportamentais (Mohawk, Green et al. 2012).

São diversas as funções fisiológicas que estão sujeitas a oscilações diárias nos tecidos periféricos. Exemplos disso são a desintoxicação xenobiótica pelo fígado, rim e intestino delgado; o metabolismo do fígado; a lipogénese; o fluxo sanguíneo renal; a taxa de formação de urina e vários parâmetros ligados ao sistema cardiovascular, tais como a pressão arterial e o batimento cardíaco (Dibner, Schibler et al. 2010).

Estas funções fisiológicas podem ser coordenadas diretamente pelo SCN através de sinais neuronais e hormonais, ou indiretamente por osciladores locais periféricos, sincronizados pelo SCN (Menaker, Murphy et al. 2013).

1.3.1 Comunicação do SCN com alvos centrais e periféricos

De forma a sincronizar outros osciladores, o SCN projeta a informação a várias regiões do cérebro, nomeadamente aos núcleos talâmicos e hipotalâmicos, à AMY e aos osciladores periféricos. A sincronização dos relógios periféricos pode ocorrer via sistema nervoso autónomo (ANS), secreção de hormonas e metabolitos e por controlo de ciclos de atividade, como o tempo de alimentação e a temperatura corporal. Estes funcionam como *zeitgebers* para muitos relógios periféricos (Dibner, Schibler et al. 2010).

Um dos exemplos mais estudado é o controlo da glândula pineal e da glândula adrenal pelo SCN (Kalsbeek, Van der Spek et al. 2012). A glândula pineal produz a melatonina, uma hormona importante na regulação dos ciclos circadianos. A melatonina é secretada de forma rítmica, apresentando um pico máximo de secreção no meio da noite, e concentrações muito

baixas durante o dia, pois a exposição à luz suprime a sua secreção (Bedrosian, Herring et al. 2013). Na ausência de luz, o SCN atua através do ANS simpático e leva à liberação da hormona norepinefrina, que por sua vez atua na glândula pineal e promove a síntese e secreção da melatonina (Pevet e Challet 2011).

Os níveis de glucocorticóides no plasma mostram oscilações diárias, sendo a sua secreção, pela glândula adrenal, controlada tanto por sinais humorais como através do ANS. Os níveis plasmáticos de glucocorticóides variam ao longo do ciclo claro/escuro, sendo o despertar precedido por um aumento considerável na sua liberação. O SCN controla a liberação dos glucocorticóides através do ANS e através de sinais humorais, que envolvem a hormona adrenocorticotrófica, produzida pela glândula pituitária. Esta por sua vez age como estimulante na produção de glucocorticóides (Kalsbeek, Van der Spek et al. 2012).

O SCN controla outros osciladores periféricos através do ANS, como é o caso das glândulas salivares, do pâncreas e do fígado, que resulta na ritmicidade plasmática da glucose e insulina (Mohawk, Green et al. 2012).

Além dos sinais neuronais e humorais, estudos recentes sugeriram a existência de sinais difusíveis provenientes do SCN, capazes de gerar ou regular o ritmo circadiano em alvos periféricos. Esta evidência surgiu de estudos em animais com lesões no SCN, que após receberem um transplante de células do SCN de um dador, restabeleciam a ritmicidade na atividade locomotora anteriormente perdida. No entanto, análises *postmortem* revelaram que poucas conexões tinham sido estabelecidas entre o tecido dador e o hospedeiro, sugerindo que o restabelecimento do ritmo circadiano não resultou do restabelecimento das projeções entre o SCN e regiões eferentes. Estas observações apoiam a hipótese de que o tecido transplantado pode repor a ritmicidade perdida, por meio de sinais provenientes desse tecido. Diversos sinais têm sido investigados, entre os quais, o fator de crescimento transformante alfa. Sabe-se que estes sinais são ritmicamente expressos no SCN e que os seus recetores estão presentes em regiões alvo do SCN. Assim, os sinais difusíveis parecem ser suficientes para restabelecer o ritmo circadiano em tecidos circundantes, via comunicação parácrina (envolvendo substâncias neuroativas, como o VIP, o AVP e o GRP) (Allen, Rappe et al. 2001, Silver e Kriegsfeld 2014).

1.4 Mecanismo molecular do ritmo circadiano

O estudo do ritmo circadiano em diferentes organismos permitiu a elucidação de um mecanismo em comum, responsável pela geração e organização dos ritmos diários. Em todos os organismos em que o ritmo circadiano foi estudado, estabeleceu-se a organização do relógio a nível molecular: um conjunto de genes e os seus produtos proteicos participam em circuitos de *feedback* de transcrição/pós-translacionais interligados a fim de produzirem oscilações que têm a duração de aproximadamente 24 horas (Rutter, Reick et al. 2002).

Os componentes no núcleo do relógio são genes cujas proteínas são necessárias para a geração e regulação dos ritmos circadianos nas células em todo o organismo. A nível molecular, o SCN e os restantes osciladores periféricos são controlados por circuitos de *feedback* negativo de transcrição e tradução dos genes, ou seja, as proteínas codificadas por esses genes regulam negativamente a sua própria síntese (Figura 3) (Rana e Mahmood 2010).

A expressão de três genes *Period* (Per1, Per2 e Per3) e de dois genes *Cryptochrome* (Cry1 e Cry2) é ativada pelo dímero proteico formado pela proteínas *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (CLOCK) e pela *Brain-Muscle Arnt-Like protein 1* (BMAL1) (Lowrey e Takahashi 2011). A CLOCK e a BMAL1 são fatores de transcrição que formam heterodímeros e induzem a expressão dos genes Per e dos Cry pela ligação aos elementos E-box nos seus promotores. As proteínas PER e CRY acumulam-se no citoplasma e formam heterodímeros que quando atingem determinada concentração deslocam-se para o núcleo (Hughes, Hong et al. 2012). Uma vez no núcleo, o complexo PER/CRY inibe a atividade de BMAL/CLOCK, reprimindo a sua própria transcrição e originando assim um *feedback* negativo.

Estas proteínas são ainda sujeitas a modificações após a sua tradução, sendo fosforiladas pela enzima caseína quinase I (CKI), isoformas delta e a épsilon. Desta forma, as quinases participam na regulação da maquinaria do relógio circadiano. A fosforilação dos heterodímeros PER e CRY ocorre de uma forma rítmica e progressiva, permitindo portanto que o circuito recomece de novo. Este circuito de *feedback* negativo dura aproximadamente 24 horas (Rana e Mahmood 2010). O complexo CLOCK/BMAL1 também controla a transcrição de outros genes, nomeadamente o recetor nuclear (Rev-Erba) e o recetor órfão relacionado com retinoide alfa (ROR α), membros de uma subfamília de recetores nucleares. Os RORs atuam como ativadores da transcrição, enquanto que os Rev-Erbs reprimem a transcrição do BMAL1 (Figura 3) (Kondratov, Gorbacheva et al. 2007). Um outro elemento do relógio circadiano é a proteína 2 de domínio PAS neuronal (NPAS2). O NPAS2 é um homólogo do CLOCK, exibindo atividades semelhantes, mas diferentes distribuições no tecido. O NPAS2 heterodimeriza com o BMAL1 e promove a transcrição dos genes *clock* (Albrecht 2012).

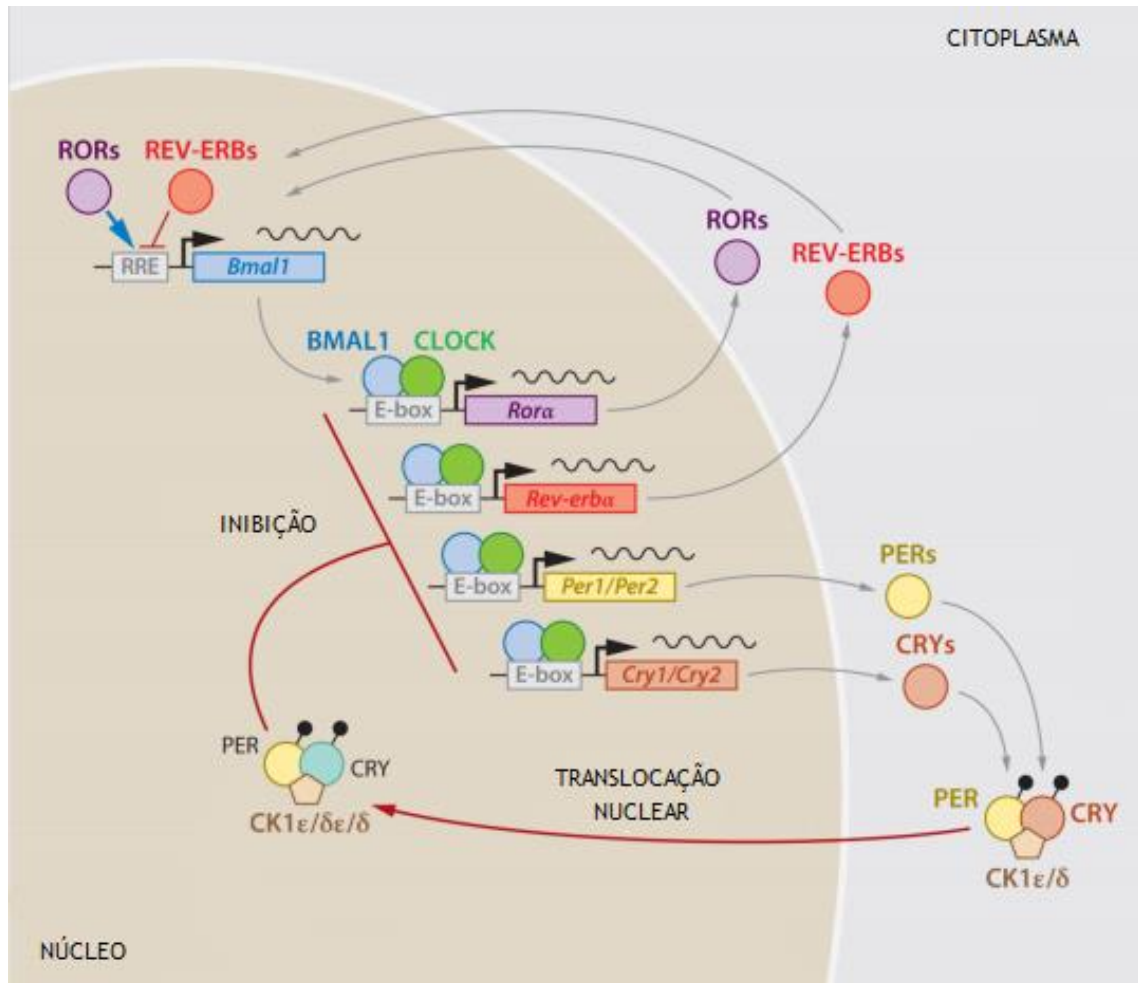


Figura 3. Mecanismo molecular do ritmo circadiano nos mamíferos.

A nível molecular, o relógio circadiano dos mamíferos é controlado por um circuito de *feedback* negativo de transcrição/tradução. No circuito de *feedback* negativo, os heterodímeros BMAL1/CLOCK ativam a transcrição dos genes *Per1*, *Per2* e *Per3*, *Cry1* e *Cry2*, *Rev-erba* e *Rora* que reconhecem elementos E-box cis nos seus promotores. As proteínas PER e CRY heterodimerizam e deslocam-se para o núcleo onde interagem com os heterodímeros BMAL1/CLOCK para inibir a sua transcrição. Posteriormente, o complexo PER e CRY degrada-se e os heterodímeros BMAL1/CLOCK iniciam um novo ciclo de transcrição. REV-ERBa inibe, enquanto RORα ativa a transcrição de *Bmal1*. A modificação pós-tradução e a degradação de proteínas relógio são passos cruciais no ciclo circadiano. A fosforilação do heterodímero PER/CRY pela CK1ε/δ permite que o circuito recomece de novo. Adaptada de Mohawk, Green et al. 2012.

1.5 Efeitos das hormonas sexuais no ritmo circadiano

Os efeitos das hormonas sexuais no ritmo circadiano têm sido extensivamente estudados ao longo da última década. Além do SCN controlar o padrão de secreção das hormonas sexuais, estas também exercem efeitos sobre a ritmicidade circadiana (Kriegsfeld e Silver 2006). Existem evidências que as diferenças entre géneros são importantes na determinação das respostas a fatores endógenos e exógenos e que têm implicações importantes na regulação do comportamento e fisiologia dos organismos (McCarthy, Arnold et al. 2012).

Muito do que se sabe acerca do efeito das hormonas sexuais no ritmo circadiano surgiu de estudos em ratos e ratinhos, onde se demonstrou que principalmente o estradiol (E_2) e a testosterona (T) são capazes de alterar o período e amplitude do ciclo circadiano. A gonadectomia (GDX) de ratos, tanto em machos como fêmeas, causa mudanças significativas em vários parâmetros fisiológicos e comportamentais. As alterações observadas são no entanto revertidas após a reposição hormonal e os ritmos circadianos são restabelecidos (Nakamura, Moriya et al. 2005, Iwahana, Karatsoreos et al. 2008, Karatsoreos, Butler et al. 2011).

Pouco se sabe acerca do efeito direto da T na expressão dos genes circadianos. No entanto, um estudo recente mostrou que a T influencia a expressão dos genes *clock* em células da próstata (Kawamura, Tasaki et al. 2014). Pelo contrário, tem-se dado mais importância ao efeito do E_2 no ritmo circadiano. O efeito do E_2 na expressão dos genes *clock* está descrito em vários tecidos centrais e periféricos, incluindo o SCN, o córtex cerebral, os ovários, o fígado, e os rins. O padrão de expressão dos genes *Per1* e *Per2* também mostrou diferenças entre os vários tecidos, mostrando a influência do E_2 nesses genes (Nakamura, Moriya et al. 2005, Nakamura, Sellix et al. 2010). Estas observações demonstram que os esteroides sexuais têm efeitos no ritmo circadiano, no entanto continua por esclarecer de que forma é que o SCN integra estas influências hormonais (Murphy, Pezuk et al. 2013).

Estudos recentes sugerem que o efeito das hormonas sexuais possa ser o resultado de ações indiretas destas hormonas em regiões aferentes ao SCN, e não diretamente sobre o SCN. Por conseguinte, foi demonstrado que o SCN carece de recetores de E_2 ($ER\alpha$ e $ER\beta$), embora haja alguma controvérsia entre estudos. Por esse motivo, o estudo do efeito do E_2 e outras hormonas no ritmo circadiano, tem-se focado principalmente em regiões extra-SCN, aferentes ao SCN, e que expressam mRNA ou proteína do ER (Karatsoreos e Silver 2007, Bailey e Silver 2014). Contrariamente, os recetores de androgénios (ARs) estão presentes maioritariamente no núcleo do SCN. A expressão dos ARs foi comprovada no SCN de várias espécies, incluindo a humana, no entanto os efeitos dos androgénios parecem variar mais entre espécies comparativamente aos do E_2 (Karatsoreos e Silver 2007, Karatsoreos, Butler et al. 2011). Como os ARs são abundantes no SCN, existem evidências de que o efeito dos androgénios no ritmo circadiano é o resultado da ação direta dos androgénios no SCN (Mong, Baker et al. 2011).

Em suma, as hormonas sexuais podem interagir com o oscilador circadiano central direta ou indiretamente, resultando em diferenças numa grande variedade de processos fisiológicos e comportamentais. Dado que as hormonas sexuais variam entre espécies, ao longo da vida e inclusive ao longo do dia estas podem ter um impacto significativo na organização interna do ritmo circadiano, podendo alterar a expressão dos genes *clock* tanto no SCN como nos osciladores periféricos (Murphy, Pezuk et al. 2013).

1.6 Disrupção do ritmo circadiano

O relógio circadiano permite aos organismos antecipar acontecimentos regulares que se repetem diariamente aproximadamente à mesma hora do dia, possibilitando assim que respostas fisiológicas e comportamentais adequadas possam ser induzidas no momento correto (Gamble, Resuehr et al. 2013). O ciclo luz/escuridão é o principal *zeitgeber* para a maioria dos organismos. A alternância entre luz e escuridão permite a correta sincronização dos osciladores circadianos, e tal sincronização interna é necessária para a adaptação dos organismos ao ambiente e para a homeostasia (Tapia-Osorio, Salgado-Delgado et al. 2013).

Dada a relevância dos ciclos circadianos na regulação de vários fatores, é de prever que uma desregulação em algum dos seus componentes, como por exemplo a dessincronização com o ambiente, possa conduzir ao desenvolvimento de diversas patologias. Estudos confirmaram que a disrupção da ritmicidade, quer por ablação cirúrgica do SCN, ou por exposição crónica a períodos de luz/escuridão constante, originou o rápido crescimento de tumores (Antoch, Gorbacheva et al. 2008).

O impacto do ritmo circadiano na saúde tem gerado grande interesse ao longo dos últimos anos e a disfunção circadiana é agora considerada como sendo um fator contributivo na incidência e severidade de uma variedade de condições patológicas, incluindo distúrbios de sono, cancro, diabetes, doenças cardiovasculares, depressão, síndrome metabólica e inflamação. Muitas das evidências vêm de estudos que mostraram uma forte associação entre essas doenças e o estilo de vida. A alteração da duração dos ciclos claro/escuro, a privação crónica do sono e as variações sazonais (*jet lag*) são exemplos de perturbações nos padrões circadianos normais (Bechtold, Gibbs et al. 2010).

Foi observado que pessoas que estão sujeitas a trabalho por turnos durante um longo período de tempo têm maior risco de incidência de cancro. O impacto direto na tumorigénese pode ser devido ao facto de que muitos genes que regulam o ciclo celular serem modulados pela atividade rítmica dos genes da via do ritmo circadiano. Por exemplo, sabe-se que os genes *Per* estão envolvidos na supressão tumoral e na reparação do DNA. Desta forma, alterações no padrão de expressão destes genes podem ter muitas implicações na saúde (Lahti, Partonen et al. 2008, Bechtold, Gibbs et al. 2010). Além do risco aumentado de incidência de cancro, há uma maior incidência de doenças no sistema imunitário e reprodutor, obesidade, diabetes, hipertensão, alterações hormonais e doenças cardiovasculares, devido à exposição irregular a ciclos de claro/escuro. A alimentação a horas incorretas também induz alterações metabólicas, pois altera a expressão de genes no fígado (Schroeder e Colwell 2013).

A disrupção dos ciclos de sono-vigília está também relacionada com doenças neurodegenerativas (doença de Huntington, Parkinson e Alzheimer) e alterações mentais, como ansiedade, depressão e bipolaridade (Videnovic e Golombek 2013).

2. Plexo coróide

2.1 Organização estrutural e morfologia

O CP é uma estrutura pequena e ramificada, localizada no sistema ventricular do cérebro, (Damkier, Brown et al. 2010) que forma uma interface única entre o sangue e o CNS (Strazielle e Gherzi-Egea 2000). Os CPs originam-se a partir de pregas da pia-máter altamente vascularizadas e revestidas por uma camada de células epiteliais, designadas por células endimárias, que se projetam para o interior dos ventrículos. As células endimárias são responsáveis pela produção do líquido cefalorraquidiano (CSF) que preenche as cavidades dos ventrículos. O CP está ligado a essas cavidades através de uma fenda estreita designada por fenda coróide (Mortazavi, Griessenauer et al. 2013).

Pela sua localização, podem distinguir-se dois CPs ventriculares localizados em cada um dos ventrículos laterais, um CP mediano localizado no teto do III ventrículo, e um CP no IV ventrículo (Serot, Zmudka et al. 2012). Os ventrículos laterais, localizados em cada um dos hemisférios cerebrais, comunicam com o III ventrículo através de uma estrutura denominada *Foramen* interventricular ou de *Monro*. O III ventrículo, localizado no diencéfalo entre os dois tálamos, é contínuo com o IV ventrículo através de um canal estreito, denominado aqueduto de *Sylvius*. Já o IV ventrículo atravessa o mesencéfalo e é contínuo com o canal central da medula espinal (Figura 4) (Skipor e Thiery 2008). Enquanto os CPs localizados nos ventrículos laterais apresentam uma estrutura semelhante a folhas finas onduladas, no IV ventrículo este tecido caracteriza-se por ser bastante lobulado e complexo, e o CP localizado no III ventrículo apresenta uma estrutura intermediária entre os outros (Wolburg e Paulus 2010).

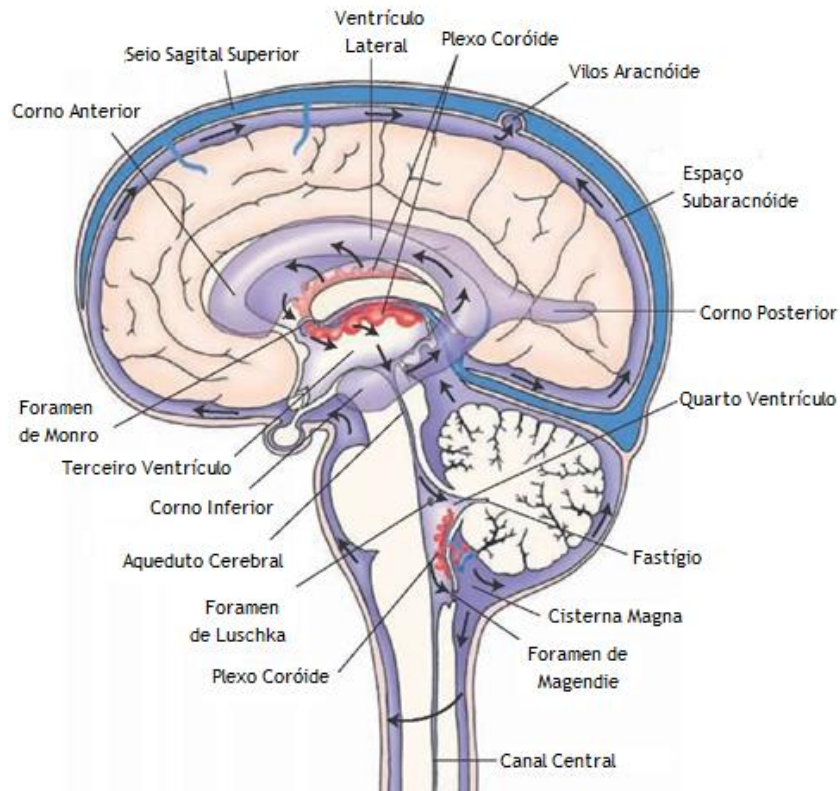


Figura 4. Localização dos plexos coróides (CPs) no sistema nervoso central humano.

Cada hemisfério cerebral possui um ventrículo lateral que comunica com o terceiro ventrículo através do *Foramen* interventricular ou de *Monro*, que por sua vez comunica com o quarto ventrículo através do aqueduto de *Sylvius*. No interior de cada ventrículo encontra-se um CP (adaptado de <http://what-when-how.com/neuroscience/meninges-and-cerebrospinal-fluid-gross-anatomy-of-the-brain-part-1/>).

Morfologicamente, cada CP é formado por uma única camada contínua de células epiteliais cuboides ou colunares, provenientes da parede endimária dos ventrículos. Estas células endimárias estão ligadas umas às outras através de *tight junctions* (TJs) que criam uma barreira física à passagem de determinadas moléculas do sangue para o CSF. A superfície apical (ventricular) das células epiteliais contém inúmeras vilosidades e cílios móveis, proporcionando uma extensa superfície de contato entre o CSF e o fluido intersticial do CP. A membrana basolateral localiza-se sobre a lâmina basal, sobre o estroma de tecido conjuntivo em contacto com os capilares. Esta superfície possui um aspeto liso e apresenta uma grande área de superfície, sendo responsável pelas trocas entre o sangue e o CP. É de salientar que os capilares que irrigam o CP são fenestrados, no entanto, apesar da passagem de moléculas e células ser possível através do estroma vascularizado, estas não chegam ao CSF devido às TJs entre o CP e as células epiteliais. Além dos capilares fenestrados, no estroma do CP também se encontram outras células associadas, como células dendríticas, macrófagos e fibroblastos (Figura 5). Estruturalmente, as células epiteliais contêm numerosas mitocôndrias, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático liso e lisossomas, o que demonstra que é uma estrutura com

grande capacidade de síntese (Marques, Correia-Neves et al. 2011, Marques, Sousa et al. 2013).

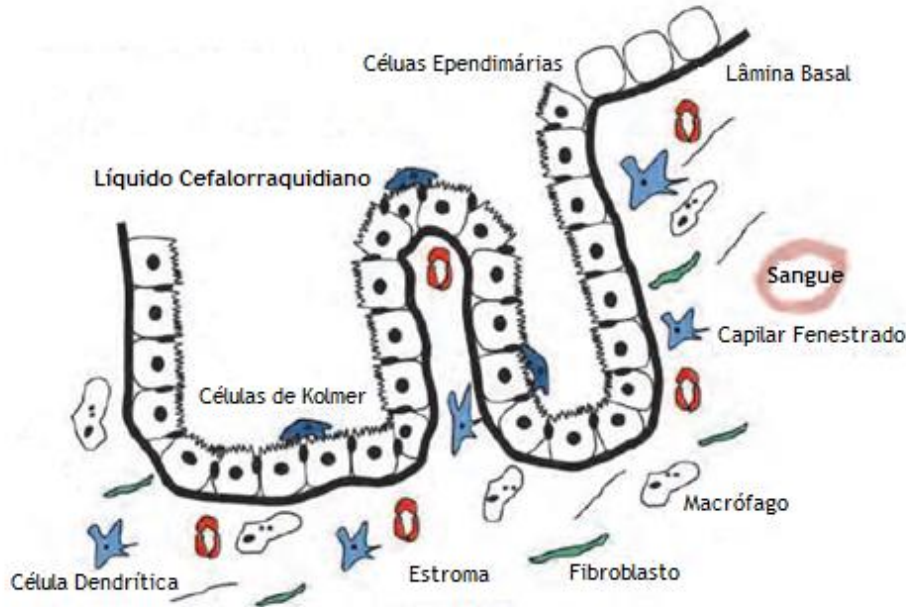


Figura 5. Morfologia do plexo coróide do IV ventrículo cerebral.

O CP é constituído por uma monocamada de células epiteliais unidas por *tight junctions* (TJs). A superfície apical destas células contém numerosas microvilosidades. A membrana basolateral apresenta uma superfície lisa e uma grande área de superfície, permitindo assim um contacto íntimo com os capilares. Este tecido possui no seu epêndima, capilares fenestrados e várias células associadas, como macrófagos, fibroblastos e células dendríticas. Adaptada de Marques, Sousa et al. 2013.

2.2 Funções

Devido à sua localização peculiar entre dois compartimentos de fluido circulante, o epitélio do CP está envolvido em numerosos processos que por um lado permitem suprir o cérebro com nutrientes e hormonas, e por outro eliminam compostos prejudiciais e produtos de excreção do cérebro (Strazielle e Gherzi-Egea 2000). Além da função de produzir o CSF e monitorizar as trocas entre o CSF e o tecido cerebral, produz e segrega proteínas e péptidos com propriedades nutritivas e neuroprotetoras (Krzyzanowska e Carro 2012).

Assim, o CP desempenha um papel crucial no metabolismo do cérebro, na função neuronal, em processos imunológicos e inflamatórios, na neuro-sinalização, neuroproteção e neurodegeneração (Janssen, van der Spek et al. 2013).

2.2.1 Produção e secreção de Líquido Cefalorraquidiano

O cérebro humano é um órgão frágil, no entanto encontra-se submerso no CSF que o protege de danos causados por impactos físicos no crânio e atua de modo a reduzir o seu peso em cerca de 25% (Redzic e Segal 2004).

É amplamente reconhecido que a maior fração do CSF é produzida pelo epitélio do CP, sendo responsável por cerca de 70% a 90% da produção de CSF (Praetorius 2007). No Homem, a taxa de formação do CSF é de aproximadamente 0,4 ml/min, bastante superior comparada à taxa de secreção de outros epitélios. Tal deve-se à estrutura do CP, que apresenta um ótimo suprimento sanguíneo. Os capilares do plexo são fenestrados e, por conseguinte, oferecem pouca resistência ao movimento de pequenas moléculas. Além disso, as células do CP possuem inúmeras vilosidades na membrana apical e um extenso pregueamento do lado basolateral, aumentando a área de superfície de contacto entre o epitélio e o fluido intersticial. O facto das células epiteliais do CP possuírem um grande número de mitocôndrias assegura a produção suficiente de adenosina trifosfato necessária para manter a secreção normal do CSF (Redzic e Segal 2004, Marques, Sousa et al. 2013).

A primeira etapa para a formação do CSF consiste na filtração passiva do plasma ultrafiltrado através do epitélio, que é facilitada pela pressão hidrostática. Durante a segunda fase de formação do CSF, o ultrafiltrado passa através do epitélio coróide para toda a superfície dos CPs, e posteriormente para dentro dos ventrículos. A secreção do CSF depende do transporte unidirecional de iões pelo endotélio do CP para os ventrículos, que é o grande responsável pela criação de um gradiente osmótico. Esse gradiente é regulado pelo transporte de iões Na^+ , Cl^- e HCO_3^- garantindo a concentração iónica necessária para o movimento da água (Sakka, Coll et al. 2011, Nabiuni, Shokohi et al. 2014).

No que se refere à composição do CSF, este apresenta uma menor concentração de proteínas, glucose, alguns iões e aminoácidos, comparativamente ao plasma. Além disso, difere do plasma pela presença de transportadores iónicos específicos e outros sistemas de transporte no epitélio do CP, responsáveis pelo movimento de substâncias entre o sangue e o CSF. Os transportadores e recetores permitem o transporte de açúcares, aminoácidos, vitaminas, péptidos e hormonas para o CSF, bem como a remoção de xenobióticos do CSF (Chen, Kassem et al. 2009). Por influenciar a composição do CSF, o CP desempenha um papel essencial na homeostasia cerebral (Marques, Sousa et al. 2013).

2.2.2 Síntese proteica

Devido à sua localização e estrutura, o CP permite a distribuição de moléculas importantes, através do CSF, para todo o cérebro. Tais moléculas incluem proteínas, lípidos, hormonas, glucose, péptidos bioativos, fatores de crescimento, citocinas e muitos outros metabolitos que influenciam múltiplas funções no CNS (Lehtinen, Bjornsson et al. 2013).

Entre as proteínas mais abundantes no CSF, encontram-se aquelas secretadas pelo CP, como a transtirretina (TTR), a transferrina, a vasopressina e a prostaglandina D2 sintetase. A produção da TTR no CP é essencial para o desenvolvimento do CNS e tem sido envolvida no metabolismo da beta-amiloide, um péptido relacionado com o desenvolvimento da doença de Alzheimer (Falcão, Marques et al. 2012). O epitélio do CP também secreta um número de fatores de crescimento envolvidos principalmente no crescimento celular e neurogénese. O fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento transformante β e os fatores de crescimento de fibroblastos são exemplos de fatores de crescimento produzidos pelo CP (Nabiuni, Shokohi et al. 2014).

Muitos destes neuropéptidos têm os seus recetores específicos localizados no CP e portanto podem atuar de forma autócrina e parácrina sobre as células epiteliais do CP. Por outro lado, as substâncias sintetizadas pelo CP e libertadas no CSF podem causar efeitos do tipo endócrino sobre células alvo no encéfalo (Skipor e Thiery 2008).

O CP expressa também recetores das hormonas sexuais, como ER α e ER β , de progesterona (P₄) e ARs, (Hong-Goka e Chang 2004, Quadros, Pfau et al. 2007, Alves, Gonçalves et al. 2009), o que evidencia que esta estrutura é um tecido alvo das hormonas esteroides. De facto, o efeito das hormonas esteroides é evidente no transcriptoma do CP de ratos fêmea e macho, uma vez que a GDX influencia a expressão de vários genes expressos pelo CP, nomeadamente a TTR, enzimas envolvidas no metabolismo dos xenobióticos e metabolismo do retinol. Estes resultados sugerem que as hormonas podem exercer mecanismos protetores no CP e modular a concentração de determinadas proteínas no CSF (Quintela, Gonçalves et al. 2013).

Dada a importância do CP e do CSF no funcionamento normal do CNS, estas proteínas têm sido amplamente estudadas em condições normais e patológicas, e por isso podem ser exploradas como possíveis marcadores de doenças neurológicas (Falcão, Marques et al. 2012).

2.2.3 Função protetora e imunológica

O CP desempenha um papel imunológico bastante importante no CNS pois forma uma barreira entre o sangue e o CSF protegendo dessa forma o parênquima cerebral contra compostos potencialmente nocivos. Além desta barreira física, existem também um conjunto de células imunes na superfície do CP, as células de *Kolmer*. À semelhança de outras células imunes, estas células apresentam funções fagocíticas e de apresentação antigénica (Maslieieva e Thompson 2014).

Além disso, as células epiteliais do CP também expressam citocinas pró inflamatórias tais como, interleucina 6, 8 e 1 β e fator de necrose tumoral α , em resposta a lesões cerebrais ou à presença de compostos tóxicos; e moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) I e II que estimulam a proliferação de linfócitos T quando reconhecem um antígeno (Moore e Oglesbee 2012).

O CP utiliza ainda um sistema de desintoxicação complexo, que impede a entrada de fármacos e compostos tóxicos para o cérebro. Desse sistema fazem parte um conjunto de enzimas metabólicas de fase I-III, como é o caso do citocromo P-450. Para além disso, o CP contém altas concentrações de glutathiona, cisteína e metalotioneínas, que sequestram agentes tóxicos em circulação no CSF; enzimas de proteção contra radicais livres e stress oxidativo, como a superóxido dismutase; sistemas de transporte de iões orgânicos e proteínas resistentes a multidrogas que permitem a exportação de compostos nocivos do CSF (Emerich, Skinner et al. 2005).

II. Objetivo

Um estudo de *microarrays* de cDNA, realizado previamente pelo nosso grupo de investigação, demonstrou a presença de vários genes associados à regulação do ritmo circadiano no CP de ratos fêmea e macho, sugerindo que este podia funcionar como um oscilador circadiano do cérebro (Quintela, Gonçalves et al. 2013). Além disso, um outro estudo recente mostrou que alguns desses genes, nomeadamente o Per1 e o Per2, são diferencialmente expressos entre machos e fêmeas (Quintela, Sousa et al. 2014), o que pressupõe que haja uma regulação do ritmo circadiano por parte das hormonas sexuais, principalmente pelo E₂. Tendo por base estes resultados, traçaram-se os seguintes objetivos:

- Confirmar a expressão dos genes da via do ritmo circadiano, Per1 e Per2, nas células epiteliais de plexo coróide (CPEC) de rato e analisar a sua expressão a diferentes horas;
- Estudar o efeito da administração do E₂ e da P₄ na expressão dos genes Per1 e Per2;
- Avaliar o papel do antagonista do E₂ na expressão dos genes Per1 Per2;
- Analisar o efeito da disrupção do ritmo circadiano na expressão dos genes Per1 e Per2.

III. Metodologia

1. Animais

Para a realização do presente trabalho foram utilizados ratos (*Rattus Norvegicus*) da estirpe *Wistar* recém-nascidos (com 3 a 5 dias) para culturas primárias de CPEC e ratos com aproximadamente 2 meses. As culturas primárias de CPEC foram utilizadas para o estudo do efeito do E₂ na regulação dos genes e proteínas Per1 e Per2, enquanto que os animais de 2 meses destinaram-se à experiência da disrupção do ritmo circadiano.

1.1 Cultura primária de células epiteliais de plexo coróide

Para a obtenção das CPEC foram utilizados ratos recém-nascidos (3 a 5 dias). Os CPs foram recolhidos dos ventrículos laterais e mantidos em tampão fosfato salino (PBS) até à sua digestão em PBS contendo 0,2% de *pronase* (Fluka, Seelze, Germany) a 37 °C durante 5 minutos.

Posteriormente, procedeu-se à centrifugação dos CPs a 410xg durante 2 minutos, rejeitou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Life Technologies, Inc., Paisley, UK) completo que contém 10% de soro fetal bovino (FBS, Biochrom AG, Berlin) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma, Saint Louis, USA). De seguida, as células foram digeridas mecanicamente (durante 1-2 minutos) e as células dissociadas foram lavadas com DMEM e ressuspenso em DMEM suplementado com fator de crescimento epidérmico (Sigma), insulina (Sigma) e citosina arabinosina C (Sigma). Posteriormente, semearam-se as células em placas de 12 poços com cerca de 1,5 mL de DMEM suplementado em cada poço e foram colocadas numa incubadora a 37°C com uma atmosfera de 5% CO₂. O meio de cultura foi substituído no dia seguinte e as células foram mantidas em cultura durante mais 4/5 dias.

1.1.1 Estímulo das CPEC com estradiol e progesterona

Com o objetivo de avaliar o efeito das hormonas, nomeadamente E₂ (Sigma) e P₄ (Sigma), na expressão dos genes da via do ritmo circadiano, Per1 e Per2, e na localização destas proteínas, as células em cultura foram tratadas com estas hormonas esteroides. Cada hormona, previamente dissolvida em etanol 99,9%, foi adicionada às células em quatro diferentes concentrações (0, 10, 100 e 500nM) e as células permaneceram em cultura por 24 horas.

A fim de avaliar se os possíveis efeitos das hormonas na expressão dos genes Per1 e Per2 são mediados pelo ER, o antagonista, ICI 182 780, foi utilizado nesta experiência. As células foram incubadas com e sem E₂ na presença ou ausência do ICI, um antagonista específico do ER α e do ER β . O ICI foi adicionado 1 hora antes do tratamento com E₂ na concentração de 500nM e as células foram mantidas novamente em cultura durante 24 horas. Posteriormente, as células foram recolhidas em 200 μ L de Trizol (Sigma-Aldrich), e guardadas a -80°C para posterior análise da expressão dos genes em estudo por PCR em tempo real. A mesma experiência foi realizada com a finalidade de avaliar alterações significativas na localização das proteínas PER1 e PER2 nas CPEC. Para isso, as células foram tratadas com E₂ e ICI, nas mesmas condições descritas anteriormente e procedeu-se à sua manipulação por imunocitoquímica (ICC).

1.2 Disrupção do ritmo circadiano

Nesta experiência foram utilizados 32 ratos (machos e fêmeas) de ± 2 meses de idade que foram manipulados e divididos em 2 grupos principais. Um dos grupos foi exposto a ciclos de escuridão constante (EE) enquanto o outro grupo esteve sob condições de luz constante (LL). Cada subgrupo era constituído por 8 machos e 8 fêmeas. Estes animais tiveram acesso a alimentação e a água *ad libitum*. Ao 3º dia de exposição à luz ou escuridão constante, os animais foram sacrificados com CO₂ e posteriormente decapitados. O sacrifício dos animais, no caso do grupo de animais expostos a ciclos de EE, ocorreu na ausência de luz de modo a não interferir nos resultados. Além disso, o sacrifício dos animais ocorreu de forma alternada entre machos e fêmeas, de forma a normalizar os resultados. Após o sacrifício dos animais, o cérebro foi retirado e os CPs dos ventrículos laterais foram recolhidos, congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C para posterior extração de RNA.

Num estudo anterior realizado pelo nosso grupo de investigação, um grupo de animais constituído por machos e fêmeas da mesma idade foi exposto a um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (L/E), em que a luz acendia às 7 horas e desligava às 19 horas. Como tal, esses animais foram utilizados como grupo controlo da experiência da disrupção do ritmo circadiano.

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

2. RNA total

2.1 Extração de RNA total

A principal preocupação na extração de RNA é a sua degradação por ação de ribonucleases (RNAses), enzimas presentes em vários materiais biológicos, que são extremamente resistentes a diversos tratamentos.

Tendo em conta a instabilidade da molécula de RNA, diversos cuidados devem ser tomados durante o processo de extração, a fim de minimizar os danos no RNA. Nas diversas técnicas de extração, tem-se empregado a utilização de agentes desnaturantes fortes que efetuam a lise celular e a inativação das RNAses. Além disso, a utilização de água dietilpirocarbonato (DEPC-inibidor de RNAses), materiais auto-clavados e luvas visam diminuir as contaminações. Por último, todo o procedimento deve ser realizado em gelo devido à sensibilidade térmica do RNA.

A extração do RNA total (RNAt) foi efetuada utilizando Trizol, uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que permite o rompimento celular e a dissolução de vários componentes celulares mantendo a integridade do RNA. Para extrair o RNAt das CPEC descongelaram-se as amostras previamente armazenadas a -80°C e deixaram-se durante 5 minutos à temperatura ambiente, para a completa dissociação de complexos de nucleoproteínas. Posteriormente, adicionou-se 40 μL de clorofórmio (200 μL de clorofórmio/ 1 mL de Trizol) a cada amostra e homogeneizou-se por inversão. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos e foram posteriormente centrifugadas 4°C a 12000g durante 15 minutos. Após centrifugação, obtiveram-se 3 fases: a fase orgânica (rosa) depositada no fundo do tubo que contém as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio; a interfase (esbranquiçada) onde está contido o DNA e a fase aquosa (transparente) onde está presente o RNA. Assim, a fase de interesse (fase aquosa) foi cuidadosamente recuperada para um novo tubo ao qual se adicionou 100 μL de isopropanol (500 μL de isopropanol / 1mL de Trizol) e misturou-se por inversão para permitir a precipitação do RNA. Após incubação das amostras à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugação a 4°C , 12000 g durante 10 minutos, o sobrenadante foi rejeitado. O RNA precipitado (*pellet*), depositado no fundo do tubo, foi lavado uma vez com 500 μL de etanol 75% em água DEPC (-20°C), centrifugou-se a 4°C durante 5 minutos a 7500g e rejeitou-se novamente o sobrenadante. Por fim, retirou-se o excesso de etanol e o precipitado de RNAt foi reidratado em 10 μL de água DEPC e guardado a -80°C para uso posterior.

2.2 Determinação da integridade do RNA total

Para verificar a integridade do RNAt extraído, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *Greensafe premium* (NzyTech, Portugal), agente intercalante de ácidos nucleicos. As soluções de deposição foram preparadas com 2 µL de amostra, 8 µL de H₂O estéril e 1 µL de *loading buffer* 10x e foram depositadas no gel. Para finalizar visualizou-se o gel sob luz ultravioleta no transiluminador, depois da eletroforese do gel ter corrido a 100V durante 30 minutos. A qualidade do RNA foi confirmada pela presença de 2 bandas de rRNA, 18S e 28S, onde esta última deve apresentar o dobro da intensidade da primeira. Caso o RNA esteja degradado, esta proporção de 2:1 não se verifica podendo observar-se arrastamento.

2.3 Quantificação do RNA total

A quantificação do RNAt foi realizada por espectrofotometria, utilizando o nanoespectrofotómetro (Nanophotometer™, Implen, Germany). Este equipamento fornece diretamente a concentração de RNAt (µg/µL) e o rácio entre A₂₆₀/A₂₈₀, que indica o grau de pureza do RNAt com base na leitura de absorvência a 260 e a 280 nm, comprimentos de onda aos quais os ácidos nucleicos e as proteínas têm pico de absorção, respetivamente. Considera-se que o RNAt está puro quando a razão entre as absorvências se encontrar no intervalo entre 1,8 e 2,1. Rácios inferiores a 1,8 indicam contaminação com proteínas ou com fenol, e os rácios superiores a 2,1 indicam contaminação com DNA.

3. Síntese de DNA complementar

A síntese do cDNA é realizada pela ação da enzima transcriptase reversa, uma enzima que tem a capacidade de produzir uma cópia exata dos genes expressos sem intrões, a partir do RNA mensageiro (mRNA). Para a atuação desta enzima, é necessária a presença de iniciadores de síntese (*primers*) cuja sequência vai condicionar a especificidade do fragmento amplificado. A transcrição reversa do mRNA no presente trabalho foi realizada usando o kit NZY M-MuLV First-Strand cDNA Synthesis (NzyTech, Portugal) seguindo as instruções do fabricante.

Para cada reação de síntese de cDNA de volume final 20 µL, adicionou-se em cada tubo o volume adequado para 500 ng de RNAt, 2 µL de *Random primers* (0,5 µg/µL), 1 µL de DNTP's (10 mM) e perpez-se o volume de 14 µL com água estéril livre de nucleases. Esta mistura foi incubada a 65 °C durante 5 minutos e imediatamente arrefecida em gelo. De seguida adicionou-se outra mistura composta por 2 µL de tampão RT (5xBuffer) e 1µL de MMLV RT a

cada tubo. Seguiu-se uma incubação a 37 °C durante 50 minutos e posteriormente a 70 °C durante 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -20 °C para posterior utilização.

4. PCR convencional

A expressão dos genes do ritmo circadiano, *Per1* e *Per2*, em CPEC foi analisada pela técnica de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa). A escolha dos *primers* (oligonucleótidos iniciadores) para cada gene foi efetuada através do programa Primer-Blast-NCBI-NIH. As sequências de *primers* específicos utilizadas foram as seguintes: *Per1*, *Fw*: 5'-AGC AGA GGG CGG GTC CAG TT-3' e *Rv*: 5'-TTA TTG GCC AGG GCG AGC GG-3'; *Per2*, *Fw*: 5'-CGC ACA CGC AAC GGG GAG TA-3' e *Rv*: 5'-AAC GCT GGG GTG CGG AGT CT-3'.

De forma a amplificar as sequências correspondentes aos mRNAs dos genes em estudo utilizou-se a Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Portugal), segundo as instruções do fabricante. Por cada reação adicionou-se 2,5 µL de 10x Buffer, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP's (10 mM), 1 µL de DMSO, 0,25 µL de BSA, 1,25 µL de W1, 0,2 µL de Taq DNA polimerase, 0,3 µL de primer *Fw* (25 µmol) e de primer *Rv* (25 µmol) respetivos a cada gene em estudo. Por fim, perfez-se com água estéril até um volume final de 23 µL. A cada reação adicionou-se 2 µL de cDNA, com exceção do negativo, ao qual se adicionou água estéril. A amplificação dos genes ocorreu num termociclador TProfessional Basic Gradient (Biometra) no qual as amostras foram colocadas inicialmente a 95 °C durante 5 minutos. Seguiram-se 40 ciclos nos quais as amostras foram primeiro expostas a 95 °C durante 30 segundos de forma a desnaturar a molécula de DNA; depois à temperatura ótima de emparelhamento de cada *primer* (60°C para o *Per1* e *Per2*), durante 45 segundos para que cada *primer* se possa ligar à molécula de DNA; a 72 °C durante 45 segundos para que ocorresse a fase de amplificação e por fim as amostras foram colocadas a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados por electroforese em gel de agarose 1,5% na presença de *Greensafe premium*. Além das amostras, foi também depositado no gel o marcador de peso molecular HipperLadder II (Bioline). Após visualização do gel no transiluminador e confirmado o peso molecular de cada banda, os produtos devidamente amplificados foram sequenciados e foi confirmada a identidade das amplificações.

5. PCR em tempo real

A quantificação da expressão dos genes da via do ritmo circadiano, *Per 1* e *Per 2*, foi efetuada por PCR em tempo real, utilizando o Kit Maxima SYBR®Green/ROX (Fermentas). De forma a otimizar o procedimento e a eficiência da reação foram efetuadas uma série de diluições para cada gene. O gene da ciclofilina A foi utilizado como controlo endógeno para normalizar os níveis de expressão dos genes em questão. Todas as experiências de PCR em tempo real foram efetuadas em duplicado utilizando o software iCycler Iq™ (Bio-Rad).

Cada reação de amplificação dos genes da via do ritmo circadiano e da ciclofilina A foram preparadas para um volume final de 20 μL , constituído por 10 μL de *Syber green*, 0,8 μL de *Primer Fw* e de *Primer Rv* (diluídos de 1:20), 2 μL de cDNA e por água estéril a perfazer o volume total. As amostras foram expostas às seguintes condições de amplificação: 95°C durante 3 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos.

A amplificação dos transcritos específicos foi confirmada pela análise da curva de *melting* do PCR em tempo real. Esta permite avaliar a formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto amplificado. Os níveis relativos de expressão dos genes em estudo foram calculados pelo método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Pfaffl 2001). No final, os dados foram tratados estatisticamente utilizando o software GraphPad através do teste estatístico ANOVA (teste de Bonferroni), com resultado estatístico significativo quando $p < 0,05$.

6. Imunocitoquímica por fluorescência

A ICC é uma técnica que permite a deteção e localização celular de proteínas específicas, utilizando anticorpos específicos. O método utilizado baseia-se na utilização de um anticorpo primário específico para a proteína em estudo e de um anticorpo secundário ligado a uma molécula fluorescente, ocorrendo emissão de fluorescência quando há interação entre os anticorpos.

Esta técnica foi realizada em CPEC mantidas durante 4/5 dias em cultura. Para a marcação das proteínas do ritmo circadiano, nomeadamente PER1 e PER2, as CPEC foram lavadas com PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com PFA 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à permeabilização das células, incubando as CPEC com uma solução de 1% Triton X-100 em PBS durante 5 minutos. Após as lavagens com PBS, as células permeabilizadas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com uma solução de bloqueio, constituída por PBS-T 0,1% e 20% de FBS. De seguida, as células foram lavadas com PBST 0,1% e incubadas com o anticorpo primário anti-Per1 (Santa Cruz Biotechnology) e anti-Per2 (Santa Cruz Biotechnology) diluídos de 1:50 em PBST 0,1% com 1% de FBS, *overnight* a 4°C. Decorrido o tempo de incubação, lavaram-se as células 6 vezes com PBS-T 0,1% e incubaram-se com o anticorpo secundário Alexa fluor 488 *goat anti-rabbit* (H+L, Molecular Probes) diluído de 1:1000 na solução de diluição de anticorpos, durante 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Para a marcação do núcleo, lavaram-se novamente as células 6 vezes com PBS-T 0,1% e incubaram-se com DAPI numa diluição de 1:1000 durante 10 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após algumas lavagens, procedeu-se à montagem das lamelas utilizando o meio de montagem Entellan (Merck). As imagens foram obtidas com um microscópio confocal LSM 710 (Axio Imager) e processadas no programa Zen 2011 (Zeiss, Alemanha).

7. *Whole-mount*

À semelhança da ICC, a técnica de *whole-mount* permite detetar a localização e distribuição de determinada proteína na célula, com a diferença desta técnica ser realizada no tecido.

Nesta experiência foram utilizados ratos *Wistar* recém-nascidos (com 3 a 5 dias) aos quais se retiraram os CPs e se colocaram numa placa de 24 poços em PFA 4% durante 90 minutos à temperatura ambiente. De seguida, os CPs foram incubados com uma solução de sacarose 30% até depositarem. Posteriormente, os CPs permaneceram *overnight* a 4°C com a solução de bloqueio 2,5% BSA 0,2% Triton. Decorrido o tempo, efetuaram-se algumas lavagens e incubaram-se os CPs com os anticorpos primários anti-Per1 e anti-Per2 (Santa Cruz Biotechnology) *overnight* a 4°C diluídos de 1:100 na solução de bloqueio. Seguidamente, os CPs foram lavados e incubados durante 90 minutos com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 *goat anti-rabbit*, diluído de 1:1000 (H+L, Molecular Probes) à temperatura ambiente e no escuro. Realizaram-se novas lavagens com PBS-T 0,1% e incubou-se com DAPI diluído de 1:1000 durante cerca de 20 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Por fim, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck), observadas e fotografadas num microscópio confocal LSM 710 (Axio Imager).

IV. Resultados

1. Presença dos genes da via do ritmo circadiano Per1 e Per2 e respectivas proteínas no plexo coróide de rato

1.1 Análise da expressão dos genes Per1 e Per2 em células epiteliais de plexo coróide de rato

A expressão dos genes da via do ritmo circadiano Per1 e Per2 foi confirmada através da técnica de PCR convencional (RT-PCR), permitindo a amplificação de sequências específicas dos genes em causa. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose na presença de *Green Safe* e confirmou-se que os fragmentos tinham o tamanho esperado por comparação com o marcador de peso molecular, HiperLadder II. Na figura 6 estão representados, da esquerda para a direita, o marcador (M), o controlo negativo (N) e o fragmento de cada gene de interesse. O fragmento representado em a) diz respeito ao gene Per1 e apresenta um peso molecular de 133 pb, e o fragmento representado em b) corresponde ao gene Per2 e possui um peso molecular de 177 pb.

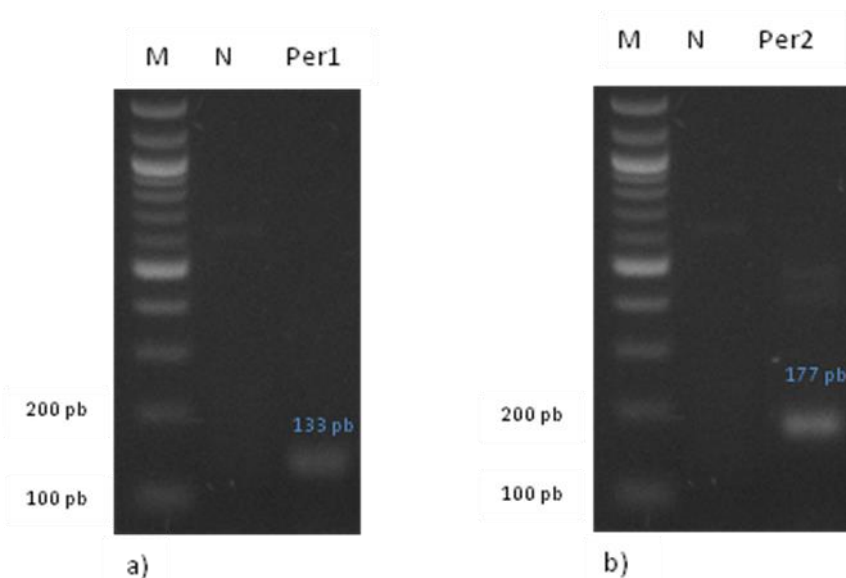


Figura 6. Expressão de mRNA dos genes da via do ritmo circadiano Per1 e Per2 em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato. Em cada imagem encontra-se representado, o marcador (M), o controlo negativo (N) e o fragmento do gene em causa: em a) está ilustrado o fragmento do gene Per1 com 133 pb e em b) o fragmento do gene Per2 com 177 pb.

Os produtos amplificados foram purificados, sequenciados, e posteriormente analisados no programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A identidade das sequências correspondentes aos genes analisados foi confirmada, observando-se homologia para cada um dos genes de 100% em comparação com as sequências da base de dados de *Rattus norvegicus*. Deste modo comprovou-se a expressão de mRNA destes genes em CPEC.

1.2 Localização das proteínas PER1 e PER2 no plexo coróide de rato

A técnica de *Whole-mount* permitiu identificar e localizar as proteínas PER1 e PER2 no CP de rato. Os CPs foram incubados com os respectivos anticorpos primários, à exceção do controlo negativo, e posteriormente incubados com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488, que emite fluorescência no comprimento de onda do verde. Além disso, os núcleos dos tecidos foram ainda marcados com DAPI, que emite fluorescência no comprimento de onda do azul. Ambas as proteínas estão presentes tanto no citoplasma como no núcleo das células (Figura 7A e 7B). No entanto, a marcação com o anticorpo anti-Per2 mostrou uma marcação mais ténue e difusa em comparação com a marcação com o anticorpo anti-Per1. No controlo negativo não se verificou qualquer marcação (Figura 7C).

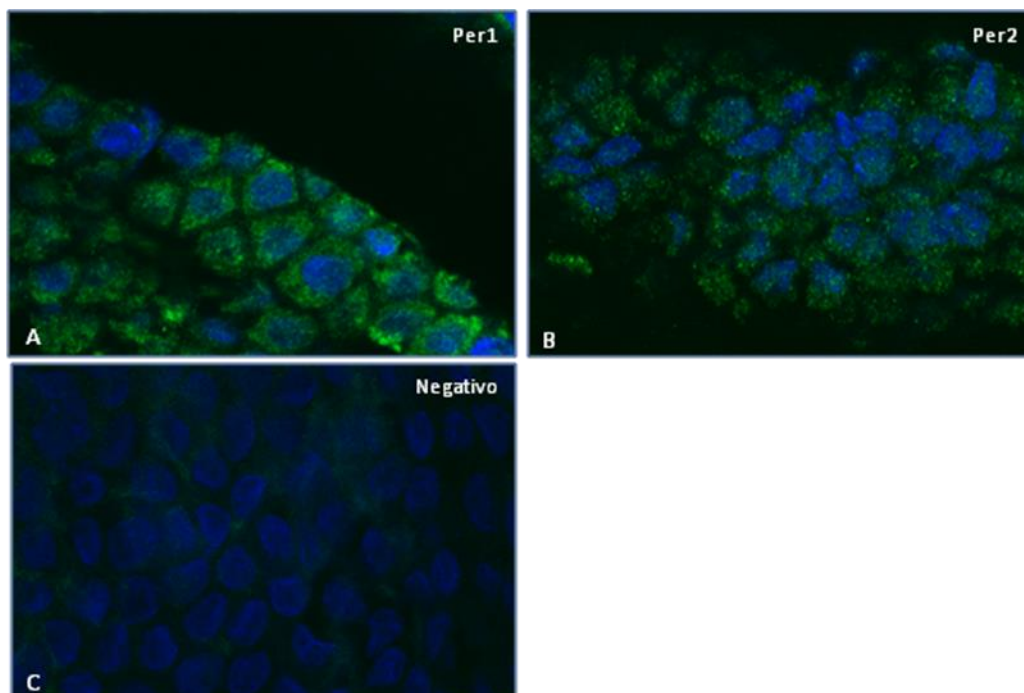


Figura 7. Imunofluorescência das proteínas PER1 e PER2 no plexo coróide (CP) de rato. As imagens representam os CPs de rato incubados com os anticorpos primário para o Per1 (A) e Per2 (B), e posteriormente incubados com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e DAPI. A imagem (C) representa o controlo negativo apenas com omissão do anticorpo primário. Todas as imagens foram obtidas numa ampliação de 63x.

2. Regulação dos níveis de Per1 e Per2 nas células epiteliais de plexo coróide de rato

2.1 Oscilações diárias da expressão dos genes Per1 e Per2

De forma a avaliar se a expressão dos genes Per1 e Per2 nas CPEC está sujeita a oscilações diárias, recolheram-se as CPEC em intervalos de 6 horas (08:00, 14:00, 20:00 e 02:00) e analisou-se a expressão dos genes Per1 e Per2 por PCR em tempo real.

Os níveis de mRNA de Per1 mantiveram-se praticamente constantes ao longo do período em estudo, não mostrando variações estatisticamente significativas (Figura 8). Contrariamente, os níveis de mRNA de Per2 mostram oscilações ao longo do ciclo circadiano (Figura 9), verificando-se diferenças com significado estatístico entre as 08:00 e as 20:00 horas ($p < 0.01$).

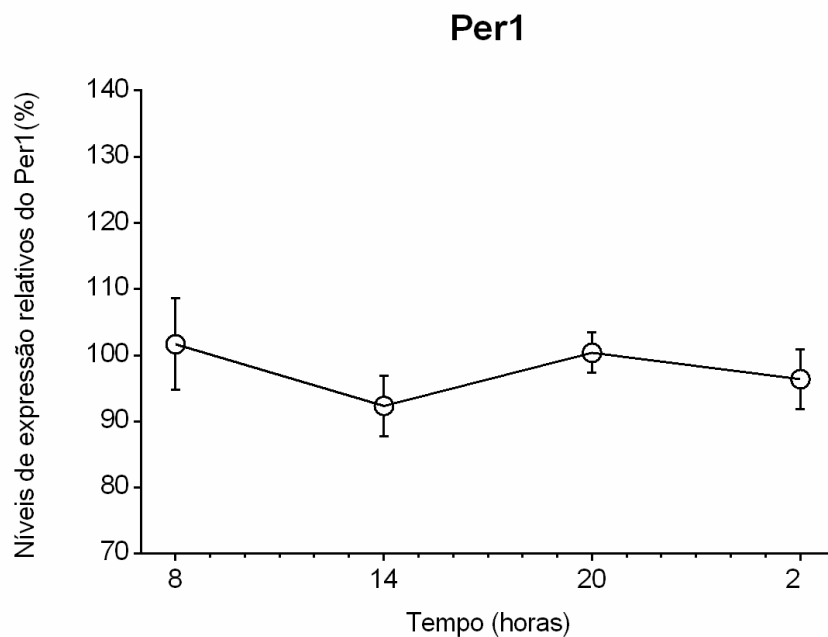


Figura 8. Variação da expressão do mRNA de Per1 em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato a diferentes horas. Cada ponto de dados representa a média \pm SEM (n=6-9). Os dados foram analisados através do software Graphpad (ANOVA, teste Bonferroni). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na expressão do mRNA de Per1 às diferentes horas.

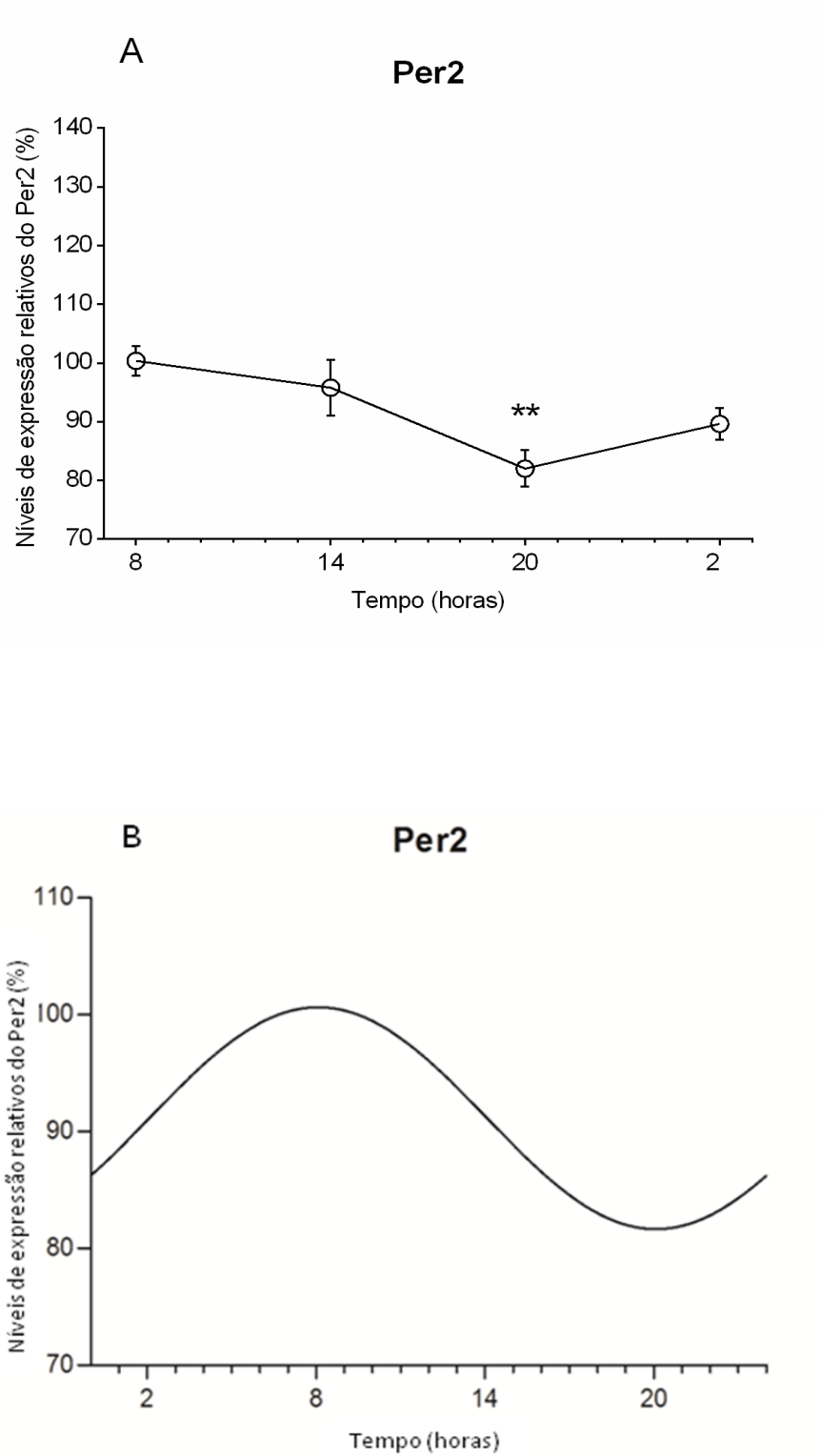


Figura 9. Variação da expressão do mRNA de Per2 em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato a diferentes horas. Cada ponto de dados representa a média \pm SEM (n=6-9). As oscilações nos níveis de mRNA verificadas foram analisadas recorrendo ao software Graphpad (ANOVA, teste Bonferroni) (A) onde ** representa a diferença estatisticamente significativa entra as 08:00 e as 20:00 horas ($p < 0.01$) e recorrendo ao software CircWave (B) ($p < 0.05$).

2.2 Efeito do estradiol na expressão dos genes Per1 e Per2

Estudos anteriores mostraram que os genes Per1 e Per2 são diferencialmente expressos no CP de ratos machos e fêmeas, o que pressupõe que haja uma regulação do ritmo circadiano por parte das hormonas sexuais, principalmente pelo E₂. Desta forma, a expressão do mRNA de Per1 e Per2 foi analisada por PCR em tempo real após tratamento das CPEC com E₂ a diferentes concentrações: 0, 10, 100 e 500nM durante 24 horas. As diferenças na expressão do mRNA foram comparadas entre os diferentes grupos, observando-se um aumento gradual na expressão tanto de Per1 como de Per2 (Figura 10A e 10B). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre o grupo controlo (0nM) e o grupo tratado com 500nM de E₂ para ambos os genes ($p < 0.05$).

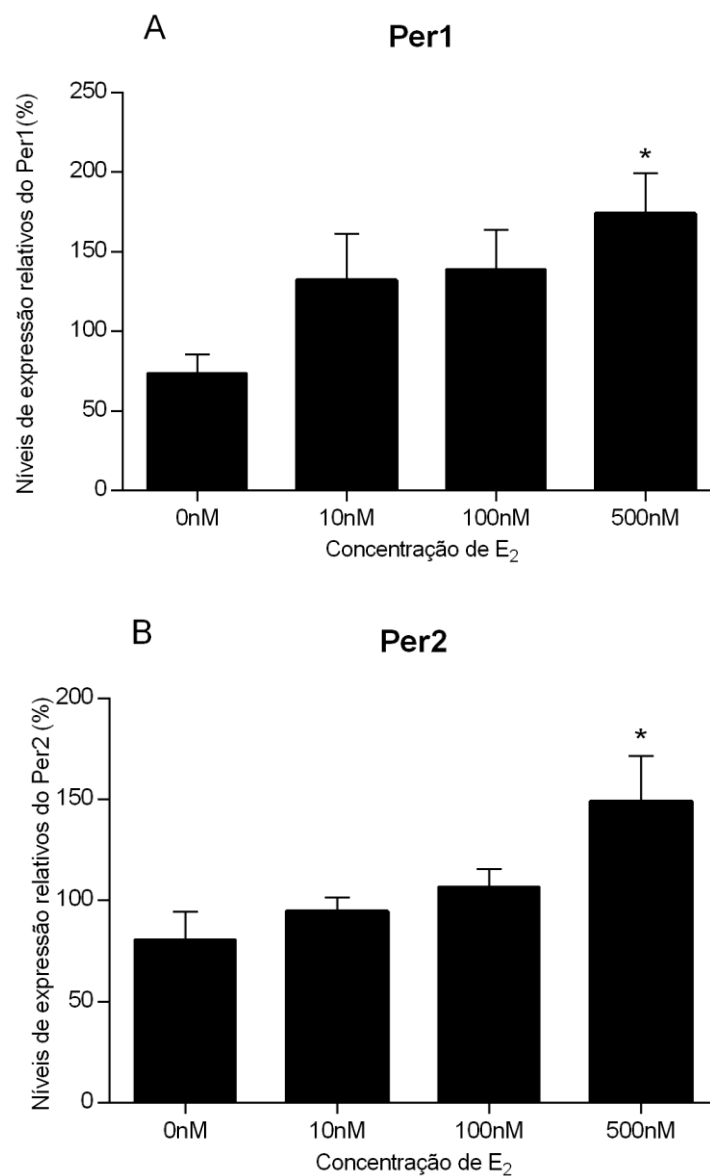
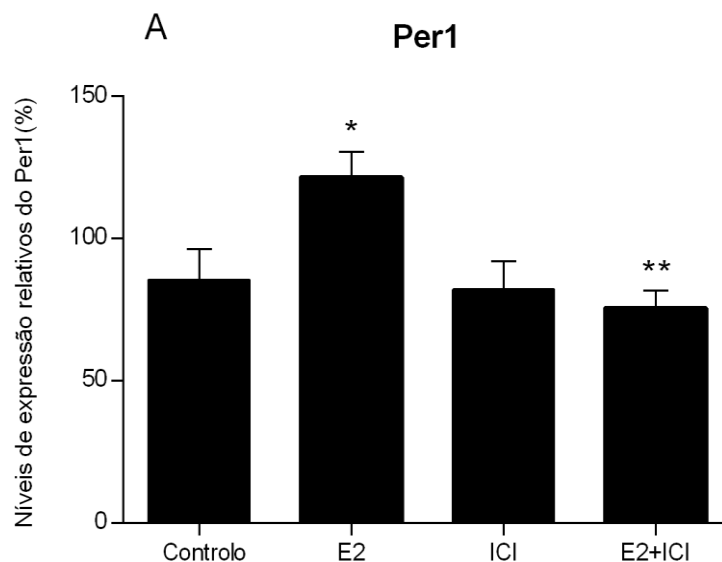


Figura 10. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per1 (A) e Per2 (B) em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato após estímulo com estradiol (E₂) a diferentes concentrações (0, 10, 100 e 500nM) durante 24 horas. Cada barra de dados representa a média \pm SEM (n=6-9).

* representa a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo (0nM) e o grupo tratado com E₂ (500nM; p <0.05). Os dados foram analisados através do software Graphpad (ANOVA, teste Bonferroni).

2.3 Efeito do antagonista do recetor de estradiol na expressão dos genes Per1 e Per2

O antagonista do recetor de E₂, o ICI 182 780, foi utilizado com o objetivo de avaliar se os efeitos do E₂ na expressão de Per1 e Per2 são mediados pelo ER. Assim, a expressão destes genes foi analisada 24 horas após tratamento das CPEC com E₂ (500nM) e com E₂ e o seu antagonista (500nM). A expressão de mRNA de Per1 e Per2 foi comparada entre o grupo controlo (0nM), o grupo tratado com E₂ (500nM), o grupo tratado apenas com o antagonista, e entre o grupo tratado simultaneamente com E₂ e o antagonista (500nM). Para ambos os genes verificou-se um decréscimo na expressão de mRNA após tratamento com o antagonista do ER. Observam-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo (0nM) e o grupo tratado com E₂ (500nM), p<0.05, e entre este último e o grupo tratado com E₂ e o antagonista (500nM), p<0.01. Além disso, não se verificaram diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo tratado com ICI (Figura 11A e 11B).



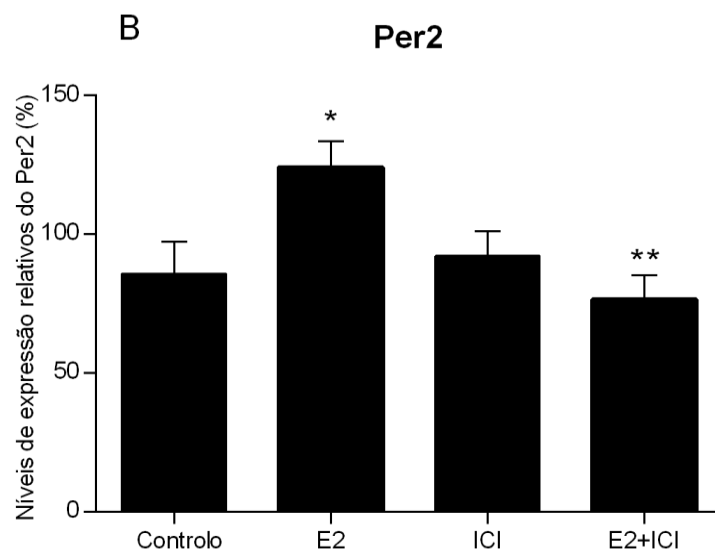


Figura 11. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per1 (A) e Per2 (B) em células epiteliais do plexo coróide (CPEC) de rato após estímulo com estradiol (E₂) (500nM), ICI e E₂ com ICI (500nM). Cada barra de dados representa a média ± SEM (n=6-9). * representa a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo (0nM) e o grupo tratado com E₂ (500nM) (p <0.05) e ** representa a diferença estatisticamente significativa entre esse mesmo grupo e o grupo tratado simultaneamente com E₂ e ICI (p<0.01). Os dados foram analisados através do software Graphpad (ANOVA, teste Bonferroni).

2.4 Efeito do estradiol e do seu antagonista na localização das proteínas PER1 e PER2

Para estudar o efeito da administração de E₂ na localização das proteínas PER1 e PER2, incubaram-se as CPEC com E₂ (500nM) durante um período de 24 horas. As diferenças de fluorescência foram analisadas por comparação entre o grupo de células tratadas com E₂ e um grupo controlo onde as células foram incubadas apenas com o veículo (Figura 12A). No caso das proteínas PER1, observa-se um aumento na intensidade de fluorescência na região do núcleo, após o estímulo com E₂, (Figura 12B). De forma semelhante ao realizado anteriormente, o ICI 182 780 foi utilizado no sentido de avaliar se os efeitos observados pela administração de E₂ são mediados pelo ER (Figura 12D). Um grupo de células foi ainda incubado apenas com o antagonista de forma a determinar se este teria algum efeito na localização das proteínas em estudo e na intensidade de fluorescência, o que não se verificou (Figura 12C).

As imagens A-D mostram as células marcadas apenas com o anticorpo específico (anti-Per1), onde se observa claramente uma diminuição da fluorescência na região nuclear após a administração do antagonista do ER (Figura 12D). Para comprovar a especificidade da marcação, fez-se um controlo negativo onde se omitiu a incubação com o anticorpo primário, não se verificando qualquer marcação como se pode observar na imagem da Figura 12E.

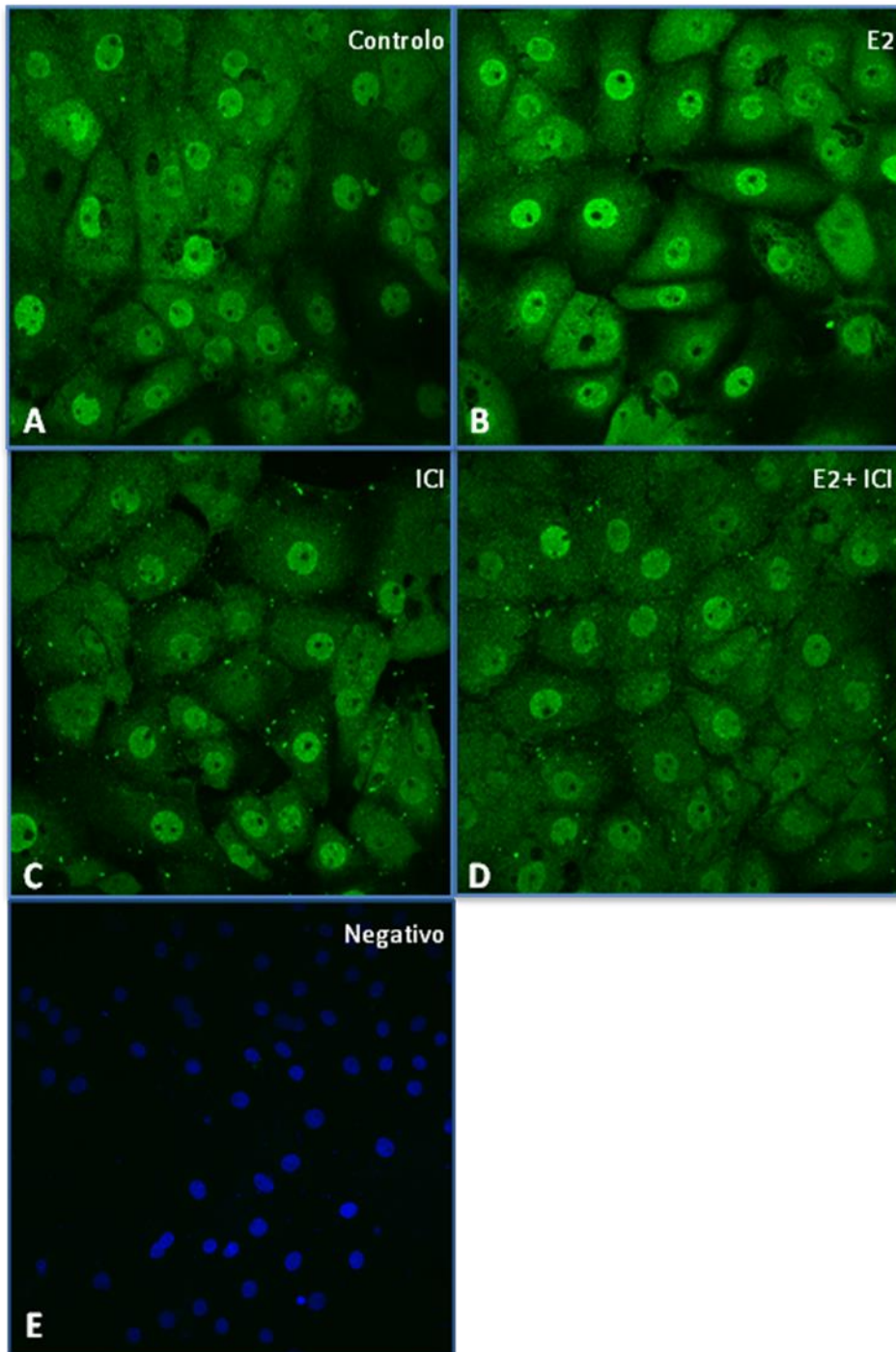


Figura 12. Imunofluorescência da proteína PER1 em células epiteliais de plexo coróide (CPEC) de rato com o anticorpo Per1. As imagens representam as CPEC incubadas com o anticorpo primário Per1. A imagem (A) diz respeito ao grupo controlo, a (B) ao grupo tratado com estradiol (E_2), a (C) à incubação com ICI e a (D) diz respeito às células incubadas com E_2 mais ICI. A última imagem (E) representa o controlo negativo da experiência, onde se marcaram as células apenas com anticorpo secundário e DAPI. Todas as figuras foram obtidas numa ampliação de 63x.

Contrariamente, no caso da proteína PER2 não se verificou qualquer alteração na fluorescência após o estímulo com E_2 (Figura 13B), ICI (Figura 13C) e com E_2 mais ICI (Figura 13D).

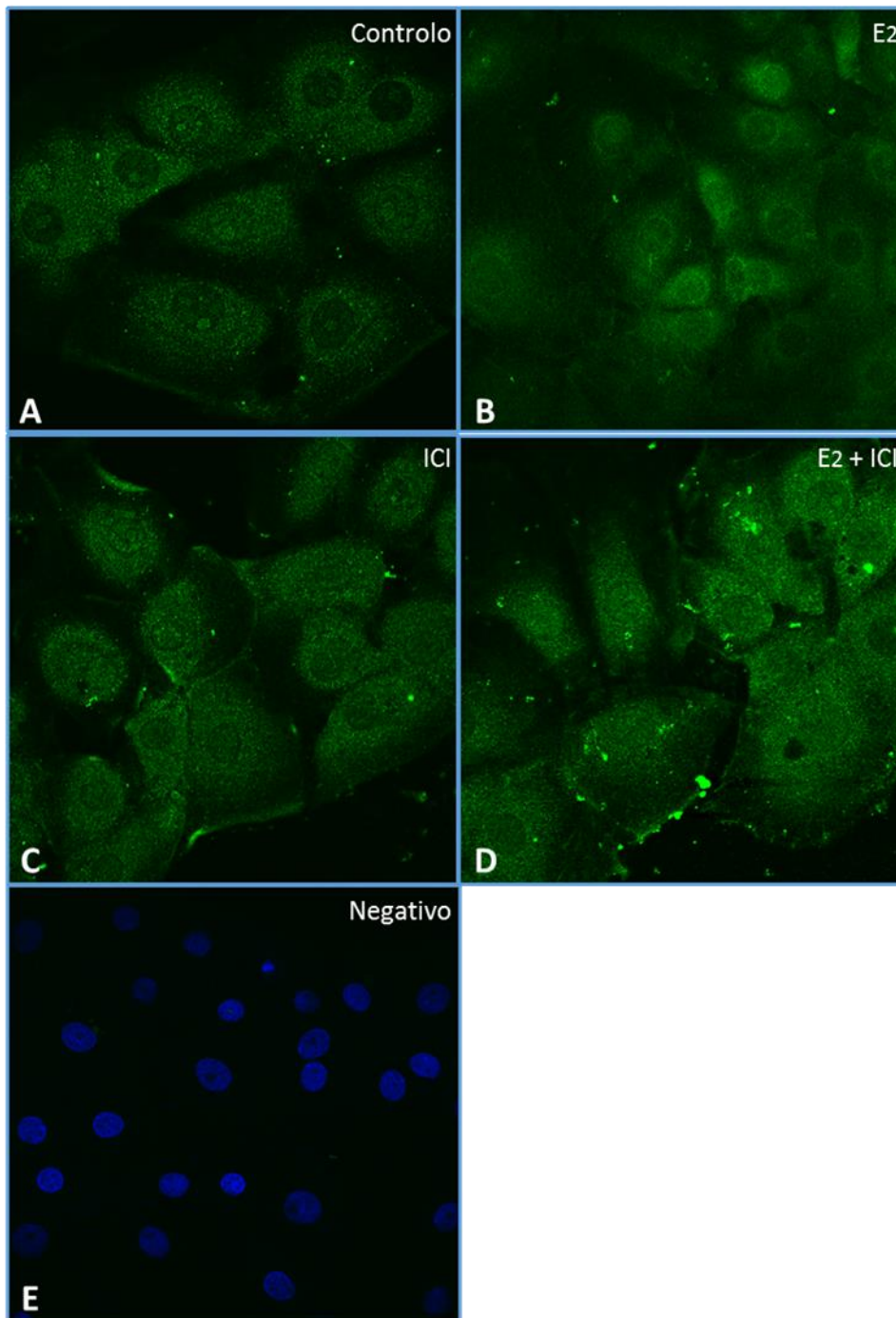


Figura 13. Imunofluorescência da proteína PER2 em células epiteliais de plexo coróide (CPEC) de rato com o anticorpo Per2. As imagens representam as CPEC incubadas com o anticorpo primário Per2. A imagem (A) diz respeito ao grupo controlo, a (B) ao grupo tratado com estradiol (E_2), a (C) à incubação com ICI e a (D) diz respeito às células incubadas com E_2 mais ICI. A última imagem (E) representa o controlo negativo da experiência, onde se marcaram as células apenas com anticorpo secundário e DAPI. Todas as figuras foram obtidas numa ampliação de 63x.

2.4.1 Quantificação de fluorescência- Efeito do antagonista do recetor de estradiol na localização da proteína PER1

De forma a comprovar os resultados observados anteriormente por ICC, a intensidade da fluorescência observada na região nuclear das células foi quantificada recorrendo ao software ImageJ. Os resultados obtidos comprovam o observado anteriormente (Figura 12), mostrando que essas diferenças são estatisticamente significativas (Figura 14).

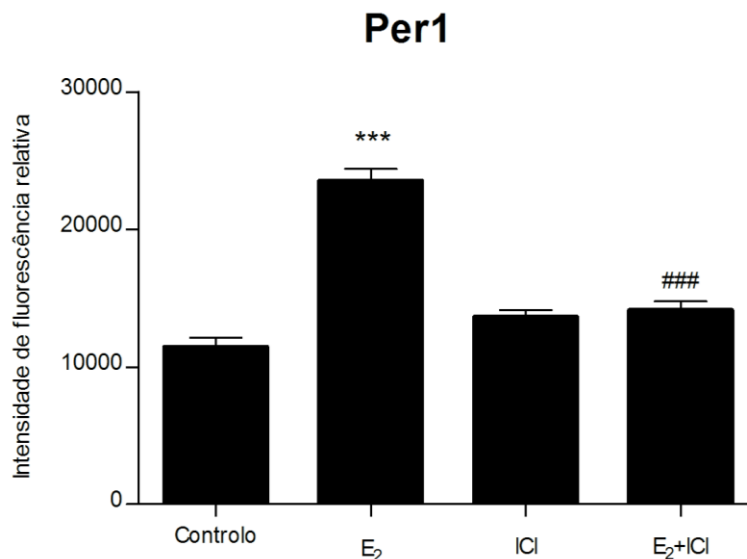


Figura 14. Quantificação da intensidade de fluorescência do núcleo das células epiteliais de plexo coróide (CPEC) de rato. Cada barra de dados representa a média ± SEM (n=10-20). *** representa a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo tratado com estradiol (E₂) (p <0.001); ### denota a diferença estatisticamente significativa para o grupo tratado simultaneamente com E₂ e ICI quando comparado com o grupo tratado com E₂ (p<0.001). Não se verificaram diferenças entre o grupo controlo e o grupo tratado com ICI. Os dados foram analisados através do software Graphpad (ANOVA, teste Bonferroni).

2.5 Efeito da progesterona na expressão dos genes Per1 e Per2

À semelhança do estudo efetuado com o E₂, também o efeito da P₄ na expressão dos genes Per1 e Per2 foi analisado. Para tal, usaram-se as mesmas concentrações utilizadas anteriormente (0, 10, 100 e 500nM) e compararam-se os níveis de mRNA expresso nos diferentes grupos. Contrariamente ao observado com o E₂, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada após a administração da progesterona, para nenhum dos genes (Figura 15A e 15B).

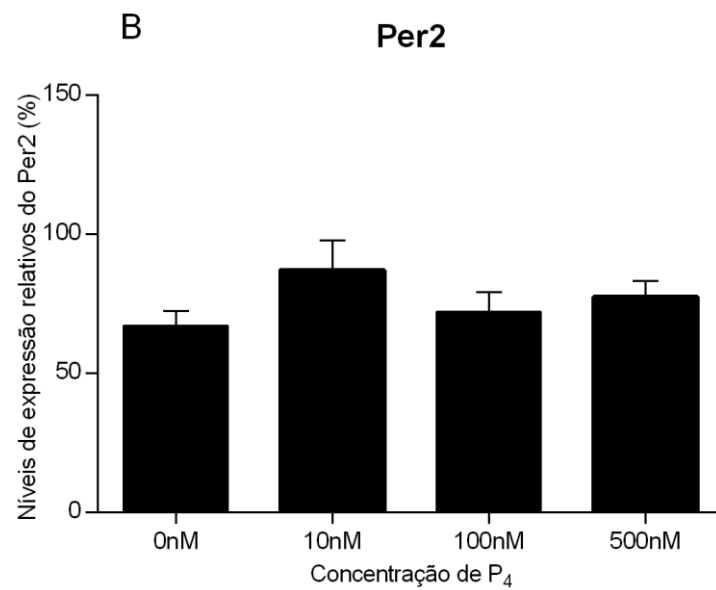
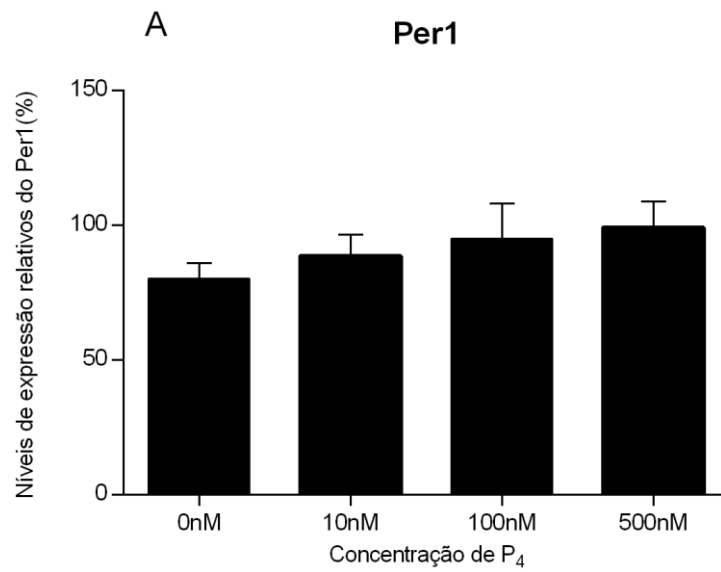
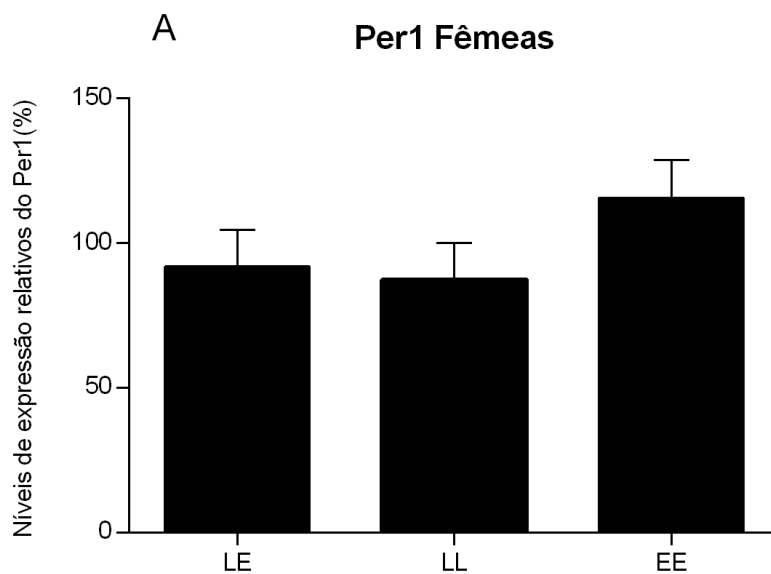


Figura 15. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per1 (A) e Per2 (B) em células epiteliais de plexo coróide (CPEC) de rato após estímulo com progesterona (P₄) a diferentes concentrações (0, 10, 100 e 500nM) durante 24 horas. Cada barra de dados representa a média ± SEM (n=6-9). Não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com P₄. Os dados foram analisados através do software Graphpad (ANOVA, teste Bonferroni).

3. Efeito da interrupção circadiana na expressão dos genes Per1 e Per2

Com o objetivo de avaliar se a interrupção do ritmo circadiano tem efeito na expressão dos genes Per1 e Per2, analisou-se a sua expressão após exposição prolongada (3 dias) de ratos machos e fêmeas a condições de luz (LL) ou escuridão constante (EE). Cada grupo de animais exposto a cada uma das condições era constituído por 8 ratos machos e 8 ratos fêmeas. A análise dos resultados baseou-se nas diferenças de expressão entre o grupo exposto às condições descritas anteriormente e o grupo controlo, exposto a um fotoperíodo normal (12 horas luz: 12 horas escuro).

Relativamente ao Per1, apenas se verificaram alterações significativas nos níveis de expressão de mRNA no caso dos machos, onde se verifica um aumento da expressão de Per1 após exposição a ciclos de escuridão constante (Figura 16B). Nas fêmeas não se verificaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 16A).



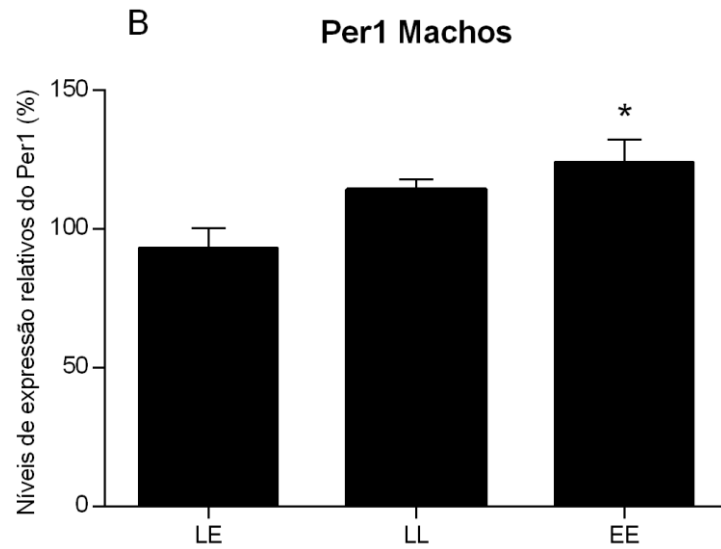
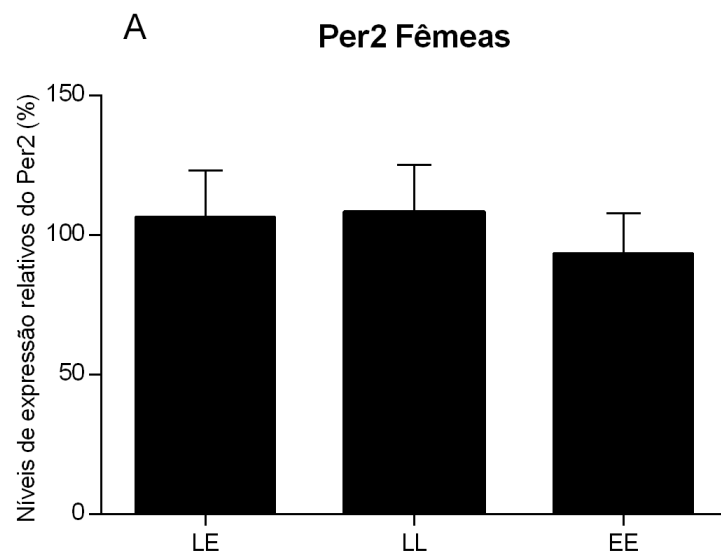


Figura 16. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per1 em plexo coróide (CP) de ratos fêmea (A) e macho (B) após exposição a ciclos de luz e escuridão constante. Cada barra de dados representa a média \pm SEM (n=6-9). * representa a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (LE) e o grupo exposto a ciclos de escuridão constante (EE) ($p < 0.05$). Os dados foram analisados através do software Graphpad (ANOVA, teste Bonferroni).

Quanto ao Per2, não se verificaram diferenças de expressão estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos, quer em machos quer em fêmeas (Figura 17A e 17B).



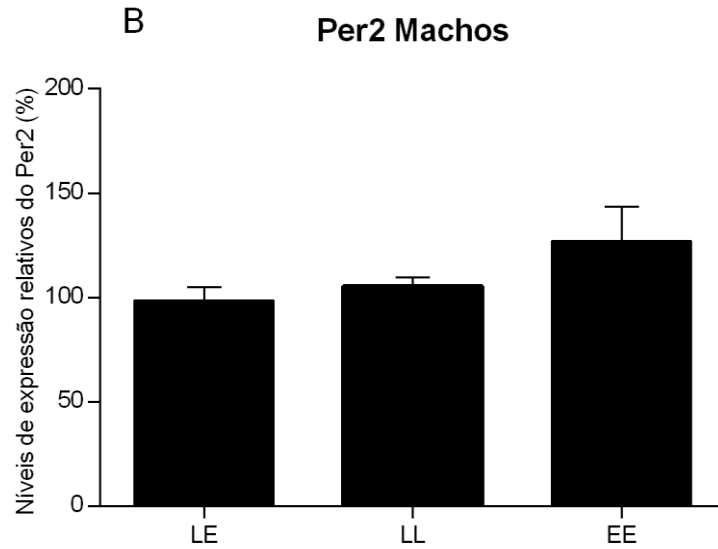


Figura 17. Diferenças nos níveis de expressão de mRNA de Per2 em plexo coróide (CP) de ratos fêmea (A) e macho (B) após exposição a ciclos de luz e escuridão constante. Cada barra de dados representa a média \pm SEM (n=6-9). Os dados foram analisados através do software Graphpad (ANOVA, teste Bonferroni). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos, quer em machos quer em fêmeas.

V. Discussão

Alguns genes associados à regulação do ritmo circadiano foram identificados no CP de ratos fêmea e macho num estudo de *microarrays* de cDNA, realizado previamente pelo nosso grupo de investigação (Quintela, Gonçalves et al. 2013). Este estudo sugeriu que o CP poderia funcionar como um oscilador circadiano, tal como outros osciladores presentes no CNS (Guilding e Piggins 2007). Além disso, um outro estudo recente mostrou que alguns desses genes, nomeadamente o *Per1* e o *Per2*, são expressos diferencialmente entre machos e fêmeas (Quintela, Sousa et al. 2014) e apresentam oscilações diárias de expressão, o que pressupõe que haja uma regulação do ritmo circadiano por parte das hormonas sexuais, principalmente pelo E_2 .

O efeito das hormonas sexuais na modelação do ritmo circadiano tem sido intensivamente estudado. Tanto nas fêmeas como nos machos, as hormonas esteroides são responsáveis pela consolidação da atividade locomotora e influenciam os ciclos sono-vigília (Kriegsfeld e Silver 2006, Mong, Baker et al. 2011). No entanto, falta compreender de que forma o SCN integra essa informação hormonal. Sabe-se que o SCN carece de recetores de E_2 ($ER\alpha$ e $ER\beta$), (Iwahana, Karatsoreos et al. 2008) embora alguns estudos considerem a presença do $ER\beta$ (Vida, Hrabovszky et al. 2008). Em contraste, os ARs são largamente expressos no SCN (Karatsoreos e Silver 2007). Assim sendo, pensa-se que a influência do E_2 no ritmo circadiano possa ocorrer em regiões extra-SCN por vias diretas ou indiretas.

A presença de recetores hormonais no CP já foi comprovada, e existem cada vez mais evidências deste ser um local de atuação das hormonas sexuais (Hong-Goka e Chang 2004, Quadros, Pfau et al. 2007, Alves, Gonçalves et al. 2009). Uma vez que as hormonas sexuais parecem influenciar o ritmo circadiano no CP, este pode ser um intermediário na passagem da informação hormonal para o oscilador central. De modo a explorar a possibilidade das hormonas sexuais afetarem o ritmo circadiano, por alterarem o padrão de expressão dos genes circadianos, este trabalho focou-se no estudo do efeito do E_2 e da P_4 na expressão dos genes *Per1* e *Per2*.

Para verificar a presença destes genes nas CPEC de rato, a sua expressão foi confirmada por RT-PCR. A presença das proteínas *PER1* e *PER2* foi analisada por *whole-mount*. Ambas as proteínas estão presentes tanto no núcleo como no citoplasma, no entanto a *PER2* apresenta uma distribuição mais difusa. De acordo com a descrição do mecanismo molecular do ritmo circadiano, a tradução destas proteínas é ativada pelo complexo *BMAL/CLOCK* no citoplasma. Posteriormente, estas proteínas podem formar heterodímeros com as proteínas *CRY* e deslocarem-se para o núcleo onde interagem com os heterodímeros *BMAL/CLOCK* inibindo a

sua própria transcrição. Assim, estas proteínas podem encontrar-se tanto no citoplasma como no núcleo (Hughes, Hong et al. 2012). Os nossos resultados estão de acordo com o verificado em outros tecidos, por exemplo, a proteína PER1 foi identificada no núcleo e citoplasma de células do rim (Wang, Wang et al. 2006) na glândula adrenal (Fahrenkrug, Hannibal et al. 2008), e no ovário (Fahrenkrug, Georg et al. 2006). De igual forma, a proteína PER2 também apresenta uma marcação nucleocitoplasmática no ovário, na glândula adrenal e em células mesenquimais da próstata (Yoshida, He et al. 2010).

De forma a avaliar a ritmicidade circadiana dos genes Per1 e Per2 nas CPEC, o padrão diário de expressão destes genes foi analisado por PCR em tempo real a diferentes horas (08:00, 14:00, 20:00 e 02:00 horas). A expressão de mRNA do Per1 não apresentou oscilações circadianas, mantendo-se praticamente constante ao longo das várias horas. Contrariamente, os níveis de mRNA de Per2 mostraram oscilações ao longo do ciclo circadiano, ocorrendo um pico máximo e mínimo de expressão às 8:00 e as 20:00 horas, respetivamente. Estas diferenças foram consideradas estatisticamente significativas e assim estes resultados mostram que as CPEC exibem um ritmo circadiano na expressão de Per2. As oscilações diárias na expressão destes genes já foram analisadas em várias regiões do cérebro e em tecidos periféricos. No SCN a expressão de Per1 e Per2, aumenta durante o dia e diminui durante a noite, o que é semelhante ao perfil de expressão do Per2 observado no CP (Maywood, O'Brien et al. 2003). Na glândula pineal, apenas o Per1 é expresso ritmicamente, aumentando durante o período noturno (Simonneaux, Poirel et al. 2004). No ovário, tanto o Per1 como o Per2 apresentam uma oscilação rítmica estatisticamente significativa ao longo do ciclo de 24 horas, com um pico máximo de expressão no início da noite para o Per1, e a meio da noite para o Per2 (Fahrenkrug, Georg et al. 2006).

Também foi analisado o efeito do E_2 e da P_4 na expressão dos Per1 e Per2 por PCR em tempo real. Para tal, as CPEC foram estimuladas com diferentes concentrações (0, 10, 100 e 500nM) de cada hormona, durante um ciclo de 24 horas. A incubação das CPEC com E_2 aumentou a expressão do Per1 e Per2 de forma gradual, obtendo-se diferenças significativas para a concentração de 500nM. Por outro lado, nenhum efeito na expressão dos Per foi observado quando as CPEC foram incubadas com a P_4 . Assim sendo, as diferenças de expressão destes genes observadas anteriormente entre machos e fêmeas (Quintela, Sousa et al. 2014), parecem ser devido principalmente à ação do E_2 .

Além do estudo da expressão de mRNA, também era de interesse observar se haviam alterações na localização das proteínas PER após o estímulo com E_2 . Para isso, as CPEC foram incubadas com E_2 (500nM) durante um período de 24 horas, após o qual se realizou ICC. Quanto à PER1 observou-se um aumento de fluorescência na região do núcleo, o que seria de esperar, dado que uma vez sintetizada no citoplasma, esta proteína desloca-se para o núcleo. Curiosamente, tal não se verificou no caso da proteína PER2. Apesar do E_2 induzir a expressão

de mRNA de Per2, parece que esse mRNA não está a ser traduzido em proteína. Estes resultados apoiam a hipótese do CP ser uma região fora do SCN capaz de mediar a resposta ao E₂, uma vez que vários estudos demonstraram que o SCN não responde ao E₂ (Nakamura, Moriya et al. 2005, Murphy, Pezuk et al. 2013).

De forma a avaliar se a resposta ao E₂ é mediada pelo ER, o antagonista específico do recetor de E₂ (ICI 182,780) foi adicionado às CPEC em simultâneo com o E₂. A adição do antagonista causou um decréscimo significativo na expressão dos genes Per1 e Per2. De igual forma, também a localização das proteínas PER foi analisada por ICC após tratamento com o antagonista. No caso da PER1 é notável uma diminuição da intensidade na região nuclear, observada anteriormente, após tratamento com o E₂. Quanto à PER2, uma vez que o tratamento com E₂ não alterou a sua distribuição ou expressão, também o efeito do antagonista não provocou nenhuma resposta. De forma a corroborar o resultado observado para a PER1, a intensidade verificada na região nuclear foi quantificada. Observou-se que de facto o aumento de fluorescência no núcleo é estatisticamente significativo e que a adição do antagonista reverte esse efeito.

Estes resultados permitem afirmar que o efeito do E₂ na expressão dos genes Per1 e Per2 ocorre maioritariamente através do ER, e não por outra via. É possível que o E₂ se ligue ao seu recetor específico, que por sua vez, se liga a elementos de resposta específicos na região promotora dos genes, regulando desse modo a transcrição dos Per (He, Hirata et al. 2007).

Outros estudos também indicam uma regulação dos Per pelo E₂. O útero, por ser um órgão alvo das hormonas esteroides, tem sido um modelo de estudo do efeito do E₂ e da P₄ na expressão dos genes circadianos. Tanto a administração de E₂ como de P₄ induziram a expressão do Per1 no útero de ratos fêmea, e esse efeito foi revertido quando se adicionou o antagonista do ER, o ICI (He, Hirata et al. 2007). A linha celular MCF-7, por expressar os recetores das hormonas esteroides, também é um bom modelo de estudo. Neste caso, apenas a P₄ aumentou a expressão do Per2. Além disso, os efeitos observados também foram revertidos quando se adicionou o antagonista, o RU486 (Nakamura, Sellix et al. 2010).

Outros estudos demonstraram que o efeito do E₂ é diferente entre os vários tecidos: no SCN o E₂ apenas afeta a amplitude de expressão do Per2; no córtex cerebral não tem qualquer efeito em nenhum dos genes; e nos tecidos periféricos, como o fígado e o rim, o E₂ aumentou a expressão de Per1. Assim, o efeito do E₂ parece ser diferente entre osciladores centrais e periféricos (Nakamura, Moriya et al. 2005).

Um outro objetivo deste trabalho foi avaliar se a disrupção do ritmo circadiano é capaz de alterar a expressão dos genes Per1 e Per2, e se existem diferenças de expressão entre machos e fêmeas. Para isso, um grupo de ratos foi exposto a condições de escuridão constante e um

outro grupo exposto a condições de luz constante. A análise dos resultados baseou-se nas diferenças de expressão entre o grupo exposto às condições descritas anteriormente e o grupo controle, exposto a um fotoperíodo normal (12 horas luz: 12 horas escuro).

Alterações no fotoperíodo normal têm sido identificadas como formas de interrupção do relógio circadiano tendo implicações no comportamento e fisiologia (Ohta, Mitchell et al. 2006, Karatsoreos, Bhagat et al. 2011).

Neste estudo a exposição a luz constante não afetou a expressão dos genes Per1 e Per2 em machos e fêmeas. No entanto, os machos expostos a escuridão constante sofreram um aumento da expressão do gene Per1. Pelo contrário, as fêmeas não sofreram alterações de expressão. No caso do Per2 não foram observadas diferenças na expressão dos genes em fêmeas e machos.

As diferenças observadas entre machos e fêmeas colocam em evidência uma possível regulação do ritmo circadiano por parte das hormonas, aquando de uma interrupção. De facto, já foi observado previamente que sob exposição a luz constante o ritmo circadiano tende a sofrer alterações, influenciando a atividade locomotora, e que nesse caso o E₂ previne essa interrupção do ritmo circadiano (Leibenluft 1993, Nakamura, Shinohara et al. 2001).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o papel fulcral do E₂ na regulação do ritmo circadiano no CP, através da modelação da expressão de genes da via do ritmo circadiano. Dado que o E₂ regula a ritmicidade circadiana no CP, e tendo em conta a baixa expressão de ERs no SCN, este pode ser um meio de transmissão da informação hormonal para o oscilador central.

VI. Conclusões e Perspetivas Futuras

Com a realização deste trabalho verificou-se que o E_2 é capaz de induzir a expressão dos genes *Per1* e *Per2* nas CPEC, via ER. Estas observações são importantes, dado que existem poucas evidências do E_2 modular a expressão destes genes no SCN, o oscilador circadiano central. Assim, existe a possibilidade da regulação destes genes ocorrer numa região extra-SCN, como é o caso do CP, que poderá ser um intermediário na passagem da informação hormonal para o SCN.

Neste estudo verificou-se que a expressão do *Per1* e *Per2* aumenta após um período de 24 horas, no entanto é também importante verificar de que forma o E_2 influencia a expressão destes genes a diferentes horas do dia. Para corroborar estes resultados *in vitro*, posteriormente poderão ser feitos ensaios *in vivo*, comparando a expressão dos genes *Per1* e *Per2* entre um grupo de ratos fêmea GDX, um grupo de ratos fêmea GDX em terapia de substituição hormonal e um grupo controlo (não GDX).

Futuramente, poderão ser feitos estudos no sentido de avaliar se o CP é um oscilador autónomo. Para isso, será necessário provocar uma lesão no SCN e comparar o padrão de expressão dos genes circadianos no CP entre o grupo de animais com lesão e o grupo controlo.

Além disso, dado que o estudo da disrupção circadiana sugeriu que a exposição à escuridão constante altera a expressão do *Per1* nos machos, seria interessante estudar se as funções do CP seriam afetadas aquando da disrupção (por exemplo, a produção de proteínas), e assim perceber a importância dos genes estudados na fisiologia do CP.

VII. Referências Bibliográficas

Abe, M., E. D. Herzog, S. Yamazaki, M. Straume, H. Tei, Y. Sakaki, M. Menaker and G. D. Block (2002). "Circadian rhythms in isolated brain regions." The Journal of Neuroscience 22(1): 350-356.

Akhtar, R. A., A. B. Reddy, E. S. Maywood, J. D. Clayton, V. M. King, A. G. Smith, T. W. Gant, M. H. Hastings and C. P. Kyriacou (2002). "Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus." Current Biology 12(7): 540-550.

Albrecht, U. (2012). "Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks." Neuron 74(2): 246-260.

Allen, G., J. Rappe, D. J. Earnest and V. M. Cassone (2001). "Oscillating on borrowed time: diffusible signals from immortalized suprachiasmatic nucleus cells regulate circadian rhythmicity in cultured fibroblasts." The Journal of Neuroscience 21(20): 7937-7943.

Alves, C. H., I. Gonçalves, S. Socorro, G. Baltazar, T. Quintela and C. R. Santos (2009). "Androgen receptor is expressed in murine choroid plexus and downregulated by 5 α -dihydrotestosterone in male and female mice." Journal of molecular neuroscience 38(1): 41-49.

Antoch, M. P., V. Y. Gorbacheva, O. Vykhovanets, I. A. Toshkov, R. V. Kondratov, A. A. Kondratova, C. Lee and A. Y. Nikitin (2008). "Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis." CELL CYCLE-LANDES BIOSCIENCE- 7(9): 1197.

Bailey, M. and R. Silver (2014). "Sex differences in circadian timing systems: Implications for disease." Frontiers in neuroendocrinology 35(1): 111-139.

Bass, J. and J. S. Takahashi (2010). "Circadian integration of metabolism and energetics." Science 330(6009): 1349-1354.

Bechtold, D. A., J. E. Gibbs and A. S. Loudon (2010). "Circadian dysfunction in disease." Trends in pharmacological sciences 31(5): 191-198.

Bedrosian, T. A., K. L. Herring, J. C. Walton, L. K. Fonken, Z. M. Weil and R. J. Nelson (2013). "Evidence for feedback control of pineal melatonin secretion." Neuroscience letters 542: 123-125.

Buhr, E. D. and J. S. Takahashi (2013). Molecular components of the mammalian circadian clock. Circadian clocks, Springer: 3-27.

Campos, L., R. Cruz-Rizzolo, I.-S. Watanabe, M. Nogueira and L. Pinato (2014). "Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus based on the distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) and arginine vasopressin (AVP) immunoreactive fibers in the hypothalamus of *Sapajus apella*." Journal of chemical neuroanatomy.

Cao, R., G. Q. Butcher, K. Karelina, J. S. Arthur and K. Obrietan (2013). "Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 modulates photic entrainment of the suprachiasmatic circadian clock." European Journal of Neuroscience 37(1): 130-140.

Chen, R., N. Kassem, Z. Redzic, C. Chen, M. Segal and J. Preston (2009). "Age-related changes in choroid plexus and blood-cerebrospinal fluid barrier function in the sheep." Experimental gerontology 44(4): 289-296.

- Damkier, H. H., P. D. Brown and J. Praetorius (2010). "Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport." Physiology 25(4): 239-249.
- Dibner, C., U. Schibler and U. Albrecht (2010). "The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks." Annual review of physiology 72: 517-549.
- Emerich, D. F., S. J. Skinner, C. V. Borlongan, A. V. Vasconcellos and C. G. Thanos (2005). "The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain." Bioessays 27(3): 262-274.
- Fahrenkrug, J., B. Georg, J. Hannibal, P. Hindersson and S. Graš (2006). "Diurnal rhythmicity of the clock genes Per1 and Per2 in the rat ovary." Endocrinology 147(8): 3769-3776.
- Fahrenkrug, J., J. Hannibal and B. Georg (2008). "Diurnal rhythmicity of the canonical clock genes Per1, Per2 and Bmal1 in the rat adrenal gland is unaltered after hypophysectomy." Journal of neuroendocrinology 20(3): 323-329.
- Falcão, A. M., F. Marques, A. Novais, N. Sousa, J. A. Palha and J. C. Sousa (2012). "The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow!" Frontiers in cellular neuroscience 6.
- Gamble, K. L., D. Resuehr and C. H. Johnson (2013). "Shift work and circadian dysregulation of reproduction." Frontiers in endocrinology 4.
- Girardet, C., M. P. Blanchard, G. Ferracci, C. Lévêque, M. Moreno, A. M. François-Bellan, D. Becquet and O. Bosler (2010). "Daily changes in synaptic innervation of VIP neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: contribution of glutamatergic afferents." European Journal of Neuroscience 31(2): 359-370.
- Guilding, C., A. T. Hughes, T. M. Brown, S. Namvar and H. D. Piggins (2009). "A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus." Molecular brain 2(1): 28.
- Guilding, C. and H. D. Piggins (2007). "Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain?" European Journal of Neuroscience 25(11): 3195-3216.
- He, P.-J., M. Hirata, N. Yamauchi and M.-a. Hattori (2007). "Up-regulation of Per1 expression by estradiol and progesterone in the rat uterus." Journal of Endocrinology 194(3): 511-519.
- Hong-Goka, B. C. and F.-L. F. Chang (2004). "Estrogen receptors α and β in choroid plexus epithelial cells in Alzheimer's disease." Neuroscience letters 360(3): 113-116.
- Hughes, M. E., H.-K. Hong, J. L. Chong, A. A. Indacochea, S. S. Lee, M. Han, J. S. Takahashi and J. B. Hogenesch (2012). "Brain-specific rescue of clock reveals system-driven transcriptional rhythms in peripheral tissue." PLoS genetics 8(7): e1002835.
- Iwahana, E., I. Karatsoreos, S. Shibata and R. Silver (2008). "Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice." Hormones and behavior 53(3): 422-430.
- Janssen, S. F., S. J. van der Spek, B. Jacoline, A. H. Essing, T. G. Gorgels, P. J. van der Spek, N. M. Jansonius and A. A. Bergen (2013). "Gene Expression and Functional Annotation of the Human and Mouse Choroid Plexus Epithelium." PloS one 8(12): e83345.
- Kalsbeek, A., R. Van der Spek, J. Lei, E. Endert, R. Buijs and E. Fliers (2012). "Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis." Molecular and cellular endocrinology 349(1): 20-29.

- Karatsoreos, I. N., S. Bhagat, E. B. Bloss, J. H. Morrison and B. S. McEwen (2011). "Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior." Proceedings of the national Academy of Sciences 108(4): 1657-1662.
- Karatsoreos, I. N., M. P. Butler, J. LeSauter and R. Silver (2011). "Androgens modulate structure and function of the suprachiasmatic nucleus brain clock." Endocrinology 152(5): 1970-1978.
- Karatsoreos, I. N. and R. Silver (2007). "Minireview: The neuroendocrinology of the suprachiasmatic nucleus as a conductor of body time in mammals." Endocrinology 148(12): 5640-5647.
- Kawamura, M., H. Tasaki, I. Misawa, G. Chu, N. Yamauchi and M. A. Hattori (2014). "Contribution of testosterone to the clock system in rat prostate mesenchyme cells." Andrology 2(2): 225-233.
- Kondratov, R. V., V. Y. Gorbacheva and M. P. Antoch (2007). "The role of mammalian circadian proteins in normal physiology and genotoxic stress responses." Current topics in developmental biology 78: 173-216.
- Kondratova, A. A. and R. V. Kondratov (2012). "The circadian clock and pathology of the ageing brain." Nature Reviews Neuroscience 13(5): 325-335.
- Kriegsfeld, L. J. and R. Silver (2006). "The regulation of neuroendocrine function: timing is everything." Hormones and behavior 49(5): 557-574.
- Krzyzanowska, A. and E. Carro (2012). "Pathological alteration in the choroid plexus of Alzheimer's disease: implication for new therapy approaches." Frontiers in pharmacology 3.
- Lahti, T. A., T. Partonen, P. Kyyrönen, T. Kauppinen and E. Pukkala (2008). "Night-time work predisposes to non-Hodgkin lymphoma." International Journal of Cancer 123(9): 2148-2151.
- Lehtinen, M. K., C. S. Bjornsson, S. M. Dymecki, R. J. Gilbertson, D. M. Holtzman and E. S. Monuki (2013). "The Choroid Plexus and Cerebrospinal Fluid: Emerging Roles in Development, Disease, and Therapy." The Journal of Neuroscience 33(45): 17553-17559.
- Leibenluft, E. (1993). "Do gonadal steroids regulate circadian rhythms in humans?" Journal of affective disorders 29(2): 175-181.
- Lowrey, P. L. and J. S. Takahashi (2011). "Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms." Advances in genetics 74: 175.
- Marques, F., M. Correia-Neves, J. C. Sousa, N. Sousa and J. A. Palha (2011). "Brain Barriers and the Acute-Phase Response."
- Marques, F., J. C. Sousa, N. Sousa and J. A. Palha (2013). "Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's."
- Maslieieva, V. and R. J. Thompson (2014). "A critical role for pannexin-1 in activation of innate immune cells of the choroid plexus." Channels 8(2): 0--1.
- Masri, S. and P. Sassone-Corsi (2010). "Plasticity and specificity of the circadian epigenome." Nature neuroscience 13(11): 1324-1329.
- Masri, S. and P. Sassone-Corsi (2013). "The circadian clock: a framework linking metabolism, epigenetics and neuronal function." Nature Reviews Neuroscience 14(1): 69-75.
- Maywood, E., J. O'Brien and M. Hastings (2003). "Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei." Journal of neuroendocrinology 15(4): 329-334.

- McCarthy, M. M., A. P. Arnold, G. F. Ball, J. D. Blaustein and G. J. De Vries (2012). "Sex differences in the brain: the not so inconvenient truth." The Journal of Neuroscience 32(7): 2241-2247.
- Menaker, M., L. Moreira and G. Tosini (1997). "Evolution of circadian organization in vertebrates." Brazilian journal of medical and biological research 30: 305-313.
- Menaker, M., Z. C. Murphy and M. T. Sellix (2013). "Central control of peripheral circadian oscillators." Current opinion in neurobiology 23(5): 741-746.
- Mohawk, J. A., C. B. Green and J. S. Takahashi (2012). "Central and peripheral circadian clocks in mammals." Annual review of neuroscience 35: 445.
- Mohawk, J. A. and J. S. Takahashi (2011). "Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators." Trends in neurosciences 34(7): 349-358.
- Mong, J. A., F. C. Baker, M. M. Mahoney, K. N. Paul, M. D. Schwartz, K. Semba and R. Silver (2011). "Sleep, rhythms, and the endocrine brain: influence of sex and gonadal hormones." The Journal of Neuroscience 31(45): 16107-16116.
- Montúfar-Chaveznavia, R., O. Hernández-Campos, R. Hudson and I. Caldelas (2012). "Differential maturation of the molecular clockwork in the olfactory bulb and suprachiasmatic nucleus of the rabbit." Neuroscience 207: 198-207.
- Moore, S. A. and M. J. Oglesbee (2012). "Involvement of the choroid plexus in the inflammatory response after acute spinal cord injury in dogs: An immunohistochemical study." Veterinary immunology and immunopathology 148(3): 348-352.
- Mortazavi, M. M., C. J. Griessenauer, N. Adeeb, A. Deep, R. B. Shahripour, M. Loukas, R. I. Tubbs and R. S. Tubbs (2013). "The choroid plexus: a comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations." Child's Nervous System: 1-10.
- Murphy, Z. C., P. Pezuk, M. Menaker and M. T. Sellix (2013). "Effects of Ovarian Hormones on Internal Circadian Organization in Rats 1." Biology of reproduction 89(2).
- Nabiuni, M., R. Shokohi and P. Moghaddam (2014). "CSF Protein Contents and their Roles in Brain Development." Zahedan Journal of Research in Medical Sciences: 0-0.
- Nakamura, T. J., T. Moriya, S. Inoue, T. Shimazoe, S. Watanabe, S. Ebihara and K. Shinohara (2005). "Estrogen differentially regulates expression of Per1 and Per2 genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats." Journal of neuroscience research 82(5): 622-630.
- Nakamura, T. J., M. T. Sellix, T. Kudo, N. Nakao, T. Yoshimura, S. Ebihara, C. S. Colwell and G. D. Block (2010). "Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels." Steroids 75(3): 203-212.
- Nakamura, T. J., K. Shinohara, T. Funabashi and F. Kimura (2001). "Effect of estrogen on the expression of *Cry1* and *Cry2* mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats." Neuroscience research 41(3): 251-255.
- Ohta, H., A. C. Mitchell and D. G. McMahon (2006). "Constant light disrupts the developing mouse biological clock." Pediatric research 60(3): 304-308.
- Pevet, P. and E. Challet (2011). "Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network." Journal of Physiology-Paris 105(4): 170-182.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic acids research 29(9): e45-e45.

- Pinato, L., W. Allemandi, L. K. Abe, R. Frazão, R. J. Cruz-Rizzolo, J. S. Cavalcante, M. S. Costa and M. I. Nogueira (2007). "A comparative study of cytoarchitecture and serotonergic afferents in the suprachiasmatic nucleus of primates (*Cebus apella* and *Callithrix jacchus*) and rats (Wistar and Long Evans strains)." Brain research 1149: 101-110.
- Praetorius, J. (2007). "Water and solute secretion by the choroid plexus." Pflügers Archiv-European Journal of Physiology 454(1): 1-18.
- Quadros, P. S., J. L. Pfau and C. K. Wagner (2007). "Distribution of progesterone receptor immunoreactivity in the fetal and neonatal rat forebrain." Journal of Comparative Neurology 504(1): 42-56.
- Quintela, T., I. Gonçalves, L. C. Carreto, M. A. Santos, H. Marcelino, F. M. Patriarca and C. R. Santos (2013). "Analysis of the effects of sex hormone background on the rat choroid plexus transcriptome by cDNA microarrays." PLoS one 8(4): e60199.
- Quintela, T., C. Sousa, F. Patriarca, I. Gonçalves and C. Santos (2014). "Gender associated circadian oscillations of the clock genes in rat choroid plexus." Brain Structure and Function: 1-12.
- Quintela, T., C. Sousa, F. M. Patriarca, I. Goncalves and C. R. Santos (2014). "Gender associated circadian oscillations of the clock genes in rat choroid plexus." Brain Struct Funct.
- Ralph, M. R., R. G. Foster, F. C. Davis and M. Menaker (1990). "Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period." Science 247(4945): 975-978.
- Rana, S. and S. Mahmood (2010). "Circadian rhythm and its role in malignancy." J Circadian Rhythms 8(3).
- Rath, M. F., K. Rohde and M. Møller (2012). "Circadian oscillations of molecular clock components in the cerebellar cortex of the rat." Chronobiology international 29(10): 1289-1299.
- Redzic, Z. B. and M. B. Segal (2004). "The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium." Advanced drug delivery reviews 56(12): 1695-1716.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2002). "Coordination of circadian timing in mammals." Nature 418(6901): 935-941.
- Rocha, V., R. Frazão, L. Campos, P. Mello, J. Donato Jr, R. Cruz-Rizzolo, M. Nogueira and L. Pinato (2014). "Intrinsic organization of the suprachiasmatic nucleus in the capuchin monkey." Brain research 1543: 65-72.
- Rutter, J., M. Reick and S. L. McKnight (2002). "Metabolism and the control of circadian rhythms." Annual review of biochemistry 71(1): 307-331.
- Sakka, L., G. Coll and J. Chazal (2011). "Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid." European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases 128(6): 309-316.
- Schroeder, A. M. and C. S. Colwell (2013). "How to fix a broken clock." Trends in pharmacological sciences 34(11): 605-619.
- Serot, J.-M., J. Zmudka and P. Jouanny (2012). "A possible role for CSF turnover and choroid plexus in the pathogenesis of late onset Alzheimer's disease." Journal of Alzheimer's Disease 30(1): 17-26.
- Silver, R. and L. J. Kriegsfeld (2014). "Circadian rhythms have broad implications for understanding brain and behavior." European Journal of Neuroscience 39(11): 1866-1880.

Simonneaux, V., V.-J. Poirel, M.-L. Garidou, D. Nguyen, E. Diaz-Rodriguez and P. Pevet (2004). "Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland." Molecular brain research 120(2): 164-172.

Skipor, J. and J.-C. Thiery (2008). "The choroid plexus & cerebrospinal fluid system: Undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain." Acta Neurobiol Exp 68: 414-428.

Strazielle, N. and J.-F. Gherzi-Egea (2000). "Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 59(7): 561-574.

Tahara, Y., H. Kuroda, K. Saito, Y. Nakajima, Y. Kubo, N. Ohnishi, Y. Seo, M. Otsuka, Y. Fuse and Y. Ohura (2012). "In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse." Current Biology 22(11): 1029-1034.

Tapia-Osorio, A., R. Salgado-Delgado, M. Angeles-Castellanos and C. Escobar (2013). "Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat." Behavioural brain research 252: 1-9.

Vida, B., E. Hrabovszky, T. Kalamatianos, C. Coen, Z. Liposits and I. Kallo (2008). "Oestrogen receptor α and β immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones." Journal of neuroendocrinology 20(11): 1270-1277.

Videnovic, A. and D. Golombek (2013). "Circadian and sleep disorders in Parkinson's disease." Experimental neurology 243: 45-56.

Wang, X., Y. Wang, H. Xin, Y. Liu, Y. Wang, H. Zheng, Z. Jiang, C. Wan, Z. Wang and J. M. Ding (2006). "Altered expression of circadian clock gene, *mPer1*, in mouse brain and kidney under morphine dependence and withdrawal." Journal of circadian rhythms 4(1): 9.

Welsh, D. K., S.-H. Yoo, A. C. Liu, J. S. Takahashi and S. A. Kay (2004). "Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression." Current Biology 14(24): 2289-2295.

Wolburg, H. and W. Paulus (2010). "Choroid plexus: biology and pathology." Acta neuropathologica 119(1): 75-88.

Yamamoto, T., Y. Nakahata, H. Soma, M. Akashi, T. Mamino and T. Takumi (2004). "Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues." BMC molecular biology 5(1): 18.

Yamazaki, S., R. Numano, M. Abe, A. Hida, R.-i. Takahashi, M. Ueda, G. D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker and H. Tei (2000). "Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats." Science 288(5466): 682-685.

Yang, X. (2010). "A wheel of time: the circadian clock, nuclear receptors, and physiology." Genes & development 24(8): 741-747.

Yoo, S.-H., S. Yamazaki, P. L. Lowrey, K. Shimomura, C. H. Ko, E. D. Buhr, S. M. Siepkka, H.-K. Hong, W. J. Oh and O. J. Yoo (2004). "PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(15): 5339-5346.

Yoshida, K., P.-j. He, N. Yamauchi, S. Hashimoto M.-a. Hattori (2010). "Up-regulation of circadian clock gene *Period 2* in the prostate mesenchymal cells during glutamide-induced apoptosis." Molecular and cellular biochemistry 335(1-2): 37-45.