



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da saúde

Plexo coroídeu: local de síntese de hormonas esteroides?

Filipa Marina Pinheiro Patriarca

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º Ciclo de Estudos)

Orientador: Prof. Doutora Cecília Santos

Co-orientador: Prof. Doutora Telma Quintela

Covilhã, junho de 2012

Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Dos quais destaco:

A Professora Doutora Cecília Santos, pela orientação científica e pelos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos.

A Professora Doutora Telma Quintela, por todos os ensinamentos e dicas a nível laboratorial, pelo apoio e pela disponibilidade sempre demonstrada.

A Professora Doutora Helena Marcelino, pela realização dos primers utilizados neste trabalho, e também pelo seu apoio, bons conselhos e disponibilidade.

A Catarina, pela realização dos cortes histológicos utilizados neste trabalho.

A empresa Oviger - Produção, Transformação e Comércio de Carnes e Derivados SA, nomeadamente ao Senhor João que ajudou na recolha dos CPs de porco.

Aos colegas do laboratório, em especial à Joana Tomás e Grabiela Tavares pela ajuda e disponibilidade ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Joana Sousa, Vânia Vieira, Sofia Marques, Rita Estebainha, Mafalda Faria, Inês Massano, Ana Rita Saraiva, Ana Rita Lucas, Ricardo Ganiha e Carlos Vilas Boas por todo apoio e motivação

A Vânia Reis e a Tânia Dias por toda a ajuda prestada, motivação, compreensão e paciência.

As minhas primas, Elizabete Jesus, Solange Jesus e Inês Neves por todo o apoio prestado, pela paciência e compreensão.

Aos meus pais pelo apoio e paciência durante este longo e por vezes difícil percurso.

Resumo

O plexo coroideu (CP), uma estrutura altamente vascularizada, encontra-se dentro dos ventrículos do cérebro e é composto por vilosidades enroladas aos capilares, tecido conjuntivo e uma monocamada de células epiteliais ciliadas. O CP produz o líquido cefalorraquidiano (LCR) que mantém o meio extracelular do cérebro e forma uma interface única entre o sangue e o LCR. A biossíntese de esteroides ocorre na glândula adrenal, nas gónadas e no cérebro - neuroesteroides. Um trabalho desenvolvido anteriormente permitiu identificar várias enzimas da via esteroidogénica, pertencentes à família do citocromo P450 (CYP), hidroxisteroide desidrogenase (HSD) e redutase, no CP de rato, através da análise de microarrays de cDNA. Portanto, o objetivo deste estudo foi confirmar e analisar a expressão do citocromo P450, família 11, subfamília a, polipéptido 1 (CYP11A1), citocromo P450, família 11, subfamília b, polipéptido 3 (CYP11B3), citocromo P450, família 17, subfamília a, polipéptido 1 (CYP17A1), 17 β -hidroxisteroide desidrogenase (17 β -HSD), 5 α -redutase (5 α -red) e citocromo P450, família 19, subfamília a, polipéptido 1 (CYP19A1) no CP de *Rattus norvegicus* e *Sus domesticus*. Assim, os níveis de expressão de mRNA destas enzimas foram analisados por RT-PCR e PCR em tempo real, enquanto os níveis proteicos foram analisados por imunocitoquímica e imunohistoquímica. Por fim, foi testada a funcionalidade destas enzimas em culturas *ex vivo* usando precursores tritiados da via esteroidogénica. Este trabalho permitiu-nos confirmar a expressão destas enzimas e determinar a sua localização nas células epiteliais do CP de rato e no CP de porco. Para além disso, os ensaios *ex vivo* mostraram que há síntese de hormonas esteroides a partir de precursores tritiados nos explantes de CP.

Palavras-chave

Plexo coroideu, Líquido cefalorraquidiano, esteroidogénese, enzimas esteroidogénicas, neuroesteroides

Abstract

The choroid plexus (CP), a highly vascularized structure, lies within the ventricles of the brain and is composed by convoluted villi with capillaries, connective tissue and a monolayer of ciliated epithelial cells. CP produces the cerebrospinal fluid (CSF) that maintains the extracellular milieu of the brain and form a unique interface between the peripheral blood and the CSF. Steroid biosynthesis occurs in the adrenal gland, in the gonads and, in the brain-neurosteroids. In previous work found that several enzymes of the steroidogenic pathway, which belong to the family of cytochrome P450 (CYP), hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) and reductase are expressed in CP by cDNA microarray analysis. So, the aim of this study was to confirm and analyse the expression of cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1 (CYP11A1), cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 3 (CYP11B3), cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1 (CYP17A1), hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 8 (17 β -HSD8), steroid-5- α -reductase (5 α -red) and cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide a (CYP19A1) in CP of *Rattus norvegicus* and *Sus domesticus*. mRNA expression levels of these enzymes were evaluated by RT-PCR and Real-time PCR, while protein levels were evaluated by immunocytochemistry and immunohistochemistry. Finally, we tested the functionality of these enzymes ex-vivo using tritiated precursors of the steroidogenic pathway. We were able to confirm the expression of these enzymes and determine their location in CP epithelial cells of rat and pig CP. Moreover, ex-vivo assays showed that steroid hormones synthesis from tritiated precursors occurs in CP explants.

Keywords

Choroid plexus, cerebrospinal fluid, steroidogenesis, steroidogenic enzymes, neurosteroids.

Índice

I. Introdução	1
1. Sistema Nervoso	2
1.1. Sistema ventricular do cérebro.....	3
1.2. Plexo Coroideu	4
1.2.1. Estrutura básica	5
1.2.2. Fisiologia.....	6
1.2.2.1. Produção e secreção de Fluido Cefalorraquidiano	6
1.2.2.2. Função imunológica	8
1.2.2.3. Síntese proteica	9
1.2.3. Plexo coroideu e o envelhecimento.....	11
2. Esteroidogénese	12
2.1. Locais de síntese de hormonas esteroides.....	13
2.1.1. Glândula adrenal	14
2.1.2. Testículos	14
2.1.3. Ovários	15
2.2. Neuroesteroidogénese	16
3. Enzimas envolvidas na neuroesteroidogénese e a sua expressão no SN	19
3.1. P450 _{scc}	19
3.2. P450 _{c17}	20
3.3. P450 _{c11}	20
3.4. 17 β -HSD.....	21
3.5. P450 _{aro}	22
3.6. 5 α -redutase	22
4. Objetivo	23
II. Materiais e Métodos	24

1. Animais	25
2. Extração de RNA Total.....	26
2.1. Determinação da integridade do RNA Total.....	26
2.2. Quantificação do RNA Total.....	27
3. Síntese de DNA complementar	27
4. PCR convencional	28
5. PCR em tempo real	29
6. Imunohistoquímica	29
7. Cultura primária de células epiteliais coroides	30
8. Imunocitoquímica por fluorescência	30
9. Ensaio com androstenediona em culturas <i>ex vivo</i> de Plexo coróideu de rato ...	31
III. Resultados	33
1. Níveis de expressão do mRNA das enzimas esteroidogénicas no Plexo Coroideu de rato	34
1.1. RT-PCR.....	34
1.2. PCR em Tempo Real	36
2. Localização das enzimas esteroidogénica no Plexo Coroideu de rato e porco ...	38
2.1. Imunohistoquímica.....	38
2.1. Imunocitoquímica por fluorescência	42
3. Avaliação da atividade funcional das enzimas esteroidogénicas	44
IV. Discussão	48
V. Conclusão e Perspetivas Futuras	52
VI. Referências	54

Lista de Figuras

Figura 1 - Diferentes regiões que compõe o encéfalo.	2
Figura 2 - Principais invólucros protetores do encéfalo.....	3
Figura 3 - Sistema Ventricular cerebral.....	4
Figura 4 - Ilustração morfológica do Plexo Coroideu do ventrículo lateral.	5
Figura 5 - Esquema representativo da via da esteroidogênese	15
Figura 6 - Síntese de esteroides neuroativos a partir hormonas esteroides	17
Figura 7 - Esquema representativo dos modelos animais utilizados no presente trabalho	25
Figura 8 - Exemplo ilustrativo dos ensaios funcionais em culturas primárias de células epiteliais de rato com 2h e 6h de tempo de incubação.....	32
Figura 9 - Exemplo ilustrativo dos ensaios funcionais em explantes de CP e ovário de ratos de 3 meses com 2h e 6h de tempo de incubação.	32
Figura 10 - Expressão de mRNA das enzimas da esteroidogênese.	34
Figura 11 - Sequências dos fragmentos amplificados por PCR	36
Figura 12 - Alterações dos níveis de expressão do mRNA da 17 β -HSD8.	37
Figura 13 - Alterações dos níveis de expressão do mRNA da CYP11A1.	38
Figura 14 - Localização das enzimas esteroidogénicas no Plexo coroideu de rato por imunohistoquímica	40
Figura 15 - Localização das enzimas esteroidogénicas no Plexo Coroideu de porco por imunohistoquímica.	42
Figura 16 - Localização das enzimas esteroidogénicas nas CPEC de rato por imunocitoquímica.....	44
Figura 17 - Cromatograma correspondente à incubação das CPEC durante 2 horas com androstenediona tritiada	45
Figura 18 - Cromatograma correspondente à incubação das CPEC durante 6 horas com androstenediona tritiada	45
Figura 19 - Cromatograma correspondente à incubação dos CPs durante 2 horas com androstenediona tritiada	46
Figura 20 - Cromatograma correspondente à incubação dos CPs durante 6 horas com androstenediona tritiada.	46

Figura 21 - Cromatograma correspondente à incubação de uma porção de ovário durante 2 horas com androstenediona tritiada..... 47

Figura 22 - Cromatograma correspondente à incubação de uma porção de ovário durante 6 horas com androstenediona tritiada..... 47

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Primers das enzimas da esteroidogénese.	28
---	----

Lista de Abreviaturas

AR - Ácido retinoico

ARK - Aldo-ceto-redutase

BMP - Proteína morfogénica óssea

BSA - Albumina de soro bovino

CP - Plexo coroideu

CPEC - Cultura primária de células epiteliais de plexo coroideu

CYP - Citocromo P450

DAB - Diaminobenzidina

DEPC - dietipirocarbonato

DHEA - Dehidroepiandrosterona

DHEAS - Dehidroepiandrosterona sulfatada

DHT - dihidrotestosterona

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DOC - Desoxicorticosterona

EGF - Fator de crescimento epidérmico

FBS - Soro fetal bovino

FGF - Fator de crescimento de Fibroblastos

FSH - Hormona folículo estimulante

HSD - Hidroxiesteroide desidrogenase

ICC - Imunocitoquímica

IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina

IHC - Imunohistoquímica

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LH - Hormona luteinizante

NADP(H) - Nicotinamida-adenina-dinucleótido (fosfato)

P/S - Penicilina e estreptomicina

PBS(T) - Tampão de fosfato salino (Tween)

PFA - Paraformaldeído

RT-PCR - reação em cadeia da Polimerase via transcriptase reversa

SDR - Desidrogenase - redutase

Shh - *Sonic hedgehog*

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

TGF- β - Fator de crescimento transformante β

THDOC - 3 α -5 α -tetrahidroxidesoxicorticosterona

TJ - *Tight junction*

TLC -Cromatografia de camada fina

TTR - Transtirretina

VP - Vasopressina

β A - β -amiloide

I. Introdução

1. Sistema Nervoso

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) (Seeley *et al.* 2003). O SNP é constituído pelos recetores sensoriais, nervos e gânglios, já o SNC é constituído pela medula espinhal e pelo encéfalo. Este último é formado por: (i) cérebro; (ii) diencefalo, subdividido em tálamo, subtálamo, epitálamo e hipotálamo; (iii) cerebelo; e (iv) tronco cerebral ou rombencéfalo, constituído pelo bulbo raquidiano, protuberância, mesencéfalo e formação reticular (Figura 1) (Seeley *et al.* 2003; Marieb and Hoehn 2007).

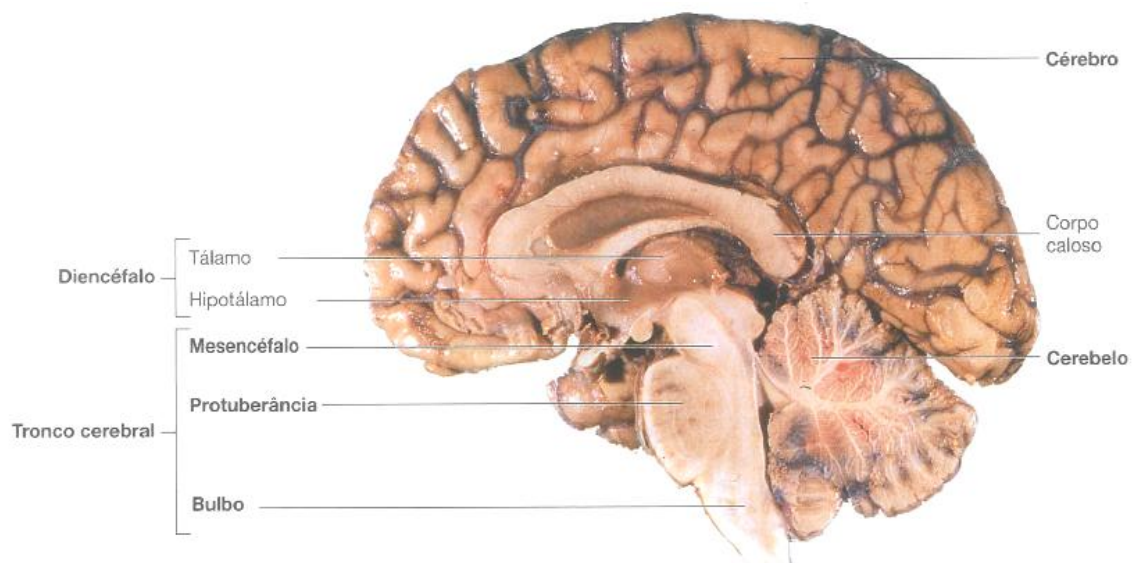


Figura 1- Diferentes regiões que compõe o encéfalo. O encéfalo é composto pelo cérebro, cerebelo, diencefalo (tálamo, hipotálamo) e pelo tronco cerebral que é dividido em mesencéfalo, protuberância e bulbo raquidiano. O encéfalo juntamente com a medula espinhal forma o sistema nervoso central. Adaptada de (Seeley *et al.* 2003)

O encéfalo e a medula espinhal são protegidos pelo crânio e vertebras, respetivamente, e também pelas meninges e líquido cefalorraquidiano (LCR) (Seeley *et al.* 2003). As meninges são três membranas de tecido conjuntivo que envolvem e protegem o SNC (Figura 2). A meninge mais superficial e mais espessa é a duramáter, constituída por duas camadas de tecido conjuntivo fibroso. A mais superficial está ligada à superfície interna do crânio e a mais interna está fortemente aderida ao encéfalo (Saladin 2010; Standring 2010). A membrana meníngea média, designada por aracnóideia, é bastante fina e é separada da duramáter pelo espaço subdural (Seeley *et al.* 2003; Saladin 2010; Standring 2010). A mais interna e delicada das meninges é a piamáter, que é ricamente vascularizada e está intimamente ligada ao encéfalo. Entre a piamáter e a aracnóideia existe o espaço

subaracnoideu que contém vilosidades aracnóideias, vasos sanguíneos e LCR (Seeley *et al.* 2003; Saladin 2010).

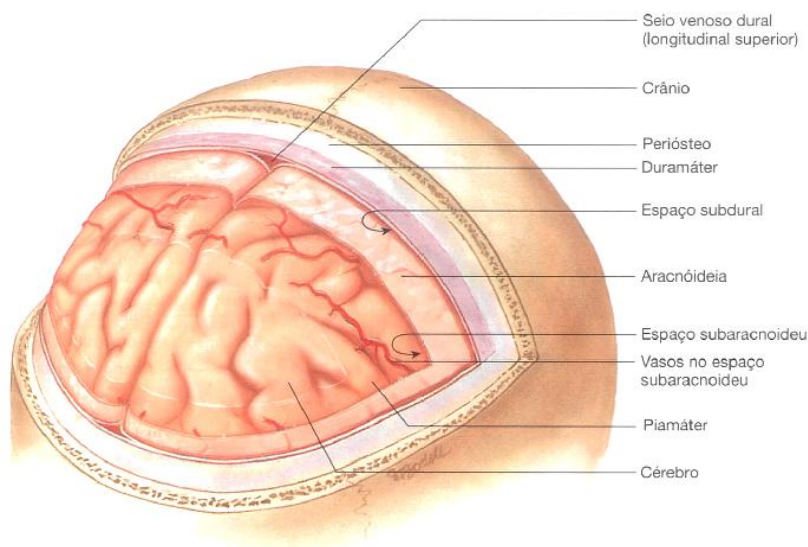


Figura 2 - Principais invólucros protetores do encéfalo. Do exterior para o interior, o encéfalo está protegido pelo crânio e pelas três túnicas meníngeas, duramáter, aracnóideia e piamáter. O espaço entre a duramáter e aracnóideia denomina-se por subdural e o espaço entre a aracnóideia e a piamáter designa-se por subaracnoideu. Adaptada de (Seeley *et al.* 2003)

1.1. Sistema ventricular do cérebro

O cérebro contém um sistema ventricular que é constituído por quatro câmaras internas denominadas ventrículos: laterais, 3º e 4º (Figura 3) (Seeley *et al.* 2003; Moore *et al.* 2006; Saladin 2010; Standring 2010). Cada hemisfério cerebral contém uma cavidade relativamente grande em forma de arco, designada de ventrículo lateral. Os ventrículos laterais estão separados entre si por finos septos que se fundem e constituem o septo pelúcido (Seeley *et al.* 2003; Saladin 2010). Cada ventrículo lateral conecta com o 3º ventrículo, através de um estrutura denominada de *forame* interventricular ou de Monro (Moore *et al.* 2006; Saladin 2010; Standring 2010). A comunicação entre o 3º e 4º ventrículo é realizada por um canal estreito, denominado aqueduto de Sylvius ou mesencefálico (Seeley *et al.* 2003; Moore *et al.* 2006; Standring 2010). O 4º prolonga-se inferiormente e é contínuo com o canal central da medula espinhal (Seeley *et al.* 2003; Moore *et al.* 2006; Saladin 2010).

Os ventrículos e os canais que fazem a comunicação entre eles são revestidos internamente por uma única camada de células ependimárias. No entanto, estas possuem

características de células epiteliais, sendo muitas vezes denominadas como células epiteliais coróides (Seeley *et al.* 2003; Saladin 2010).

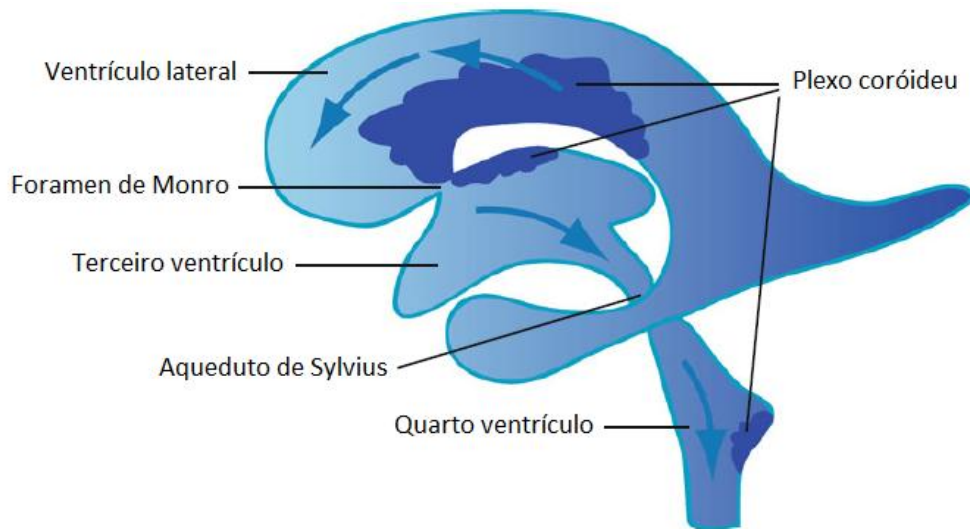


Figura 3 - Sistema Ventricular cerebral. Cada hemisfério cerebral possui um ventrículo lateral que comunica com o terceiro ventrículo através do Forame de Monro ou interventricular, já o terceiro comunica com o quarto ventrículo pelo Aqueduto de Sylvius. No interior de cada ventrículo também está representado o plexo coróide. Adaptada de (Zappaterra and Lehtinen 2012)

1.2. Plexo Coroideu

Ao longo de cada ventrículo cerebral aloja-se um plexo coróide (CP) na sua superfície interna (Seeley *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005; Moore *et al.* 2006; Saladin 2010). Este tecido, em forma de folha, flutua no LCR e está ligado ao epêndima ventricular por uma haste fina (Del Bigio 1995; Redzic and Segal 2004; Skipor and Thiery 2008). Os CPs são estruturas ramificadas, altamente vascularizadas, constituídas por uma monocamada de células epiteliais secretoras (Figura 4). Estas estão unidas por tecido conjuntivo, que através de invaginações originam numerosas vilosidades que se projetam ao longo de todo o sistema ventricular cerebral (Praetorius 2007; Chen *et al.* 2009; Zappaterra and Lehtinen 2012). Entre as células epiteliais do CP existem *tight junctions* (TJs) que previnem a difusão passiva de moléculas para o LCR (Zappaterra and Lehtinen 2012). Nos ventrículos laterais, os CPs projetam-se a partir do *forame* interventricular até extremidade do corno temporal. No 3º e 4º ventrículos os CPs estão localizados na parte superior dos ventrículos (Dohrmann 1970; Serot *et al.* 2003; Brown *et al.* 2004; Emerich *et al.* 2005).

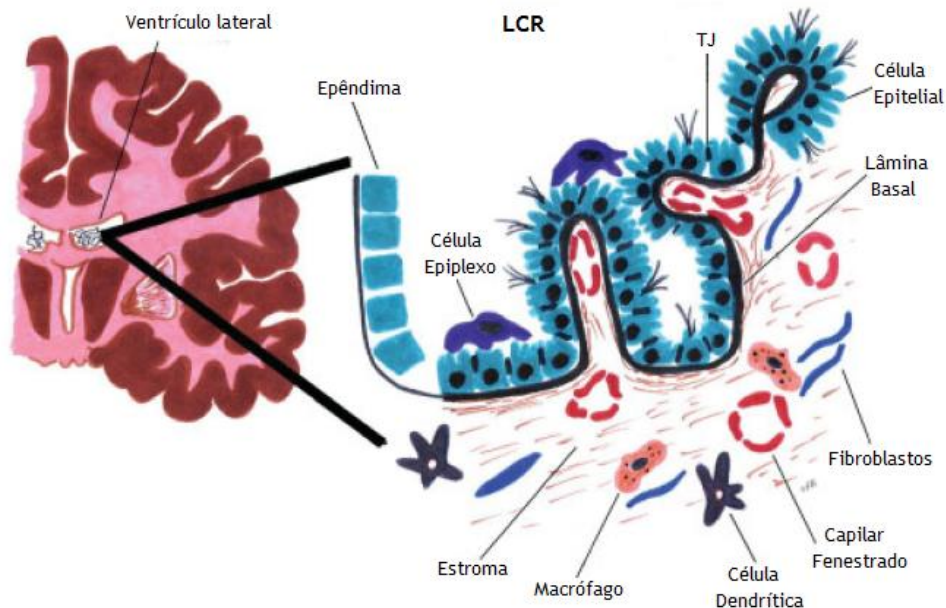


Figura 4 - Ilustração morfológica do Plexo Coroideu(CP) do ventrículo lateral. O CP é constituído por uma monocamada de células epiteliais unidas por *tight junctions* (TJs). A membrana apical destas células contém numerosas microvilosidades. A membrana basolateral apresenta uma superfície lisa, permitindo, assim, um contacto íntimo com os capilares. Este tecido possui no seu epêndima capilares fenestrados e várias células associadas, tais como macrófagos, fibroblastos e células dendríticas. Adaptada de (Emerich *et al.* 2005).

1.2.1. Estrutura básica

Os CPs presentes nos ventrículos laterais apresentam uma estrutura característica em forma de folha, enquanto que no 3º e 4º ventrículo, este tecido é caracterizado estruturalmente por ser bastante lobulado e possuir numerosas vilosidades (Cserr 1971; Strazielle and Gherzi-Egea 2000; Praetorius 2007; Skipor and Thiery 2008). No entanto, ambos os tipos estruturais consistem numa única camada contínua de células epiteliais. A membrana apical das células epiteliais coroides está em contacto com o LCR e a membrana basolateral localiza-se sob a lâmina basal. Esta é envolvida por tecido conjuntivo disperso, composto por uma rede de fibras de colagénio, que rodeia algumas células - dendríticas, macrófagos, fibroblastos - e também um núcleo vascular (Thouvenot *et al.* 2006; Praetorius 2007). O fornecimento de sangue ao CP é feito pelas artérias coroides que surgem de ramificações da artéria carótida interna (Pollay *et al.* 1972; Praetorius 2007).

O CP humano pesa em média duas a três gramas, e cada grama deste tecido recebe 3 mL de sangue por minuto, assim o fluxo sanguíneo no CP é 4 a 10 vezes maior que o fluxo sanguíneo no resto do parênquima cerebral (Chodobski *et al.* 1994; Praetorius 2007; Skipor and Thiery 2008). Os CPs são ricamente inervados e revestidos por terminações nervosas simpáticas e

parassimpáticas contendo vários neurotransmissores (Nilsson *et al.* 1990; Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005; Praetorius 2007).

Análises de microscopia eletrônica revelam que as células epiteliais coroides exibem superfícies celulares altamente diferenciadas. A superfície apical é caracterizada pelas numerosas microvilosidades (Segal 2001; Praetorius 2007; Skipor and Thiery 2008). Estas microvilosidades desenrolam-se aumentando a área de superfície, proporcionando um contacto íntimo entre o LCR e o fluido intersticial do CP (Keep and Jones 1990; Praetorius 2007; Skipor and Thiery 2008). A superfície basal possui um aspeto liso e uma grande área de superfície, sendo responsável pelas trocas entre o sangue e o CP (Skipor and Thiery 2008). A superfície lateral é convoluta, sendo muitas vezes referida como labirinto basal e é esta propriedade que possibilita um aumento substancial da área de superfície (Praetorius 2007).

O tecido coroide é constituído por células epiteliais cuboides sendo caracterizadas por terem um grande núcleo esférico central ou basal e um citoplasma abundante (Dohrmann 1970; Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005). Estas células possuem ainda numerosas mitocôndrias nas regiões basais e nos polos apicais, ocupando 15% do citoplasma, sendo necessárias para o seu alto metabolismo e exigências de energia (Cornford *et al.* 1997; Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005). Para além disso, possuem complexo de Golgi, retículo endoplasmático liso e vesículas distribuídas por todo o citoplasma apical (Emerich *et al.* 2005). As células epiteliais do CP têm cerca de 15 µm de altura e o número total destas células no CP é cerca de 10^8 (Serot *et al.* 2003).

1.2.2. Fisiologia

Os CPs estão envolvidos em várias funções do SNC devido à sua arquitetura única e localização na interface entre o sangue e compartimentos de LCR. As principais funções deste tecido são: (i) produção e secreção de LCR; (ii) síntese de inúmeras moléculas; (iii) transporte de nutrientes do sangue para o LCR; (iv) reabsorção e eliminação de subprodutos provenientes do catabolismo cerebral e produtos tóxicos; (v) participação na imunovigilância do cérebro (Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005).

1.2.2.1. Produção e secreção de Fluido Cefalorraquidiano

A função mais evidenciada do CP é a produção e secreção de LCR (Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005; Praetorius 2007; Zappaterra and Lehtinen 2012). O CP secreta entre 70-90% do

LCR total sendo o restante de origem extracoroideal (epêndima e endotélio capilar do cérebro) (Cserr 1988; Speake *et al.* 2001; Skipor and Thiery 2008; Sakka *et al.* 2011; Zappaterra and Lehtinen 2012).

Em humanos, o volume de LCR que circula em todo o SNC é em média 150 mL, sendo distribuído cerca de 25% nos ventrículos e o restante pelos espaços subaracnoideus cranianos (Redzic and Segal 2004; Emerich *et al.* 2005; Skipor and Thiery 2008; Sakka *et al.* 2011; Zappaterra and Lehtinen 2012). Este é renovado 3 a 5 vezes por dia, sugerindo assim que a taxa de produção diária deste é cerca de 400 a 600 mL por dia (Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005; Skipor and Thiery 2008; Sakka *et al.* 2011; Zappaterra and Lehtinen 2012). O LCR desempenha também um papel essencial na homeostase do ambiente neuronal através da regulação do equilíbrio eletrolítico (Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005; Sakka *et al.* 2011).

A formação e a secreção de LCR nos CPs compreende duas etapas: a primeira consiste na filtração passiva do plasma a partir dos capilares coroídes para o compartimento intersticial coroíde; a segunda reside no transporte ativo a partir do compartimento intersticial para o lúmen de todo o epitélio coroíde, envolvendo proteínas de membrana transportadoras de iões e as enzimas que regulam o processo, anidrase carbónica e Na⁺ K⁺ ATPase (Serot *et al.* 2003; Wolburg and Paulus 2010; Sakka *et al.* 2011). Portanto, as células epiteliais coroídes renovam o LCR, movendo primeiramente os iões Na⁺, Cl⁻ e HCO₃⁻ do sangue para os ventrículos, para se gerar um gradiente osmótico que impulsiona a secreção de H₂O (Brown *et al.* 2004; Emerich *et al.* 2005; Praetorius 2007; Yool 2007; Owler *et al.* 2010; Wolburg and Paulus 2010).

A composição do LCR é diferente da composição do ultrafiltrado do plasma, mas bastante similar ao fluido intersticial do cérebro (Serot *et al.* 2003; Skipor and Thiery 2008). O LCR é um líquido claro, ligeiramente viscoso e com pouca quantidade de células e proteínas. Este tem um pH baixo e uma concentração de glucose, proteínas, potássio, cálcio, bicarbonato, fosfato e ácidos aminados mais baixa comparativamente ao plasma (Segal 2000; Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005; Skipor and Thiery 2008; Sakka *et al.* 2011). Em contraste, a concentração de cloro, magnésio, sódio é maior no LCR do que no plasma (Segal 2000; Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005; Skipor and Thiery 2008; Sakka *et al.* 2011). O LCR é uma fonte rica de proteínas, iões, lípidos, hormonas, colesterol, glucose e muitas outras moléculas e metabolitos. O proteoma do LCR consiste em centenas de proteínas da matriz extracelular, reguladores da pressão osmótica, transportadores de iões, proteínas de ligação a hormonas, reguladores do metabolismo dos lípidos, várias enzimas e seus reguladores (Zappaterra and Lehtinen 2012).

A circulação do LCR é um fenómeno dinâmico e a sua regulação é responsável pela homeostase cerebral (Sakka *et al.* 2011). O LCR desloca-se a partir dos locais de formação para os locais de reabsorção de acordo com um fluxo unidirecional nas cavidades ventriculares e com um fluxo multidirecional nos espaços aracnoideus (Skipor and Thiery

2008; Sakka *et al.* 2011; Zappaterra and Lehtinen 2012). O fluxo do LCR é impulsionado por 3 forças principais: pulsações arteriais do CP; gradiente de pressão hidrostática; e movimento ciliar das células ependimárias dos ventrículos (Johanson *et al.* 2011; Zappaterra and Lehtinen 2012). Outros fatores, tais como o ciclo respiratório, a pressão abdominal, a postura, o estado de stress e o esforço físico do indivíduo também modulam a dinâmica do fluxo do LCR (Sakka *et al.* 2011). Este fluido flui dos ventrículos laterais para o 3º ventrículo, através do Forame de Monro, e deste para o 4º ventrículo através do Aqueduto de Sylvius. Depois o LCR passa para o espaço subaracnoideu através dos Forames Luschka e Magendie (Kurtcuoglu *et al.* 2007; Skipor and Thiery 2008; Sakka *et al.* 2011; Zappaterra and Lehtinen 2012).

1.2.2.2. Função imunológica

O CP também tem um papel imunológico bastante importante, pois este monitoriza e modula o sistema neuroimunológico (Engelhardt *et al.* 2001; Emerich *et al.* 2005). Alojado no sistema ventricular cerebral, o CP tem uma posição ideal para monitorizar a presença de compostos potencialmente nocivos no LCR, servindo assim como primeira linha de defesa para o parênquima cerebral (Emerich *et al.* 2005). Este tecido protege o cérebro contra agressões neurotóxicas agudas e ajuda ou impede a distribuição geral de medicamentos e biocompostos tóxicos, uma vez que, possui um conjunto completo de enzimas metabólicas (Gao and Meier 2001; Ghersi-Egea and Strazielle 2001; Emerich *et al.* 2005). O CP contém altas concentrações de glutatona, cisteína e metalotioneínas, que têm a capacidade de sequestrar agentes tóxicos em circulação no LCR; enzimas de proteção contra radicais livres e stress oxidativo; sistemas de transporte de íões orgânicos e proteínas resistentes a multidrogas que permitem a exportação de compostos nocivos do LCR (Gao and Meier 2001; Emerich *et al.* 2005). Várias indicações comprovam que o CP medeia interações entre o sistema imunológico periférico e o cérebro, tais como, a presença de células linfóides no CP (Emerich *et al.* 2005); a expressão de moléculas de complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) I e II nas células epiteliais coróides, que quando reconhecem um antígeno estimulam a proliferação de linfócitos T (Serot *et al.* 2000; Emerich *et al.* 2005). E também, a presença de células Kolmer no CP, que agem como células fagocíticas, expressam moléculas MHC I e II e proliferam quando estimuladas por endotoxinas (Irwin *et al.* 1999; Emerich *et al.* 2005).

1.2.2.3. Síntese proteica

Para além da secreção de LCR, as células epiteliais do CP sintetizam um grande número de péptidos bioativos, fatores de crescimento e citocinas, que são responsáveis pelo desenvolvimento do SNC e pela manutenção da sua homeostase (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Redzic *et al.* 2005). O CP sendo uma fonte de polipéptidos assemelha-se aos neurónios e às células endócrinas secretoras de polipéptidos (Szmydynger-Chodobska *et al.* 1998; Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001).

Muitos dos polipéptidos com localização extracelular conhecida são também sintetizados pelas células epiteliais coroides, tais como a transtirretina (TTR), transferrina, ceruloplasmina, vasopressina (VP), *sonic hedgehog* (shh), ácido retinoico (AR), citocinas e vários fatores de crescimento (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Serot *et al.* 2003; Redzic and Segal 2004; Emerich *et al.* 2005).

No cérebro a TTR, também referida como pré-albumina, é sintetizada exclusivamente pelo epitélio do CP e representa mais de 20% das proteínas sintetizadas e 50% das proteínas secretadas por este órgão (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Redzic *et al.* 2005). A produção da TTR no CP é essencial para a manutenção do nível de triiodotironina (T3) no cérebro, sendo esta indispensável para o desenvolvimento do SNC (Schreiber *et al.* 1990; Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Redzic *et al.* 2005).

O CP é também uma fonte de VP presente no LCR (Chodobski *et al.* 1998; Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001). Esta acumula-se predominantemente perto da membrana apical das células epiteliais do CP sugerindo a sua libertação para o LCR quando os níveis de cAMP intracelular estão elevados e a proteína cinase A ativa (Chodobski *et al.* 1998; Chodobski *et al.* 2000; Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001). Foram observadas uma série de respostas fisiológicas e comportamentais à VP, incluindo alterações na permeabilidade da barreira hemato-encefálica à água, secreção hormonal, termorregulação, ciclos de sono-vigília, aprendizagem e memória (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001).

O epitélio do CP também secreta um número de fatores de crescimento importantes para o crescimento da célula, orientação dos axónios e migração dos neurónios (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Redzic *et al.* 2005; Zappaterra and Lehtinen 2012). O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) é altamente expresso no CP (Bondy *et al.* 1992; Logan *et al.* 1994; Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Redzic *et al.* 2005). O IGF-II produzido nos CPs liga-se aos recetores de IGF localizados nas células alvo e contribui para a orientação e crescimento dos axónios da medula espinhal (LeRoith *et al.* 1993; Redzic *et al.* 2005). Durante o desenvolvimento do SNC, o IGF-II atua de modo a promover a diferenciação das células epiteliais coroides, enquanto que num estado de desenvolvimento mais tardio o IGF-II proveniente do CP pode estar envolvido no desenvolvimento de outras partes do

cérebro e pode também desempenhar um papel no funcionamento normal do SNC adulto e na reparação de lesões (Bondy *et al.* 1992; Johanson *et al.* 2000; Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001).

Os membros da superfamília do fator de crescimento transformante- β (TGF- β) têm sido reconhecidos como importantes reguladores de diferentes funções celulares, incluindo a proliferação, sobrevivência e diferenciação (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Redzic *et al.* 2005). Existem três isoformas identificadas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), mas no CP embrionário apenas é expresso o TGF- β 3, ao passo que todas as isoformas de TGF- β estão presentes nas células epiteliais do CP adulto (Knuckey *et al.* 1996). A sua importância biológica parece ser o controlo da organização neuronal do SNC em desenvolvimento (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Redzic *et al.* 2005). As proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) são outra subfamília pertencente à superfamília TGF- β (Redzic *et al.* 2005). Vários membros desta subfamília, como BMP4, BMP5, BMP6 e BMP7 são expressos no cérebro embrionário e desempenham um papel importante no desenvolvimento do CP (Hebert *et al.* 2002), no entanto só BMP6 e BMP7 continuam a ser expressos no CP adulto, podendo desempenhar um papel importante em processos de reparação neuronal (Charytoniuk *et al.* 2000; Redzic *et al.* 2005).

A família de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) também são expressos durante o desenvolvimento do cérebro, mas apenas o FGF7 (fator de crescimento de queratinócitos) (Finch *et al.* 1995) e o FGF2 (Raballo *et al.* 2000) são expressos no CP embrionário (Redzic *et al.* 2005; Martin *et al.* 2006). Estes membros tem um papel essencial na regulação do desenvolvimento do CP e também controla o crescimento de outras partes do SNC (Redzic *et al.* 2005).

O AR, um derivado ativo do retinol (vitamina A), é essencial para o desenvolvimento normal do SNC, desempenhando um papel importante na diferenciação neuronal (Maden 2002; Redzic *et al.* 2005; Zappaterra and Lehtinen 2012). O AR também tem um papel crítico no crescimento do CP, visto que uma dieta insuficiente em vitamina A afeta o desenvolvimento do tecido coroide (Redzic *et al.* 2005).

O Shh é um fator morfogénico bem estabelecido no desenvolvimento do cerebelo e do cérebro ventral (Huang *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010; Zappaterra and Lehtinen 2012). As células epiteliais do CP do 4º ventrículo segregam Shh promovendo o crescimento vascular (angiogénese), o desenvolvimento e a expansão do CP (Nielsen and Dymecki 2010).

1.2.3. Plexo coroídeu e o envelhecimento

O CP sofre diversas modificações anatómicas com o aumento da idade. A atrofia do epitélio do CP é uma das alterações mais relevantes (Segal 2001; Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005). Com o envelhecimento, a altura das células epiteliais coroides diminui cerca de 10%, nos humanos, e cerca de 15%, nos ratos (Serot *et al.* 2000; Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005). Também o interior dessas células sofre alterações: o núcleo torna-se irregular e alongado e o citoplasma fica rico em inclusões fibrilares designadas por *Biong Ring Tangles* e depósitos de lipofuscina (Wen *et al.* 1999; Emerich *et al.* 2005). A membrana basal epitelial fica mais espessa, assim como o estroma, que contém fibras de colagénio, corpos hialinos e calcificações (Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005). As paredes das artérias também aumentam a sua espessura e as fibras elásticas começam a fragmentar-se (Serot *et al.* 2003).

Com o envelhecimento, o CP não consegue manter a produção normal de energia, alterando as suas funções (Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005). O CP sintetiza enzimas responsáveis pela produção de ATP, como por exemplo a lactato e succinato desidrogenase, que, no envelhecimento, diminuem a sua atividade enzimática provocando alterações dos metabolitos dependentes do catabolismo da glucose (Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005). Também com o envelhecimento, um número maior de células epiteliais torna-se deficiente em citocromo-C oxigenase levando a alterações da cadeia respiratória que por sua vez conduzem a uma diminuição da quantidade de ATP produzido (Cottrell *et al.* 2001; Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005).

A diminuição da secreção em cerca de 45% de LCR está provavelmente relacionada com as modificações a nível anatómico e enzimático que acontecem devido ao envelhecimento dos CPs (Preston 2001; Serot *et al.* 2003; Emerich *et al.* 2005). A renovação do LCR é mais lenta em idosos, sendo apenas renovado cerca de 2 vezes por dia. (May *et al.* 1990; Preston 2001; Serot *et al.* 2003).

Recentemente tem sido demonstrado que o CP possui fatores neurogénicos e neuroprotetivos estimulando efeitos terapêuticos (Zappaterra and Lehtinen 2012). A homeostase do CP assim como das funções que lhe estão associadas podem ser interrompidas por uma ampla variedade de lesões do SNC, tais como eventos traumáticos ou isquémicos e doenças neurológicas associadas à idade (Johanson *et al.* 2011). Uma lesão no CP pode por sua vez alterar a composição e a secreção do LCR, levando a um aumento do número de leucócitos no LCR e no cérebro, uma diminuição da *clearance* de toxinas e portanto uma diminuição do fornecimento de nutrientes e fatores de crescimento no cérebro (Johanson *et al.* 2011; Zappaterra and Lehtinen 2012). A recuperação da lesão cerebral envolve a correção gradual desses mecanismos, a fim de retornar a homeostase do sistema CP-LCR promovendo a neuroregeneração e neuroproteção (Zappaterra and Lehtinen 2012).

2. Esteroidogénese

A biossíntese de hormonas esteroides é designada por esteroidogénese e é regulada por mecanismos de retroação hormonal (Ghayee and Auchus 2007). Todas as hormonas esteroides derivam do colesterol que é grande parte das vezes fornecido pelo sangue, associado a lipoproteínas. Uma pequena percentagem de colesterol pode ser ainda produzida diretamente nas células esteroidogénicas a partir do acetato (Mensah-Nyagan *et al.* 1999; Mellon *et al.* 2001; Ghayee and Auchus 2007). A esteroidogénese envolve uma série de reações enzimáticas, através das quais o colesterol é convertido biologicamente em hormonas esteroides ativas, tais como glucocorticoides, mineralocorticoides, androgénios, estrogénios e progesterona (Ghayee and Auchus 2007; Miller and Auchus 2011). As hormonas esteroides regulam uma grande variedade de processos fisiológicos, desde o desenvolvimento da vida fetal até à idade adulta (Mellon and Griffin 2002; Miller and Auchus 2011). Interferências na biossíntese de esteróides podem resultar numa reprodução deficiente, em alterações na diferenciação, crescimento sexual, bem como no desenvolvimento de diversos cancros (Sanderson 2006; Miller and Auchus 2011). As enzimas intervenientes nesta via podem agrupar-se em enzimas do citocromo P450 (CYPs) e enzimas não pertencentes ao citocromo P450, tais como as hidroxisteroides desidrogenases (HSDs) e redutases esteroides (Mensah-Nyagan *et al.* 1999; Mellon *et al.* 2001; Mellon and Griffin 2002; Ghayee and Auchus 2007).

As enzimas do citocromo P450 constituem um grupo de enzimas oxidativas, que apresentam aproximadamente 500 aminoácidos e cada uma contém um único grupo heme (Mellon and Griffin 2002; Miller and Auchus 2011). Estas são denominadas P450 pois todas têm um pico de absorvância a 450nm quando são reduzidas com monóxido de carbono (Mellon and Griffin 2002; Miller and Auchus 2011). O genoma humano inclui genes para 57 enzimas do citocromo P450, onde 7 destas enzimas são direcionadas para as mitocôndrias e são designadas P450 do tipo 1. As outras 50 enzimas são direcionadas para o retículo endoplasmático e são denominadas P450 do tipo 2 (Miller and Auchus 2011). Todas estas enzimas ativam o oxigénio molecular utilizando o seu grupo heme e adicionam eletrões a partir da forma reduzida da nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato (NADPH) (Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002). Os dois tipos de enzimas P450 são distinguidos bioquimicamente através dos mecanismos pelos quais recebem eletrões do NADPH, bem como pelas suas localizações intracelulares. As enzimas do tipo 1 recebem eletrões através de uma flavoproteína, ferredoxina redutase, e por uma pequena proteína ferro-enxofre, a ferredoxina, enquanto que as enzimas do tipo 2 recebem eletrões através de uma proteína flavina-2, P450 oxidoreductase (POR) (Compagnone and Mellon 2000; Miller and Auchus 2011). Cada enzima pode catalisar vários substratos através de uma ampla gama de oxidações. Das enzimas P450, 6 estão envolvidas na esteroidogénese: na mitocôndria localizam-se a P450_{scc} (enzima de clivagem da cadeia lateral) também denominada por 20,22-desmolase e duas isoenzimas do

P450c11, a P450c11B (11 β -hidroxilase) e a P450c11AS (aldosterona sintase) que tem atividade 11 β -hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-metil oxidase; no retículo endoplasmático estão presentes a P450c17 que catalisa tanto a atividade 17 β -hidroxilase como a 17,20-liase, a P450c21 (21-hidroxilase esteroide) que catalisa a síntese de glucocorticoides e mineralocorticoides e por fim a P450 aro que catalisa a aromatização de androgénios em estrogénios (Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002; Miller and Auchus 2011).

As enzimas HSDs têm massas moleculares de cerca de 35 a 45 kDa, não têm grupo heme e requerem nicotinamida-adenina-dinucleótido (fosfato) (NAD/ NADH ou NADP/NADPH) como cofatores para reduzir ou oxidar o esteroide (Compagnone and Mellon 2000; Miller and Auchus 2011). A maioria dos exemplos envolvem a conversão de um álcool secundário numa cetona ou vice-versa. As enzimas 5 α -redutase do tipo1 e do tipo2 são frequentemente agrupadas à família das HSDs por conveniência, pois estas reduzem as ligações duplas carbono-carbono em vez de agirem sobre os carbonos ligados ao oxigénio (Compagnone and Mellon 2000; Miller and Auchus 2011). Ao contrário da maioria das reações catalisadas pelas enzimas P450, que são resultado da ação de uma única enzima, nas reações catalisadas pelas HSDs podem intervir pelo menos duas enzimas (Miller and Auchus 2011). As enzimas HSDs incluem a 3 α -HSD, a 3 β -HSD, duas isoformas da 11 β -HSD e uma série de isoformas da 17 β -HSD. Com base nas suas estruturas, estas enzimas são divididas em dois grupos: a família desidrogenase/redutase (SDR) e a família aldo-ceto-redutase (AKR) (Compagnone and Mellon 2000). As enzimas SDR incluem a 11 β -HSD tipo 1 e 2 bem como a 17 β -HSD tipo 1, 2 e 3, já as enzimas AKR incluem a 17 β -HSD tipo 5 (Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002; Miller and Auchus 2011). Com base na atividade das enzimas, há distinção entre as desidrogenases que usam o NAD⁺ como cofator para oxidar os hidroxiesteroides em cetoesteroides e as redutases que usam principalmente o NADPH para reduzir os cetoesteroides em hidroxiesteroides (Miller and Auchus 2011).

2.1. Locais de síntese de hormonas esteroides

As hormonas esteroides são produzidas em vários órgãos, incluindo as glândulas supra-renais, testículos, ovários e placenta, sendo denominados por órgãos esteroideogénicos (Mellon and Griffin 2002; Sanderson 2006; Ghayee and Auchus 2007).

2.1.1. Glândula adrenal

A glândula adrenal é um dos tecidos esteroidogénicos mais importantes e é essencial para a sobrevivência (Sanderson 2006). Toda a síntese de esteroides é efetuada no córtex adrenal que é funcionalmente dividido em 3 regiões, onde cada uma é responsável por um conjunto de hormonas esteroides: a zona glomerulosa produz os mineralocorticoides, que regulam o equilíbrio de Na^+ e de K^+ nos fluidos extracelulares; a zona fasciculada produz os glucocorticoides, que são importantes na homeostase da glucose no organismo e no controlo do sistema imunitário; e a zona reticular produz androgénios fracos, tais como a dehidroepiandrosterona (DHEA) ou androstenediona (Sanderson 2006; Ghayee and Auchus 2007). Após o primeiro passo da esteroidogénese, a pregnenolona é convertida em progesterona pela 3β -HSD (Figura 5) (Simard *et al.* 2005; Sanderson 2006). Posteriormente, a enzima P450c21 (Figura 5), é responsável pela conversão da progesterona e da 17α -hidroxiprogesterona em 11-desoxicorticosterona (mineralocorticoide) ou em 11-desoxicortisol (glucocorticoide) (Sanderson 2006). Estes precursores, por sua vez, são convertidos nas hormonas biologicamente ativas designadas por cortisol e aldosterona, através das enzimas mitocondriais P450c11 β e P450c11AS (Figura 5), respetivamente (Rainey 1999; Miller and Auchus 2011). Os androgénios adrenais são sintetizados a partir da enzima P450c17 que tem dupla atividade, 17α -hidroxilase e $17,20$ -liase (Reincke *et al.* 1998; Miller and Auchus 2011). Assim, esta enzima hidroxila a pregnenolona e a progesterona para formar o 17α -hidroxisteroides, já a $17,20$ -liase da P450c17 converte os 17α -hidroxisteroides em DHEA ou androstenediona (Figura 5) (Sanderson 2006; Miller and Auchus 2011).

2.1.2. Testículos

O papel dos testículos não é só a produção de esperma fértil para a procriação mas também sintetizar hormonas esteroides para a função sexual e reprodutiva (Sanderson 2006). A produção de testosterona a partir do colesterol é estimulada através da ligação da hormona luteinizante (LH) com o seu recetor na membrana das células de Leydig (Sanderson 2006). A LH induz as enzimas esteroidogénica, incluindo a P450c17 com atividade $17,20$ -liase que dirige a biossíntese de esteroides para a produção de hormonas sexuais (Dharia *et al.* 2004). A via da esteroidogénese até ao momento da produção de androstenediona é semelhante ao que acontece na glândula adrenal (Sanderson 2006). Posteriormente, este androgénio fraco é convertido para testosterona pela enzima 17β -HSD (Figura 5) (Mindnich *et al.* 2004; Miller and Auchus 2011). Também, as células do testículo, expressam níveis baixos de P450 aro que converte a testosterona em estradiol (Figura 5), sendo este passo necessário para a iniciação da espermatogénese bem sucedida (Carreau *et al.* 2003; Miller and Auchus 2011). O mais

potente dos androgénios, denominado por dihidrotestosterona (DHT) é formado a partir de testosterona pela enzima 5 α -redutase (Figura 5) (Sanderson 2006; Miller and Auchus 2011). No entanto esta reação não é predominante no testículo adulto mas sim no epidídimo e na próstata, permitindo a manutenção da função sexual (Sanderson 2006).

2.1.3. Ovários

Tal como o testículo, o ovário tem a função de produzir os óvulos para a fertilização e a síntese de hormonas esteroides (Sanderson 2006). O óvulo está localizado no interior do folículo em desenvolvimento que está rodeado pelas células da granulosa seguidas pelas células da teca, locais predominantes da esteroidogénese. A teca interna produz grandes quantidades de progesterona e androgénios, que atuam como precursores para a síntese de estradiol pelas células da granulosa (Sanderson 2006). Assim, através da ação da P450 aro, a androstenediona e a testosterona são convertidas em estrona e estradiol (Figura 5), respetivamente. A estrona sintetizada pode, posteriormente, ser convertida em estradiol, através da ação 17 β -HSD tipo 1 (Figura 5) (Mindnich *et al.* 2004). Na fase folicular de pré-ovulação, os estrogénios aumentam gradualmente devido à regulação positiva da P450 aro através das hormonas LH e FSH (hormona folículo estimulante). O declínio de LH leva a uma expressão diminuída da P450 aro e conseqüentemente uma produção reduzida de estradiol, no entanto há um aumento da expressão das enzimas P450scc e 3 α -HSD que promovem a síntese de progesterona iniciando-se assim a rutura do folículo dando depois origem ao corpo lúteo (Sanderson 2006).

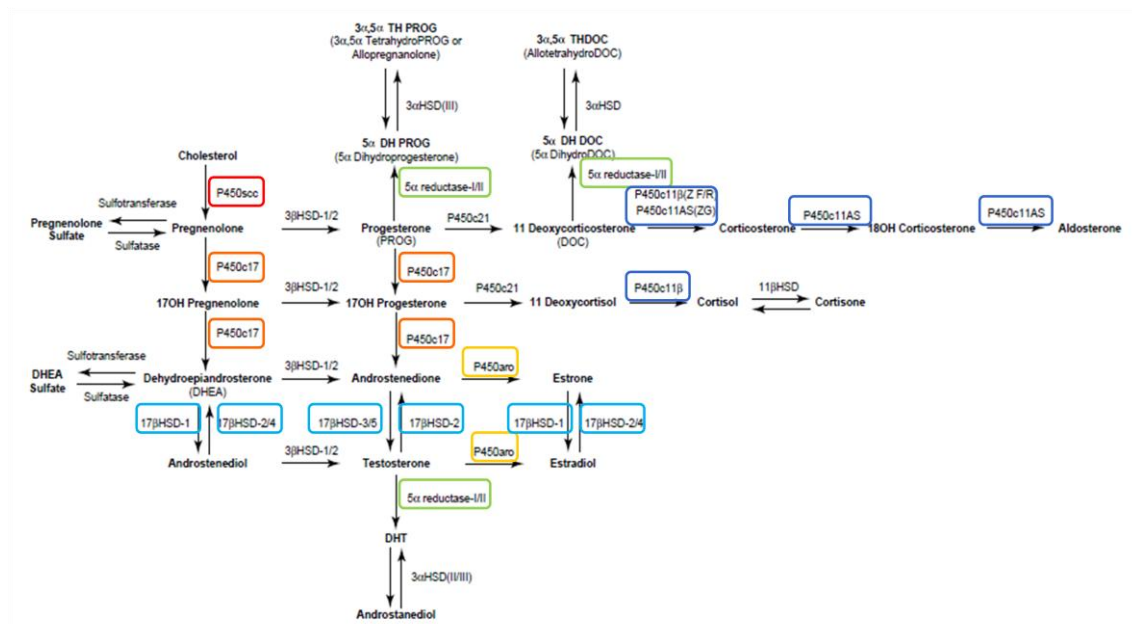


Figura 5 - Esquema representativo da via da esteroidogénese. Adaptada de (Mellon and Griffin 2002)

2.2. Neurosteroidogénese

A primeira evidência de que o cérebro era um órgão esteroidogénico surgiu na década de 80, quando Baulieu *et al.* observaram que os esteroides, tais como a pregnenolona e DHEA estavam presentes em concentrações mais elevadas no SN do que no plasma (Compagnone and Mellon 2000; Baulieu *et al.* 2001; Mellon and Griffin 2002). Com estes resultados surgiram dois termos novos, neurosteroidogénese, como o nome indica, síntese de hormonas esteroides no SN e neuroesteroides, hormonas esteroides que têm como local de síntese e ação o SN (Baulieu *et al.* 2001). Estes esteroides participam em importantes funções biológicas no cérebro, durante a embriogénese e a fase adulta, tais como a mielinização, organogénese, memória, neuroproteção entre outras (Mellon and Griffin 2002).

No cérebro, também a síntese de esteroides tem como precursor inicial o colesterol, sendo também necessário enzimas específicas dependendo do esteroide a sintetizar (Mellon *et al.* 2001). No entanto, também as hormonas esteroides circundantes, produzidas nos órgãos esteroidogénicos clássicos, podem servir como precursores para a síntese de neuroesteroides (Basta-Kaim *et al.* 2006; Wojtal *et al.* 2006). Algumas hormonas esteroides, como a progesterona, testosterona e desoxicorticosterona (DOC) podem servir de precursores para a produção de esteroides neuroativos (Basta-Kaim *et al.* 2006). Esta síntese é efetuada a partir da redução de um esteróide precursor, realizada pela enzima 5 α -redutase, seguida de uma hidroxilação, realizada pela enzima 3 α -HSD (Figura 5 e 6). Assim, através da atuação sequencial destas duas enzimas, a progesterona é convertida em 3 α -5 α -tetrahydroprogesterona (alopregnenolona), a testosterona é convertida em androstanediol e a DOC é convertida em 3 α -5 α -tetrahydroDOC (THDOC) (Figura 6) (Basta-Kaim *et al.* 2006). O SN contém ainda enzimas esteroidogénicas adicionais, incluindo as sulfotransferases, que convertem a pregnenolona e a DHEA em pregnenolona sulfatada e DHEA sulfatada (DHEAS) (Figura 5) (Wojtal *et al.* 2006). Estas enzimas sintetizam uma variedade de compostos neuroativos a partir de hormonas esteroides clássicas e estes são considerados inativos quando presentes na glândula adrenal, gónadas e placenta. Assim, com base nas características estruturais, os neuroesteroides podem ser classificados como neuroesteroides derivados da pregnanolona, neuroesteroides derivados de androgénios e neuroesteroides sulfatados (Mellon and Griffin 2002).

Os neuroesteroides atuam no SN por mecanismos autócrinos ou parácrinos, podendo regular a expressão génica pela ligação a recetores nucleares e/ou afetar a neurotransmissão, através de ações mediadas por recetores de neurotransmissores e canais iónicos (Wojtal *et al.* 2006) (Schumacher *et al.* 2000; Plassart-Schiess and Baulieu 2001).

Ao longo da vida de um indivíduo observam-se alterações na neurosteroidogénese e consequentemente nos níveis de neuroesteroides (Charalampopoulos *et al.* 2008). As flutuações dos níveis de neuroesteroides no desenvolvimento fetal, podem controlar a

sobrevivência neuronal, a apoptose, a autorrenovação das células estaminais neuronais e a sua diferenciação em áreas distintas do SN (Mellon and Griffin 2002; Charalampopoulos *et al.* 2008). Na idade adulta, concentrações elevadas de neuroesteroides no SN permitem proteger os neurónios de agentes neurotóxicos e pró-apoptóticos e propagar células estaminais neuronais adultas permitindo a neurogênese em áreas do SN danificadas (Charalampopoulos *et al.* 2008). Algumas situações de stress podem resultar de distúrbios na neuroesteroidogênese, levando por sua vez a uma diminuição dos níveis de neuroesteroides e ao aumento da neurodegeneração (Mellon and Griffin 2002; Charalampopoulos *et al.* 2008). No envelhecimento há um declínio nos níveis de neuroesteroides, diminuindo a proteção do cérebro contra fatores neurotóxicos endógenos e ambientais (Charalampopoulos *et al.* 2008). A redução desses esteroides está intimamente relacionada com doenças neurodegenerativas. Vários neuroesteroides têm propriedades neuroprotetoras, com particular interesse para o tratamento de várias neuropatologias associadas à idade (Mellon and Griffin 2002; Wojtal *et al.* 2006; Charalampopoulos *et al.* 2008).

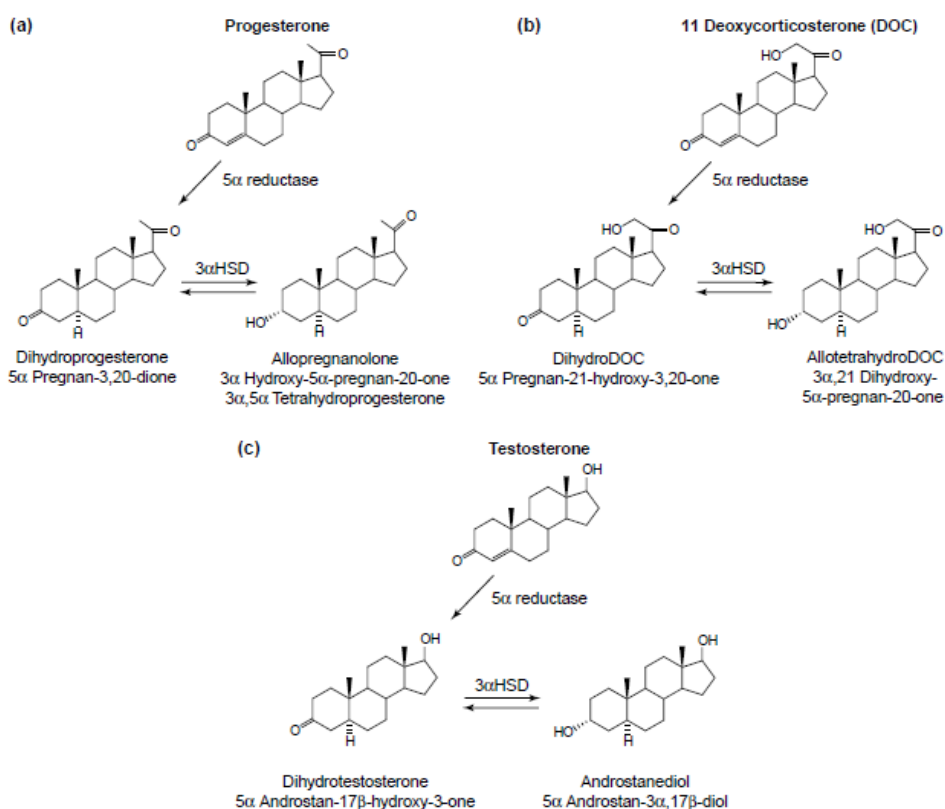


Figura 6 - Síntese de esteroides neuroativos a partir hormonas esteroides. A imagem a) representa a metabolização de progesterona originando o neuroesteróide allopregnenolona; a imagem b) representa a conversão da 11-deoxicorticosterona (DOC) em alotetrahidroDOC; a imagem c) representa a metabolização de testosterona em androstanediol. Adaptada de (Mellon and Griffin 2002)

Os neuroesteroides modulam a função de vários recetores, e também regulam o crescimento de neurónios, a mielinização e a formação de sinapses no SNC (Mellon and Griffin 2002). A progesterona, por exemplo, desempenha um papel importante na formação e reparação de bainhas de mielina dos axónios de neurónios, ao mediar o aumento da transcrição dos genes que codificam proteínas envolvidas na mielinização nas células de schwann e nos oligodendrócitos (Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002; Ibanez *et al.* 2003; Wojtal *et al.* 2006; Charalampopoulos *et al.* 2008; Schumacher *et al.* 2008). As hormonas DHEAS e DHEA modulam o crescimento das ramificações dos corpos celulares (dendrites, axónios) em regiões onde a enzima P450c17 é sintetizada. Em particular o DHEA promove o crescimento axonal e aumenta os índices morfológicos de contactos sinápticos, enquanto o DHEAS promove o crescimento dendrítico (Compagnone and Mellon 1998; Wojtal *et al.* 2006; Charalampopoulos *et al.* 2008). Também, a alopregnenolona permite orientar e aperfeiçoar o crescimento axonal e as conexões sinápticas (Wojtal *et al.* 2006; Charalampopoulos *et al.* 2008). Os neuroesteroides para além de afetarem a mielinização e o crescimento de dendrites e axónios, têm efeitos anti-apoptóticos. De fato, a DHEA, DHEAS, alopregnenolona e progesterona parecem estar envolvidas na proteção contra a apoptose neuronal no SNC (Mellon and Griffin 2002; Basta-Kaim *et al.* 2006; Charalampopoulos *et al.* 2008)

O envelhecimento e doenças associadas podem ser resultado de uma neurosteroidogênese alterada, proporcionando baixos níveis de pregnenolona, pregnenolona sulfatada, DHEA e DHEAS e altos níveis alopregnenolona no SN que levam à perda de memória (Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002). Assim, a redução dos níveis de DHEA e DHEAS durante o envelhecimento, representam uma das principais causas para a disfunção, vulnerabilidade e degeneração neuronal (Mellon and Griffin 2002; Basta-Kaim *et al.* 2006; Wojtal *et al.* 2006). Este declínio leva a uma acumulação do péptido β -amilóide (β A) nos neurónios (Schumacher *et al.* 2000; Wojtal *et al.* 2006). Este péptido tem um efeito neurotóxico que leva ao aumento do cálcio intracelular proporcionando a morte neuronal e o aparecimento de Doença de Alzheimer (Basta-Kaim *et al.* 2006; Wojtal *et al.* 2006). No entanto, a administração de altos níveis de neuroesteroides no SN, permitiu a diminuição da neurotoxicidade do péptido β A (Basta-Kaim *et al.* 2006). Também, a pregnenolona e a progesterona têm promovido a redução de danos do SN e a recuperação neurológica (Mellon and Griffin 2002). Com estas observações, os neuroesteroides são considerados neuroprotetores endógenos contra a neurotoxicidade. (Basta-Kaim *et al.* 2006; Wojtal *et al.* 2006).

3. Enzimas envolvidas na neuroesteroidogênese e a sua expressão no SN

A síntese de esteroides neuroativos no SN requer também a atuação de uma vasta gama de enzimas esteroidogênicas específicas para cada passo da via. Similarmente, à via da esteroidogênese clássica, as enzimas intervenientes pertencem às enzimas CYPs, incluindo a P450scc, P450c11, a P450c11B, P450c17, P450c21, P450 aro, ou às enzimas HSDs, incluindo a 3 α -HSD, 3 β -HSD, 11 β -HSD, 17 β -HSD e a 5 α -redutase.

3.1. P450scc

A enzima P450scc está presente na mitocôndria de todas as células esteroidogênicas e como já foi referido catalisa o primeiro passo da esteroidogênese, conversão do colesterol em pregnenolona (Figura 5) (Compagnone and Mellon 2000). Este processo envolve 3 reações químicas sucessivas: a 22-hidroxilação do colesterol, a 20-hidroxilação do 22-hidroxicolesterol e a cisão oxidativa da ligação do C20-C22, sendo os produtos, a pregnenolona e o ácido isocapróico (Mellon 1994; Mellon *et al.* 2001; Miller and Auchus 2011). Para exercer a sua atividade a enzima recebe eletrões do NADPH através da ferredoxina redutase e ferredoxina (Compagnone and Mellon 2000). No genoma humano e de rato existe apenas um gene que codifica a P450scc, denominado CYP11A1. Este tem cerca de 20 KpB de comprimento, contém 9 exões e localiza-se no cromossoma 15 humano (Morohashi *et al.* 1987; Mellon *et al.* 2001; Miller and Auchus 2011). O gene CYP11A1 por sua vez codifica uma proteína de 521 aminoácidos que é clivada durante a sua entrada na mitocôndria (Miller and Auchus 2011). A atividade desta enzima e a biossíntese de pregnenolona têm sido demonstradas no cérebro de rato e humano (Compagnone and Mellon 2000; Miller and Auchus 2011).

A enzima P450scc já foi identificada em diferentes regiões do SN (Compagnone and Mellon 2000). O nível de expressão relativa desta enzima foi detetada pela análise de mRNA (RT-PCR e PCR em tempo real), pela análise de proteína (Western Blot e imunocitoquímica) e/ou pela atividade da proteína. Os locais onde se observou maior expressão da P450scc foram o córtex, gânglio basal e o SN (Mellon and Deschepper 1993; Compagnone *et al.* 1995; Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002). Também no hipocampo, bulbo olfativo, hipotálamo, tálamo, tegumento, cerebelo, pituitária e medula espinhal já se detetou a enzima mas com níveis de expressão mais reduzidos (Mellon and Deschepper 1993; Compagnone *et al.* 1995; Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002).

3.2. P450c17

A pregnenolona e a progesterona podem ser submetidas a 17 α -hidroxilação sendo convertidas em 17 α -hidroxipregnenolona e 17 α -hidroxiprogesterona, respetivamente (Compagnone and Mellon 2000; Miller and Auchus 2011). Posteriormente, estes podem ser submetidos a uma cisão entre o C17-C20 formando o DHEA e androstenediona (Figura 5) (Compagnone and Mellon 2000; Miller and Auchus 2011). Estas reações são mediadas pela enzima P450c17 que tem dupla atividade, 17 α -hidroxilase e 17,20-liase (Nakajin *et al.* 1981; Miller and Auchus 2011). Esta enzima recebe eletrões do NADPH através do co-factor P450-redutase para exercer a sua atividade oxidativa (Compagnone and Mellon 2000). A proteína P450c17 com tamanho de 57 KDa é codificada por um único gene denominado CYP17A1, que se localiza no cromossoma 10 e contém 8 exões no genoma humano (Matteson *et al.* 1986; Fan *et al.* 1992; Miller and Auchus 2011).

A enzima P450c17 também já foi detetada em diferentes regiões do SN, nomeadamente no córtex, hipocampo, protuberância, medula espinhal e SNP com uma expressão mais elevada do que no gânglio basal, tálamo, tegumento e cerebelo (Compagnone *et al.* 1995; Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002). No gânglio basal, tegumento e cerebelo a enzima é expressa nas fibras e não nos corpos celulares (Compagnone *et al.* 1995; Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002).

3.3. P450c11

Os passos finais da síntese de glucocorticoides e mineralocorticoides são mediados por duas enzimas mitocondriais da família do P450c11, a enzima P450c11 β e P45011AS (White *et al.* 1994; Miller and Auchus 2011), que são codificadas por dois genes diferentes, designados por CYP11B1 e CYP11B2, respetivamente, e são localizados no cromossoma 8 do genoma humano (Mornet *et al.* 1989; Zhang and Miller 1996). A enzima P450c11 β é responsável pela conversão do 11-desoxicorticosterona e do 11-deoxicortisol em corticosterona e cortisol, respetivamente. A enzima P450c11AS, tem 3 atividades distintas, 11 β -hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-metil-oxidase permitindo converter a 11-desoxicorticosterona em aldosterona (Figura 5) (White *et al.* 1994; Compagnone and Mellon 2000; Miller and Auchus 2011). As duas isoenzimas necessitam também da ferredoxinase redutase e ferredoxina para receberem eletrões, mediando assim a sua catálise (Miller and Auchus 2011). No rato, existe um terceiro gene, denominado por P450c11B3 que codifica uma enzima da família P450c11 (Zhang and Miller 1996; Compagnone and Mellon 2000). Esta enzima tem atividade 11 β -hidroxilase e 18-

hidroxilase, portanto, pode catalisar a produção de corticosterona e 18-OH-corticosterona a partir da DOC e da 18- hidroxideoxicorticosterona (Compagnone and Mellon 2000).

A enzima P450c11 β já foi detetada em diferentes regiões do SNC. Em vários estudos observou-se que a expressão relativa desta enzima é elevada no córtex, hipocampo, gânglio basal e no cerebelo. Esta enzima apresenta uma expressão moderada no hipotálamo e tálamo (Gomez-Sanchez *et al.* 1997; Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002). A enzima P450c11A5 também foi identificada apenas em algumas regiões do SNC, sendo mais expressa no hipotálamo e no córtex do que no hipocampo e cerebelo (Gomez-Sanchez *et al.* 1997; Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002).

3.4. 17 β -HSD

Múltiplas reações são catalisadas por um grupo de enzimas conhecidas por 17 β -HSD, por vezes também denominados por 17-oxidoreduases ou 17-cetoesteróide redutase (Labrie *et al.* 1997; Peltoketo *et al.* 1999; Compagnone and Mellon 2000). Estas reações incluem as conversões do DHEA em androstenediol, da androstenediona em testosterona e da estrona em estradiol ou vice-versa (Figura 5) (Labrie *et al.* 1997; Moghrabi and Andersson 1998; Peltoketo *et al.* 1999; Mellon *et al.* 2001; Miller and Auchus 2011). Nos humanos, na família 17 β -HSD existem pelo menos 14 isoformas, que variam em tamanho, estrutura, especificidade ao substrato e na utilização de um cofator na função fisiológica (Compagnone and Mellon 2000; Mellon *et al.* 2001; Miller and Auchus 2011). A isoforma 17 β -HSD tipo I, é uma enzima redutora citosólica, que catalisa, principalmente, a conversão da estrona em estradiol, no entanto, também tem a capacidade de converter o DHEA em androstenediol e a androstenediona em testosterona. O gene que converte esta isoforma é o HSD17B1 localizado no cromossoma 17 (Tremblay *et al.* 1989; Luu-The *et al.* 1995). A isoforma 17 β -HSD tipo II, é uma enzima oxidase microssomal, que inativa a produção de androgénios e estrogénios através da oxidação destes esteróides sexuais (Tremblay *et al.* 1989; Luu-The *et al.* 1995). Esta isoforma tem a capacidade de converter o estradiol em estrona, o androstenediol em DHEA e a testosterona em androstenediona (Miller and Auchus 2011). A isoforma 17 β -HSD tipo III, é uma enzima microssomal, que converte, especialmente, a androstenediona em testosterona (Luu-The *et al.* 1995; Andersson *et al.* 1996). A isoforma 17 β -HSD tipo IV é uma enzima oxidase semelhante à 17 β -HSD tipo II, pois também tem a capacidade de converter o estradiol em estrona (Adamski *et al.* 1995). A 17 β -HSD tipo V catalisa a redução da androstenediona em testosterona (Compagnone and Mellon 2000).

A 17 β -HSD foi apenas detetada em regiões do SNC. Esta enzima foi identificada no córtex, hipocampo, gânglio basal, hipotálamo, tálamo e cerebelo numa expressão relativamente reduzida (Pelletier *et al.* 1995; Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002).

3.5. P450 aro

A aromatização de esteroides estrogénicos com 18 carbonos a partir de esteroides androgénicos com 19 carbonos é mediada pela enzima P450 aro, que se localiza no retículo endoplasmático (Compagnone and Mellon 2000; Simpson *et al.* 2002; Miller and Auchus 2011). A P450 aro é uma glicoproteína, que converte os androgénios, em especial, a androstenediona e testosterona em estradiol através de duas hidroxilações no metil-C19 e uma terceira hidroxilação no C2 (Figura 5) (Simpson *et al.* 1994; Mellon *et al.* 2001; Miller and Auchus 2011). Esta enzima é codificada por um único gene designado por CYP19A1 presente no cromossoma 15 (Compagnone and Mellon 2000; Mellon *et al.* 2001).

A P450 aro foi identificada com uma expressão reduzida em algumas regiões do SNC, tais como o córtex, hipocampo, gânglio basal, hipotálamo e tálamo (Lephart *et al.* 1992; Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002).

3.6. 5 α -redutase

A enzima 5 α -redutase permite a conversão da testosterona num androgénio mais forte, nomeadamente a DHT (Figura 5) (Miller and Auchus 2011). No cérebro esta enzima metaboliza rapidamente a progesterona em 5 α -dihidroprogesterona e esta é reduzida num potente neuroesteroide, denominado de 3 α -5 α -tetrahydroprogesterona pela enzima 3 α -HSD (Figura 6) (Compagnone and Mellon 2000; Mellon *et al.* 2001). A 5 α -redutase possui duas formas distintas, que diferem em relação ao local onde são distribuídas e às suas características bioquímicas (Mellon *et al.* 2001; Miller and Auchus 2011). A 5 α -redutase tipo I, codificada pelo gene SDR5A1 localizado no cromossoma 5, localiza-se principalmente em tecidos periféricos como a pele e a 5 α -redutase tipo II, codificada pelo gene SDR5A2 localizado no cromossoma 2, localiza-se em especial nos tecidos reprodutivos de machos (Thigpen *et al.* 1993; Compagnone and Mellon 2000).

A 5 α -redutase foi identificada tanto em regiões do SNC (córtex, hipocampo, gânglio basal, hipotálamo, tálamo, cerebelo, pituitária e medula espinhal) como do SNP (Celotti *et al.* 1992; Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002).

Muitas outras enzimas, tais como 7 α -hidroxilase, 20 α -hidroxilase e 26 α -hidroxilase, intervenientes no metabolismo dos esteroides têm sido identificadas no cérebro (Ray *et al.* 1997; Rose *et al.* 1997).

4. Objetivo

As enzimas citocromo P450, família 11, subfamília a, polipéptido 1 (CYP11A1), citocromo P450, família 11, subfamília b, polipéptido 3 (CYP11B3), citocromo P450, família 17, subfamília a, polipéptido 1 (CYP17A1), 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD), 5 α -redutase (5 α red) e citocromo P450, família 19, subfamília a, polipéptido 1 (CYP19A1) foram identificadas no CP de rato num estudo de microarrays de cDNA, sugerindo que este tecido poderia ser um local de síntese de hormonas esteroides. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi confirmar e analisar a expressão destas enzimas em CP de *Rattus norvegicus* e *Sus domesticus*, e demonstrar a bioatividade destas enzimas no tecido em estudo.

II. Materiais e Métodos

1. Animais

Para a realização do presente trabalho foram usados vários modelos animais: ratos (*Rattus Norvegicus*) da estirpe wistar com 2 meses \pm 2 semanas, ratos recém-nascidos (3 a 5 dias de idade) e porcos adultos (*Sus domesticus*).

Ratos de 2 meses \pm 2 semanas de idade foram manipulados e divididos em 4 grupos, fêmeas controlo (Sham - cirurgicamente abertos sem remoção das gónadas), fêmeas ovariectomizadas (OVX), machos Sham e machos orquidectomizados (OOX). Estes animais foram mantidos sob fotoperíodo natural, com fornecimento de água e alimentos *ad libitum*. Duas semanas após as cirurgias, os animais foram anestesiados via peritoneal com uma mistura injetável de cetamina e xilazina, numa proporção de 2:1 e sacrificados por decapitação. Os hemisférios cerebrais foram separados e os CPs de ventrículos laterais recolhidos. Os tecidos destinados à extração de RNA e proteína foram congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C , já as amostras de CP para imunohistoquímica (IHC) foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% para posterior processamento histológico. Também, alguns CPs de ratos foram destinados para testes funcionais das enzimas esteroideogénicas. Os ratos recém-nascidos foram utilizados para a obtenção de culturas primárias de células epiteliais do CP (CPEC), estas foram destinadas para a realização de imunocitoquímica (ICC) e ensaios funcionais das enzimas esteroideogénicas. Os porcos adultos de ambos os sexos foram sacrificados pelos profissionais da empresa Oviger - Produção, Transformação e Comércio de Carnes e Derivados SA e posteriormente procedeu-se à recolha dos CPs. Estes foram fixados em PFA 4% para a realização de IHC.



Figura 7 - Esquema representativo dos modelos animais utilizados no presente trabalho.

2. Extração de RNA Total

A obtenção de sequências de RNA puras e integras torna-se extremamente difícil devido especialmente à sua degradação por ação enzimática das ribonucleases (RNases), que são extremamente resistentes. Para minimizar os danos no RNA e obter resultados favoráveis, é necessário a utilização de fortes agentes desnaturantes, tais como fenóis e sais de guanidina que efetuam a lise celular e a inativação de RNases, usando água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC), que é também um potente inibidor de RNases. Todo o procedimento deve ser realizado em gelo devido à sensibilidade térmica do RNA.

A extração do RNA Total (RNAt) foi efetuada utilizando o TRIzol[®] Reagent de acordo com as recomendações do fabricante. Assim, para extrair RNAt do CP de rato adicionou-se 300 µL de reagente TRIzol (1ml TRIzol / 100mg de tecido), que consiste numa solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, a cada microtubo de 1.5 mL que contém um par de CPs previamente congelados a -80°C e homogeneizou-se manualmente com um pilão, permitindo assim o rompimento das células e a dissolução de vários componentes celulares. Após uma incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente, que permitiu a completa dissociação de complexos de nucleoproteínas, adicionou-se 60 µL de clorofórmio (200 µL de clorofórmio / 1 mL de TRIzol) e homogeneizou-se a amostra por inversão, esta foi incubada 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foi centrifugada a 4°C durante 15 minutos a 12000 x g. Após a centrifugação, a solução separou-se em três fases: no fundo de cada tubo obtivemos a fase orgânica (rosa) que contém as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio, a interfase onde está presente o DNA e por fim a fase aquosa (transparente), onde está contido o RNA. Deste modo, a fase de interesse foi transferida para um novo microtubo ao qual se adicionou 150 µL de isopropanol (500 µL de isopropanol / 1mL de TRIzol) e misturou-se por inversão, permitindo a recuperação do RNA por precipitação. Após a solução ter sido incubada 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 4°C durante 10 minutos a 12000 x g, rejeitou-se o sobrenadante. O RNA, sob forma de um precipitado branco (pellet), que posteriormente foi lavado duas vezes, onde em cada lavagem se adicionou 500 µL de etanol 75% em água DEPC a -20°C, centrifugou-se a 4°C durante 5 minutos a 7500 x g. Por último, o precipitado de RNA Total foi re-hidratado em 10 µL de água tratada com DEPC e armazenado a -80°C para uso posterior.

2.1. Determinação da integridade do RNA Total

A integridade do RNAt foi analisada pela visualização, com luz Ultra Violeta, do padrão de eletroforese do RNA ribossomal (rRNA), em gel de agarose a 1% corado com Brometo de

Etídio, reagente altamente mutagénico e cancerígeno. A qualidade do RNA é confirmada pela presença de 2 bandas de rRNA, 18S e 28S, onde a última banda deve apresentar o dobro da intensidade da primeira. Se o RNA estiver degradado esta proporção de 2:1 não se verifica e poderá haver arrastamento. O primeiro passo deste procedimento foi preparar o gel de agarose a 1%, para tal pesou-se 0,4g de agarose, adicionou-se 40mL de Tampão TAE 1x diluído em água tratada com DEPC, e no final 40 µL de Brometo de Etídio, agente que se intercala com ácidos nucleicos. As soluções de deposição (2µL de amostra, 8 µL de H₂O estéril e 2 µL de *loading buffer* 10x) foram preparadas e depositadas no gel e para finalizar visualizou-se o gel no transiluminador, depois da eletroforese do gel ter corrido a 100V durante 30 minutos.

2.2. Quantificação do RNAt Total

A quantificação do RNAt foi realizada por espectrofotometria, utilizando o nanoespectrofotómetro (Nanophotometer™, Implen, Germany). Este aparelho fornece diretamente a concentração de RNAt (µg/µL) e o rácio entre a A_{260}/A_{280} , que indica o grau de pureza do RNAt com base na absorvência a 260 nm, comprimento de onda ao qual os ácidos nucleicos têm pico de absorção, e a 280 nm, comprimento de onda ao qual as proteínas têm pico de absorção. Para determinar uma boa qualidade e pureza de RNAt, o rácio em causa deverá estar no intervalo de 1,8 a 2,1.

3. Síntese de DNA complementar

O cDNA é um DNA sintetizado a partir da transcrição reversa do mRNA, por ação da enzima transcriptase reversa, obtendo como produto final, uma cópia exata do gene sem intrões. Para atuação desta enzima, é necessário a presença de iniciadores de síntese cuja sequência vai condicionar a especificidade do fragmento amplificado. No presente trabalho a transcrição reversa do mRNA foi feita usando o Kit SMART™ MMLV Reverse Transcriptase (CLONTECH) seguindo o protocolo do fabricante.

Resumidamente, para cada reação de síntese de cDNA de volume final 20 µL adicionou-se o volume adequado para 300 ng de RNAt, 1 µL de Random primers (0.5 µg /µL) e perpez-se o volume de 11.5 µL com água estéril livre de nucleases (Fermentas). Esta mistura foi incubada a 70°C durante 3 minutos, e imediatamente a seguir foi arrefecida em gelo. De seguida, adicionaram-se os seguintes reagentes: 4 µL de 5x Buffer, 2 µL de DTT (100 mM), 2 µL de dNTP's (10 mM) e 0.5 µL de MMLV RT. Seguiu-se uma incubação a 42°C durante 60 minutos. Por fim, as amostras foram incubadas a 70°C durante 15 minutos e guardou-se o cDNA a -20°C.

4. PCR convencional

A expressão das enzimas da esteroidogénese, nomeadamente a ST5ared, 17 β -HSD, CYP11B3 e CYP11A1, no CP de rato, foi analisada através da técnica de PCR convencional (RT-PCR). Para amplificar as sequências correspondentes aos mRNAs das enzimas em causa utilizou-se a Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e seguiu-se o recomendado no protocolo do fabricante. Por cada reação adicionou-se 2.5 μ L de 10x Buffer, 1.5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de dNTP's (10 mM), 0.2 μ L de Taq DNA polimerase, 0.3 μ L de primer Fw (25 μ mol) e de primer Rv (25 μ mol) respetivo a cada enzima e por fim perfez-se com água estéril (Fermentas) até um volume total de 24 μ L. A escolha dos oligonucleótidos iniciadores (primers) (Tabela 1) foi efetuada através do programa Primer-BLAST-NCBI-NIH. A cada reação foi-lhe adicionado 1 μ L de cDNA, à exceção do negativo, ao qual se adicionou água. A amplificação dos genes ocorreu num termociclador TProfessional Basic Gradient (Biometra). Primeiro, as amostras foram colocadas a 95°C durante 5 minutos, de seguida estas foram expostas a 40 ciclos onde estiveram a 95°C durante 30 segundos para a molécula de DNA desnaturar, depois à temperatura ótima de emparelhamento de cada primer durante 45 segundos para cada primer se poder ligar à molécula de DNA e a 72°C durante 30 segundos, para ocorrer a fase da amplificação propriamente dita, e por fim as amostras foram colocadas a 72°C durante 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% na presença de Brometo de Etídio. Após observação no transiluminador, os produtos de PCR foram enviados para a empresa Stab Vida para sequenciação confirmando, posteriormente, a identidade das amplificações.

Tabela 1 - Primers das enzimas da esteroidogénese.

Genes	Sequência de primers (5'-3')	Fragmento (pB)	Temperatura (°C)	Nº Gene Bank
Steroid-5- α -reductase, α polypeptide 2 (ST5ared)	Fw - ATTTGTGTGGCAGAGAGAGG Rv - TTGATTGACTGCCTGGATGG	192	59	NM_022711.4
Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 8 (17 β -HSD)	Fw - TTTTTCGCCCCCATCTGTCTG Rv - ACGACCGCCACTGGACACCA	167	59	NM_212529.1
Cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 3 (CYP11B3)	Fw - TGGCCTTCGGCTTTGGGGTG Rv - ACAGGCCGGATAGTGAGGACGA	184	59	NM_181824.1
Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1 (CYP11A1)	Fw - CAAAACACCACGCACTTCC Rv - TCAATTCTGAAGTTTTCCAGCA	125	54	NM_017286.2

5. PCR em tempo real

A quantificação da expressão dos genes das enzimas da esteroidogénese, nomeadamente da 17 β -HSD8 e da CYP11A1, foi efetuada por PCR em tempo real, utilizando o kit iQTM SYBR[®]Green Supermix (Bio-Rad), nos 4 grupos em estudo (fêmeas controlo e OVX e machos controlo e OOX). Para cada gene, uma série de diluições consistindo em 4 diluições seriadas foi usada durante a otimização do procedimento. A ciclofilina A foi utilizada como controlo endógeno para normalizar os níveis de expressão das enzimas esteroidogénicas. Todas as experiências de PCR em tempo real foram efetuadas em duplicado, com 3 a 4 amostras de cada grupo de animais e foi realizado utilizando o termociclador iCycler IqTM (Bio-Rad).

As reações de amplificação dos genes das enzimas da esteroidogénese e da ciclofilina A foram preparadas para um volume final de 20 μ L, para tal adicionou-se 10 μ L de Syber green (BIO-RAD), 0.8 μ L de Primer Fw e de Primer Rv com uma diluição de 1:20, 1 μ L de cDNA (1:3) e por fim perfez-se o volume final com água estéril (Fermentas). As amostras foram expostas às seguintes condições de amplificação: 95°C durante 3 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos. A formação de dímeros de primers e a pureza do produto amplificado foram avaliadas através da análise das curvas *melting* do PCR em tempo real. Os níveis relativos de expressão das enzimas em estudo nos diferentes grupos foram calculados pelo método $\Delta\Delta$ Ct.

6. Imunohistoquímica

A técnica de IHC baseia-se no uso de anticorpos específicos para uma dada proteína em secções de tecido. Assim, para detetar a presença da CYP17A, da 17 β -HSD8, da ST5ared e da CYP19A1, utilizaram-se cortes efetuados em tecido de CP de ratos de 2 meses \pm 2 semanas de idade e de porco, embebidos em parafina. Os cortes foram desparafinados em xileno 2 vezes 5 minutos e re-hidratados em etanol absoluto 2 vezes durante 3 minutos, etanol a 95% durante 3 minutos, etanol a 80% durante 3 minutos e por fim foram lavados em água. Posteriormente, as lâminas foram colocadas numa solução de citrato de 10 mM durante 20 minutos a uma temperatura constante de 90°C promovendo a recuperação antigénica. Após o arrefecimento das lâminas à temperatura ambiente, cada secção de tecido foi incubada com peróxido de oxigénio (H₂O₂), durante 15 minutos à temperatura ambiente, permitindo a inibição das peroxidases endógenas. De seguida, efetuaram-se 2 lavagens de 5 minutos com tampão de fosfato salina - tween (PBST) 0,1% com agitação suave. Com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas, os cortes foram incubados com albumina de soro bovino (BSA) 1% em PBS, durante 30 minutos à temperatura ambiente e depois foram novamente lavadas com PBST 0,1% com agitação suave. Posteriormente, as secções do CP foram incubadas com o respetivo anticorpo primário, anti-CYP17A (Santa Cruz Biothechnology), anti-

17B-HSD8 (Santa Cruz Biothecnology), anti-ST5ared (Santa Cruz Biothecnology) e anti-CYP19A1 (ab18995, Abcam® discover more) (diluição 1:100 em PBS com BSA 1%) overnight a 4°C em câmara húmida. Findo o tempo de incubação, efetuou-se a lavagem das lâminas com PBST 0,1% seguida da incubação com o anticorpo secundário biotilado anti-rabbit IgG (Sigma Life Science) diluído de 1:20 em PBS com BSA 1%, durante 1 hora à temperatura ambiente em câmara húmida. Posteriormente incubaram-se os cortes com o complexo estreptavina-biotina-peroxidase recorrendo a HRP streptavidin (0.5 mg/ml, Sigma Life Science) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de serem lavadas com PBST 1%, cada secção de CP foi incubada com a solução de diaminobenzidina (DAB 50X Dako REAL, Dako) até se verificar marcação. Após as lâminas estarem marcadas, estas foram colocadas em água para a reação ser interrompida. As lâminas foram coradas com hematoxilina durante 10 segundos e lavadas em água corrente. Seguiu-se a desidratação dos cortes por passagens sucessivas durante um minuto em etanol a 70% 2 vezes, etanol a 95%, etanol absoluto e em xileno. Por último as lâminas foram montadas com o meio de montagem (Entelan), observadas ao microscópio e fotografadas. Os controlos negativos foram todos efetuados por omissão de anticorpo primário. Considera-se marcação positiva quando as zonas alvo das células surgem bem coradas de castanho-escuro, devido à ação da peroxidase sobre o revelador, DAB, o qual forma polímeros quando oxidado na presença do substrato, o peróxido de hidrogénio.

7. Cultura primária de células epiteliais coroides

Os ratos recém-nascidos (3 a 5 dias) foram utilizados para a obtenção de CPEC. O primeiro passo deste procedimento foi recolher os CPs dos ventrículos laterais dos ratos, e posteriormente procedeu-se à digestão destes em PBS com 0.2 % de pronase durante 5 minutos a 37°C. Após a centrifugação das amostras a 12000 xg durante 2 minutos, extraiu-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), que possui 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina e estreptomina (P/S). Depois das células dissociadas e lavadas com DMEM, estas foram ressuscitadas em DMEM suplementado com fator de crescimento epidérmico (EGF), insulina e citosina arabinosine C. Posteriormente semeou-se as células em placas de 6 poços com cerca de 1.5 mL de DMEM suplementado em cada poço, com finalidade de serem posteriormente manuseadas.

8. Imunocitoquímica por fluorescência

Para a marcação por ICC das proteínas em causa, 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 PBST 0.1% e 20% de FBS. As células foram lavadas com PBST 0.1% e de seguida incubadas com o anticorpo primário respetivo anti-CYP17A, anti-17 β -HSD8, anti-ST5ared e anti-CYP19A1 (diluição de 1:50 em PBST com 1% de FBS), 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, realizou-se 6 lavagens com PBST a 0.1% e incubou-se as células com anticorpo secundário Alexa fluor 488 goat anti-rabbit (H+L, Molecular Probes) diluído de 1:1000 em PBST com 1% de FBS durante 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Após 3 lavagens com PBS, as células foram incubadas com o Hoescht 33342 dye do kit Image-iT™ Plasma Membrane and Nuclear Labeling kit (I34406) numa diluição de 1:1000 durante 10 minutos à temperatura ambiente. Depois das lavagens, procedeu-se à montagem das lamelas utilizando o meio de montagem Dako fluorescente mounting médium (Sigma). As imagens de fluorescência foram obtidas com um microscópio confocal e as imagens foram processadas no programa Zen 2011 (Zeiss).

9. Ensaios com androstenediona em culturas *ex vivo* de Plexo coroideu de rato

Para testar a bioatividade das hormonas esteroidegénicas realizaram-se ensaios com androstenediona tritiada tanto em CPEC como explantes de CP de rato. No ensaio funcional realizado em CPEC de rato, após a cultura foi adicionado 0.5 mL de DMEM com 10% de FBS e 1% de P/S, previamente aquecido a 37°C, e 1 μ L de androstenediona tritiada, como indicado na figura 8. Para o teste funcional em explantes de CP e ovário de rato de 2 meses \pm 2 semanas, estes tecidos foram lavados em PBS e posteriormente distribuídos numa caixa de cultura com 6 *wells* como indicado na figura 9. Em cada *well* foi adicionado 1mL de DMEM com 10% de FBS e 1% de P/S, previamente aquecido a 37°C, 2 CPs ou ovário (fragmento de 1mm³) e 1 μ L de androstenediona tritiada. Posteriormente, em ambos os teste funcionais, as amostras foram incubadas durante 2 ou 6 horas a 37°C com uma atmosfera de 5%CO₂/95%Ar numa incubadora (NUAIRE™ DHD AutoFlow CO₂ Air-Jacketed Incubator, Labocontrolo, Lisboa). Após o respetivo tempo de incubação procedeu-se à remoção do meio de cultura para um tubo de 1.5 mL, para posterior extração de hormonas esteroides e análise cromatográfica.

As hormonas esteroides presentes nos meios de culturas foram extraídas usando colunas SEPACK C18 (WATERS) e eluídos em etanol. As amostras em etanol foram evaporadas *overnight* a 37°C e posteriormente sujeitas a cromatografia de camada fina (TLC). Para tal, colocaram-se as amostras na respetiva lane da TLC, com 40 μ L de diclorometano. Adicionou-se mais 30 μ L de diclorometano em cada amostra. Depois, adicionou-se 10 μ L de uma solução de 0.5 mg/mL de padrões da testosterona e adiona. Posteriormente, colocou-se a placa numa

tina de cromatografia, previamente preparada numa proporção de 49:1 (clorofórmio:metanol). Procedeu-se à corrida em cromatografia de camada fina e posteriormente as hormonas sintetizadas foram reveladas através de luz UV. A placa de cromatografia foi revelada no scanner Bioscan (System 200 Imaging Scanner).

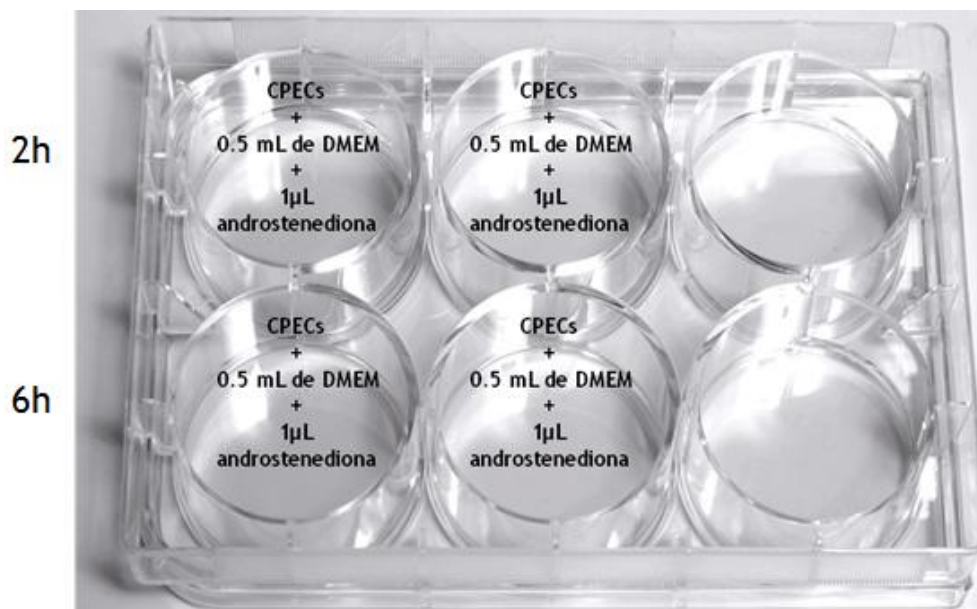


Figura 8 - Exemplo ilustrativo dos ensaios funcionais em culturas primárias de células epiteliais de rato com 2h e 6h de tempo de incubação.

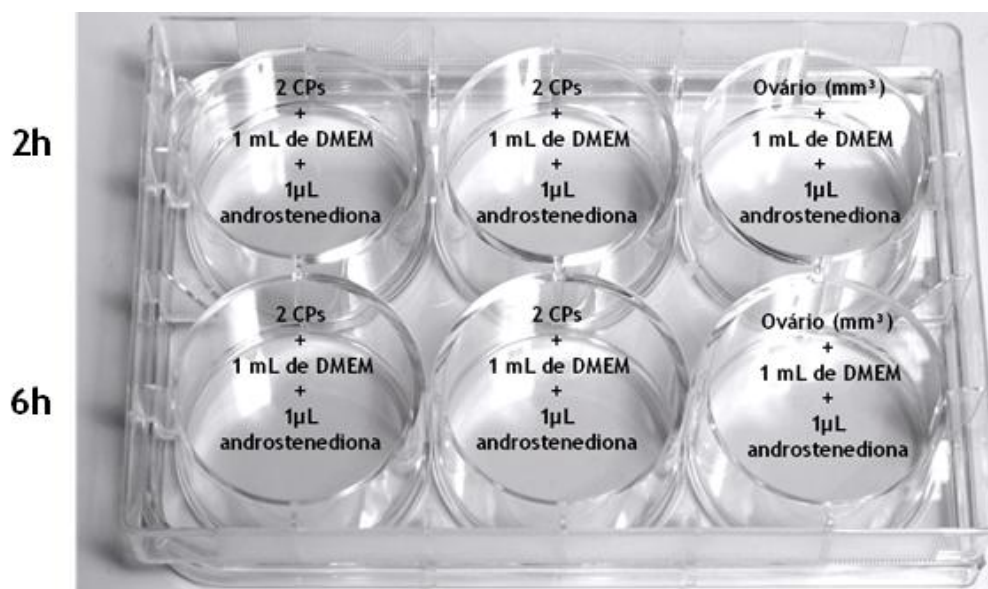


Figura 9 - Exemplo ilustrativo dos ensaios funcionais em explantes de CP e ovário de ratos de 3 meses com 2h e 6h de tempo de incubação.

III. Resultados

1. Níveis de expressão do mRNA das enzimas esteroidogénicas no Plexo Coroideu de rato

1.1.RT-PCR

As enzimas 17 β -HSD8, CYP11A1, ST5ared e CYP11B3 pertencem à via da esteroidogénese. A expressão do mRNA destas enzimas no CP de rato, foi detetada através da técnica de RT-PCR, que permitiu a amplificação específica das sequências de nucleótidos correspondentes aos genes em causa. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% na presença de Brometo de Etídio e observou-se que cada fragmento obtido tinha o tamanho esperado: fragmento da figura 10.a), que tem um tamanho de 167 pB, diz respeito ao gene da 17 β -HSD8; a banda presente na figura 10.b) tem um peso molecular de 125 pB e corresponde ao gene da CYP11A1; na figura 10.c), a banda possui 192 pB e equivale ao gene da enzima ST5ared; e a banda da figura 10.d) diz respeito ao gene da enzima CYP11B3 e apresenta um peso molecular de 184 pB. Assim, demonstrou-se a presença de mRNA destas enzimas esteroidogénicas no CP. Não se observou amplificação nos controlos negativos o que indica a ausência de contaminação.

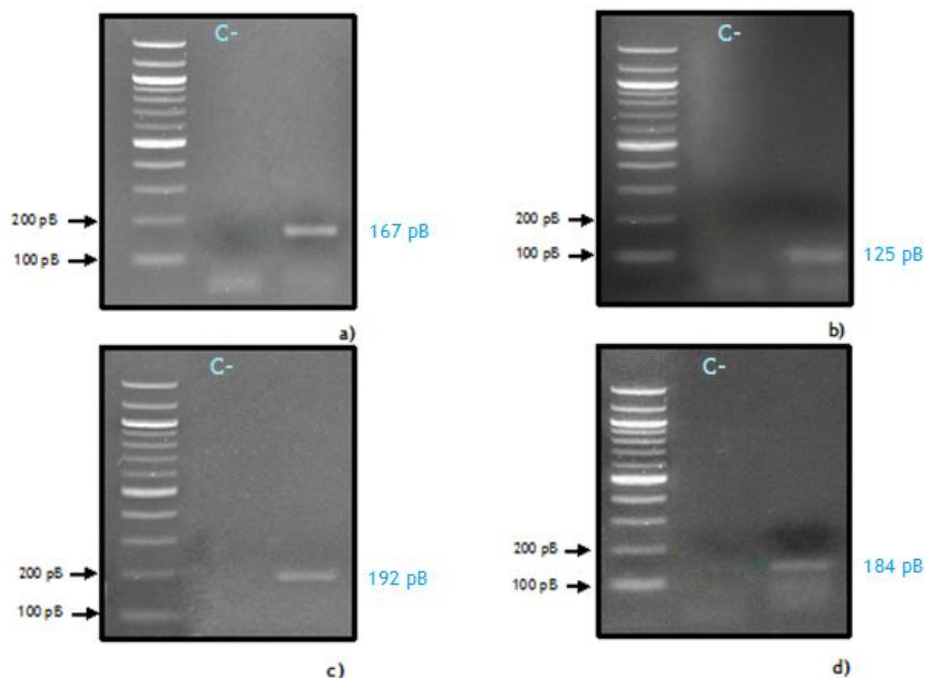


Figura 10 - Expressão de mRNA das enzimas da esteroidogénese. Em cada imagem está representado, da esquerda para a direita, o marcador, o negativo (C-) e o fragmento relativo a cada gene: na imagem 10.a) está ilustrado o fragmento do gene da 17 β -HSD8, que tem um peso molecular de 167 pB; a banda da figura 10.b) tem um peso molecular de 125 pB correspondendo ao gene da CYP11A1; o fragmento presente na imagem 10.c) possui 192 pB e pertence ao gene da ST5ared; e a banda da figura 10.d) diz respeito ao gene da enzima CYP11B3 e tem peso molecular de 184 pB.

Os produtos amplificados foram sequenciados, e posteriormente analisados no programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) confirmando, assim, a identidade das sequências correspondentes aos genes das enzimas em estudo. Mostrou-se por alinhamento das sequências clonadas com as sequências da base de dados que, a primeira sequência tem 100% de identidade com a sequência de nucleótidos da 17β-HSD8 (NM_212529.1) (Figura 11.a)); a segunda sequência tem 99% de homologia com o gene da CYP11A1 (NM_017286.2) (Figura 11.b)); a terceira sequência tem 97% de identidade com a sequência de nucleótidos da ST5ared (NM_022711.4) (Figura 11.c)); e por fim a última sequência tem 100% de correspondência com o gene da CYP1B3 (NM_181824.1) de *Rattus norvegicus* (Figura 11.d)).

17B-HSD8

Score = 220 bits (119), Expect = 3e-62
 Identities = 119/119 (100%), Gaps = 0/119 (0%)

```

Query 336 ATGAGTTTCTGCTCCACATGTCAGAAGAAGACTGGGACAGAGTCATAGCTGTGAACCTCA 395
          |||
Sbjct 1   ATGAGTTTCTGCTCCACATGTCAGAAGAAGACTGGGACAGAGTCATAGCTGTGAACCTCA 60

Query 396 AGGGCACCTTCCTAGTCACTCAGGCTGCCGCCAGGCATGGTGTCCAGTGGCGGTCGT 454
          |||
Sbjct 61  AGGGCACCTTCCTAGTCACTCAGGCTGCCGCCAGGCATGGTGTCCAGTGGCGGTCGT 119
  
```

a)

CYP11A1

Score = 126 bits (68), Expect = 7e-34
 Identities = 70/71 (99%), Gaps = 0/71 (0%)

```

Query 1379 TGGGCCGGCGGATTGCAGAGCTGGAAATGACCATCTTCCTCATCAACGTGCTGGAAAAC 1438
          |||
Sbjct 1   TGGGCCGGCGAATTGCAGAGCTGGAAATGACCATCTTCCTCATCAACGTGCTGGAAAAC 60

Query 1439 TCAGAATTGAA 1449
          |||
Sbjct 61  TCAGAATTGAA 71
  
```

b)

CYP11B3

Score = 215 bits (116), Expect = 2e-60
Identities = 116/116 (100%), Gaps = 0/116 (0%)

```
Query 1309 GCCTTCGGCTTTGGGGTGCGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGGTGTTG 1368
          |||
Sbjct 116 GCCTTCGGCTTTGGGGTGCGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGGTGTTG 57

Query 1369 CTCCTGCTTCACCATATGCTGAAAATCTTCCAAGTCGAGACACTGAGGCAAGAGGA 1424
          |||
Sbjct 56 CTCCTGCTTCACCATATGCTGAAAATCTTCCAAGTCGAGACACTGAGGCAAGAGGA 1
```

c)

ST5ared

Score = 237 bits (128), Expect = 9e-67
Identities = 140/145 (97%), Gaps = 4/145 (3%)

```
Query 1452 AGGGGAGCATCAGGAGAAATGTAGGAGAGAAGGGGAGGAGGATTGGCAAAAATAAAGCAT 1511
          |||
Sbjct 9 AGGGGA-CATCAGGAG-AATGTAGGAGAG-AGGGGAGGAGGA-TGGCAAAAATAAAGCAT 64

Query 1512 GTATGAAAATGTCCATAATGAAACCAAT TACTT TATATGTTGGTTTTAAAAACAACCAG 1571
          |||
Sbjct 65 GTATGAAAATGTCCATAATGAAACCAAT TACTT TGTATGTTGGTTTTAAAAACAACCAG 124

Query 1572 CCAGCCAGTCAATAAACCATCCATC 1596
          |||
Sbjct 125 CCAGCCAGTCAATAAACCATCCATC 149
```

d)

Figura 11 - Sequências dos fragmentos amplificados por PCR. Alinhamento dos resultados da sequenciação dos produtos de PCR através do programa NCBI-BLAST, onde a primeira sequência tem 100% de homologia com o 17 β -HSD8 (NM_212529.1); a segunda sequência possui 99% de identidade com o CYP11A1 (NM_017286.2); a terceira sequência tem 97% de homologia com ST5ared (NM_022711.4); e a quarta sequência possui 100% de identidade com o CYP11B3 (NM_181824.1) de *Rattus norvegicus*.

1.2. PCR em Tempo Real

A análise das diferenças dos níveis de expressão do mRNA das enzimas 17 β -HSD8 e CYP11A1 nos 4 grupos de ratos em estudo (fêmeas controlo, fêmeas OVX, machos controlo e machos OOX) foram realizadas através da técnica de PCR em tempo real. A ciclofilina A foi utilizada como controlo endógeno para normalizar os níveis de expressão das enzimas esteroidogénicas. Cada barra do gráfico representa o rácio entre a expressão da enzima em causa e a ciclofilina A para cada grupo. Verificou-se que, nas fêmeas, o nível de mRNA da enzima 17 β -HSD8 diminuiu 1.47 vezes no grupo OVX relativamente ao grupo controlo, sendo

esta diminuição não significativa a nível estatístico (Figura 12); no entanto, nos machos, verificou-se um aumento de 1.83 da expressão desta enzima no grupo tratado relativamente ao grupo controlo, sendo este resultado significativo estatisticamente ($p < 0.05$) (Figura 12).

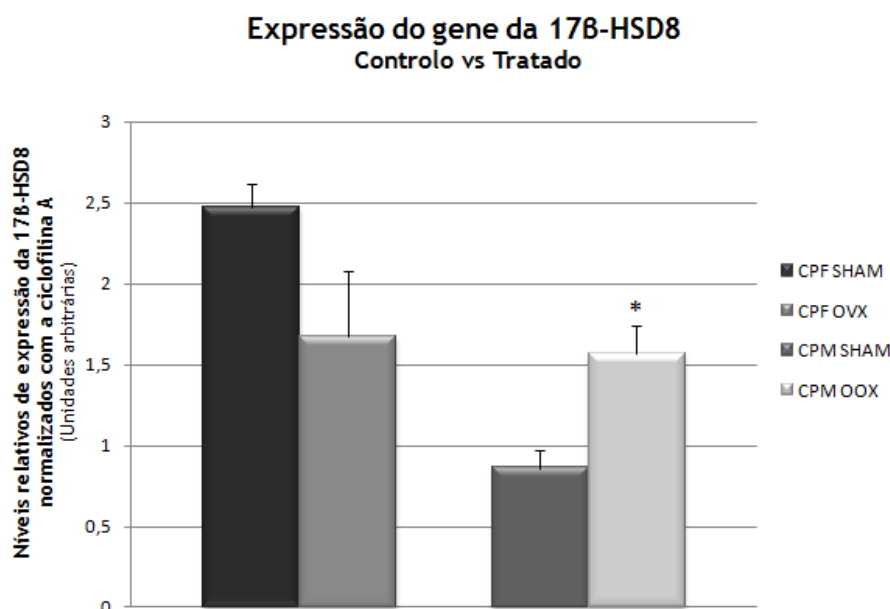


Figura 12 - Alterações dos níveis de expressão do mRNA da 17 β -HSD8. Em relação às fêmeas, a expressão da enzima 17 β -HSD8 decresce 1.47 vezes no grupo OVX relativamente ao grupo controlo, sendo esta diminuição não significativa a nível estatístico; no entanto, nos machos, verificou-se um acréscimo de 1.83 da expressão desta enzima no grupo tratado relativamente ao grupo controlo, sendo esta diferença significativa ($p < 0.05$).

Em relação aos níveis de CYP11A1 a tendência mantém-se. Nas fêmeas, a expressão do mRNA desta enzima também decresce 1.5 vezes no grupo tratado comparativamente ao grupo controlo, já nos machos, o grupo tratado tem uma expressão de mRNA de CYP11A1 1.47 vezes superior relativamente ao controlo, não existindo diferenças de expressão significativas (Figura 13). O significado estatístico das diferenças de expressão das enzimas esteroidogénicas entre os grupos experimentais foi avaliada pelo teste T-Student, sendo o resultado considerado significativo para $p < 0.05$.

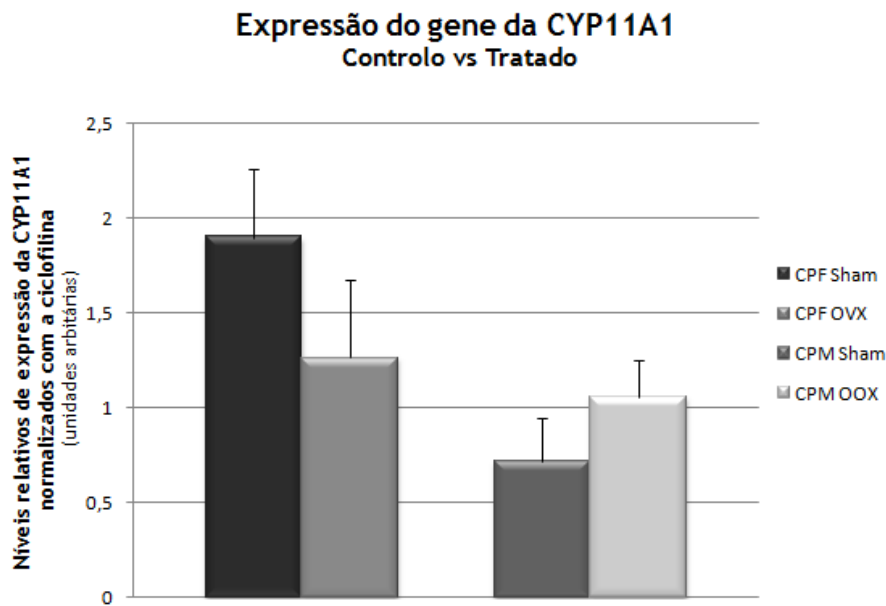


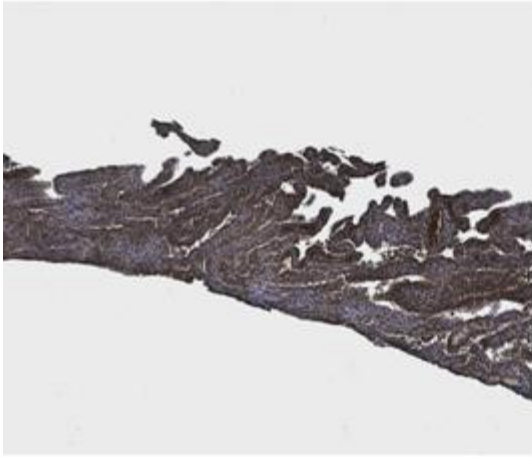
Figura 13 - Alterações dos níveis de expressão do mRNA da CYP11A1. Em relação às fêmeas, a expressão da enzima CYP11A1 decresce 1.5 vezes no grupo OVX relativamente ao grupo controlo. No entanto, nos machos, o grupo tratado tem uma expressão de mRNA de CYP11A1 1.47 vezes superior relativamente ao controlo, não sendo esta diferença significativa.

2. Localização das enzimas esteroideogénica no Plexo Coroideu de rato e porco

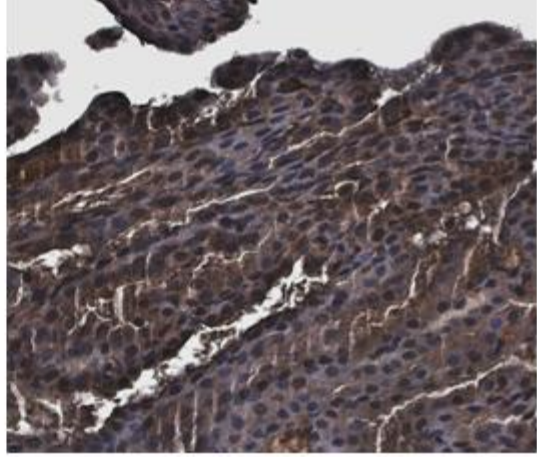
2.1. Imunohistoquímica

A técnica de IHC permitiu identificar a presença das proteínas CYP17A, da 17 β -HSD8, da ST5ared e da CYP19A1 no CP de rato e porco. As secções incubadas com os respetivos anticorpos primários apresentam uma coloração castanha proveniente do substrato DAB, indicando a localização destas proteínas nas células epiteliais do CP.

As enzimas esteroideogénicas, CYP17A1 (figura 14.a) e 14.b)), ST5ared (figura 14.c) e 14.d)), 17 β -HSD (figura 14.e) e 14.f)) e CYP19A1 (figura 14.g) e 14.h)) foram identificadas no citoplasma e em alguns núcleos das células epiteliais de CP de rato. Na secção onde se omitiu o anticorpo primário, controlo negativo (figura 14.i) e 14.j)), não se verificou qualquer marcação.



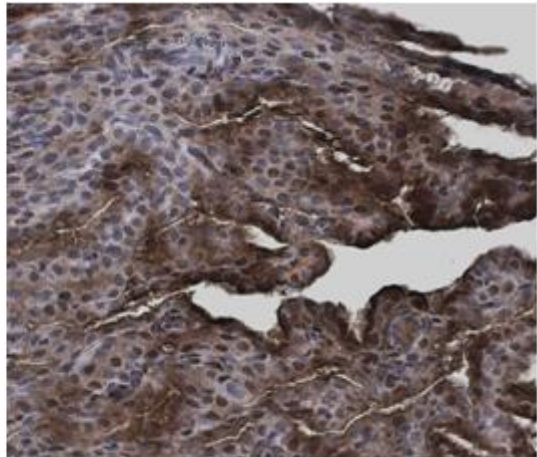
a)



b)



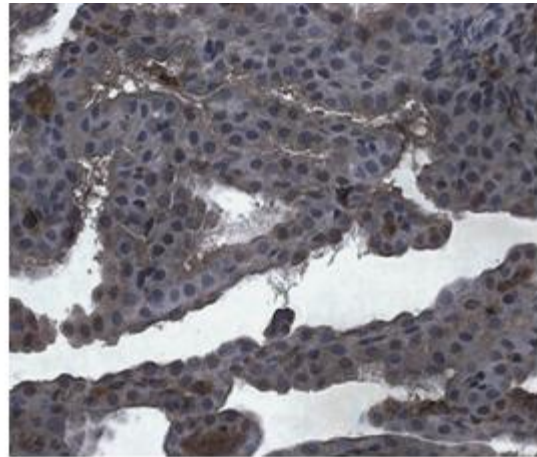
c)



d)



e)



f)

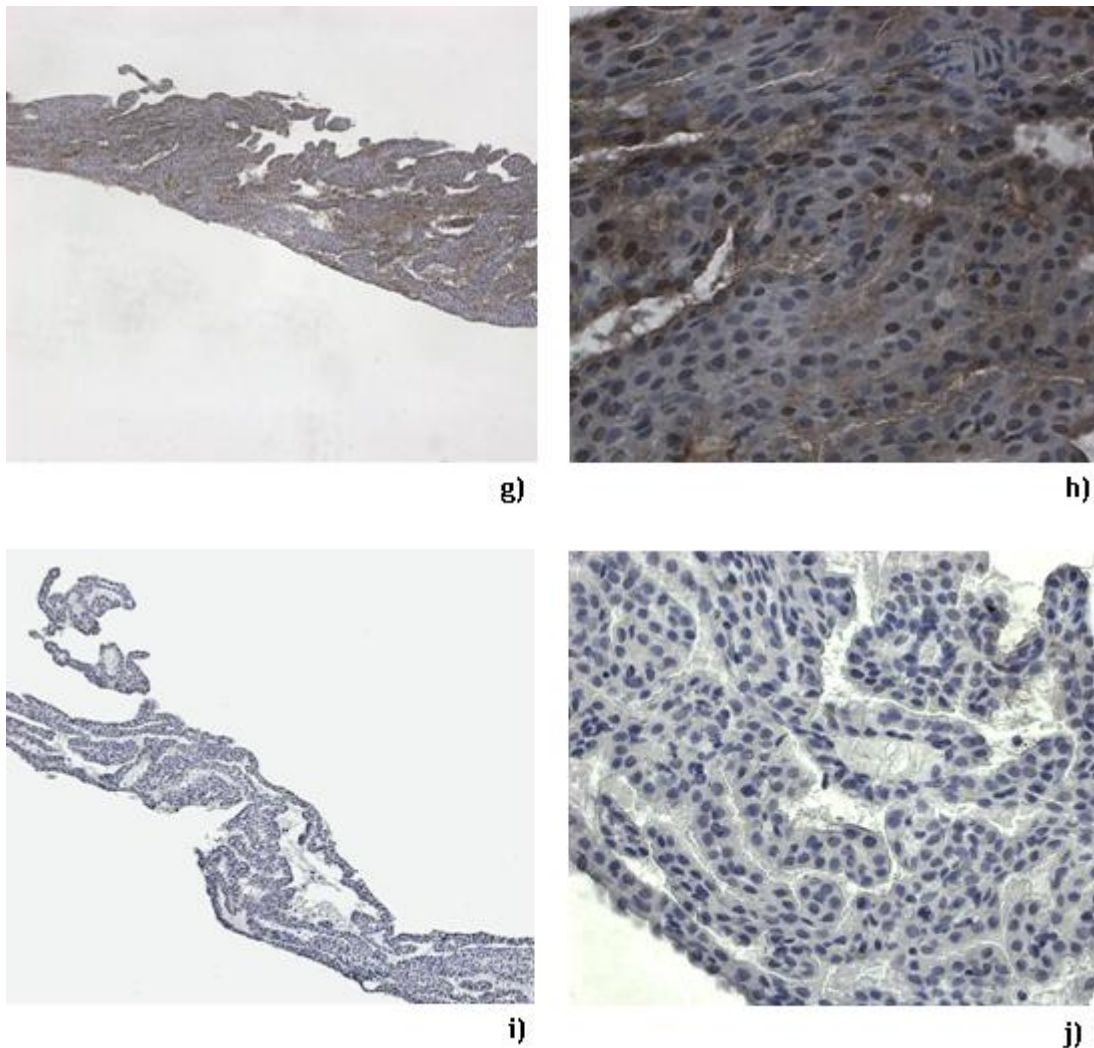
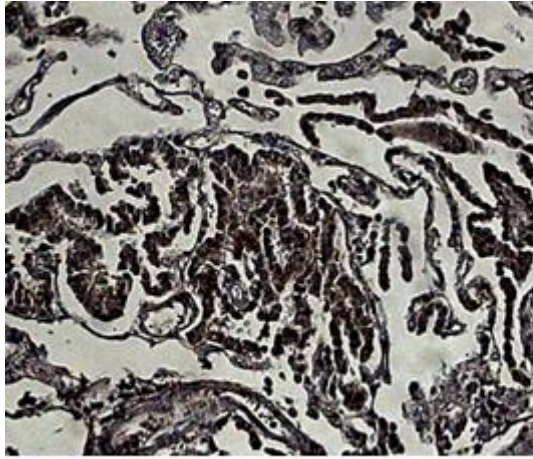
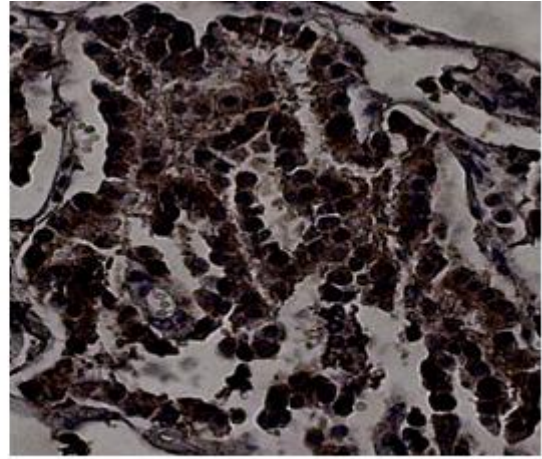


Figura 14 - Localização das enzimas esteroidogénicas no Plexo Coroideu de rato por imunohistoquímica. As imagens representam IHC de secções de CP de rato incubadas com os respetivos anticorpos primários, à exceção do controlo negativo onde se omitiu essa incubação, e posteriormente coloradas com diaminobenzidina (DAB). As figuras 14.a) e .b) dizem respeito à presença da enzima CYP17A1 nas células epiteliais do CP através da marcação com anticorpo primário anti-CYP17A1; Nas figuras 14.c) e .d) foi detetada a presença da proteína da ST5ared por incubação com o anticorpo primário anti-ST5ared; Nas figuras 14.e) e .f) foi observada a presença da proteína da CYP19A1 através da marcação com o anticorpo primário anti-CYP19A1; Nas figuras 14.g) e .h) a proteína da 17β- HSD8 foi identificada por marcação com anticorpo primário anti-17β- HSD8. Nas figuras 14.i) e .j) foi observada a ausência de marcação. As figuras 14 .a), .c), .e), .g) e .i) foram obtidas numa ampliação original de 10x, já as figuras 14.b), .d), .f), .h) e .j) foram obtidas numa ampliação original de 40x.

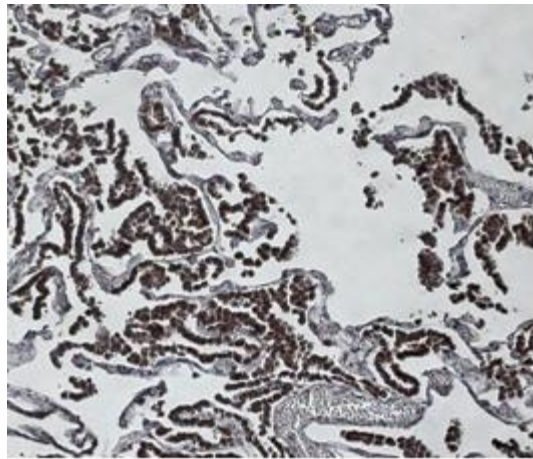
Confirmou-se, também, a presença das enzimas da esteroidogénese no CP de porco adulto. As enzimas esteroidogénicas CYP17A1 (figura 15.a) e 15.b)), ST5ared (figura 15.c) e 15.d)), 17B-HSD8 (figura 15.e) e 15.f)) e CYP19A1 (figura 15.g) e 15.h)) foram detetadas através da marcação acastanhada no citoplasma e em alguns núcleos das células epiteliais de CP de porco. No controlo negativo não se verificou qualquer marcação, visto que se omitiu a incubação do tecido com anticorpo primário.



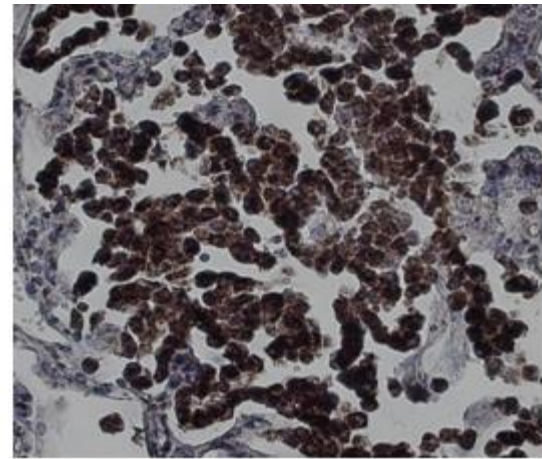
a)



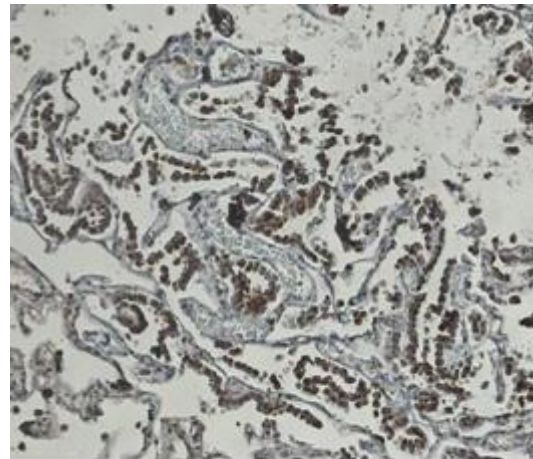
b)



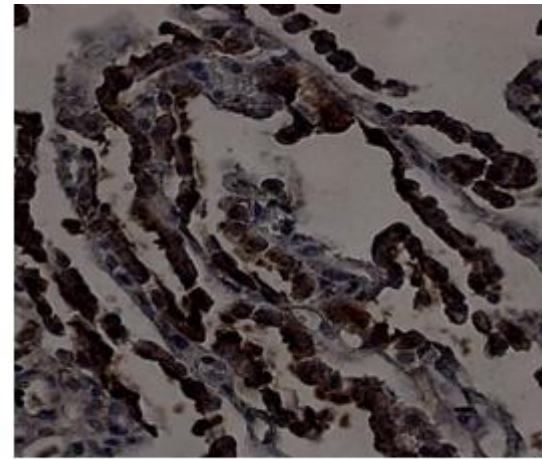
c)



d)



e)



f)

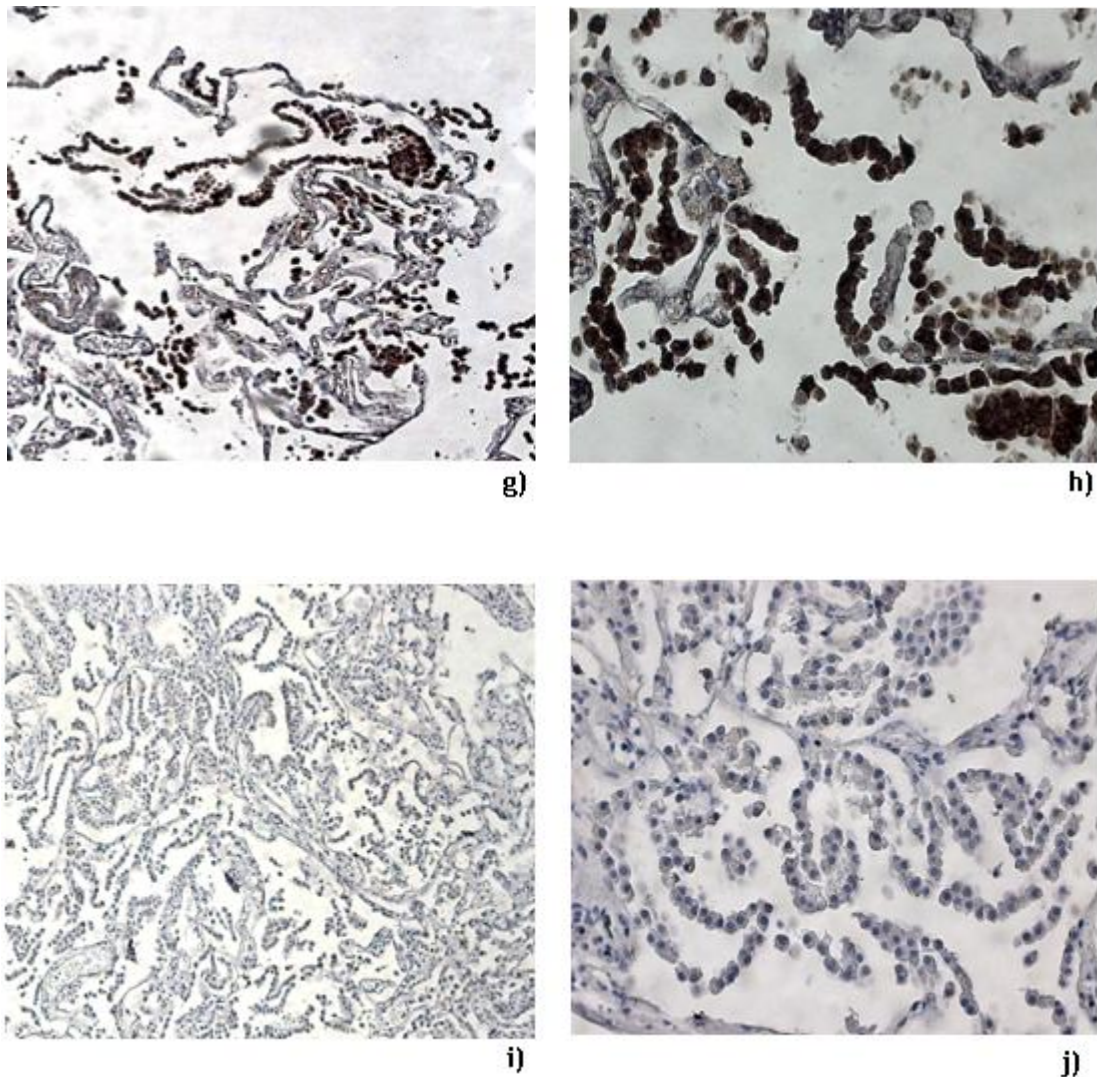
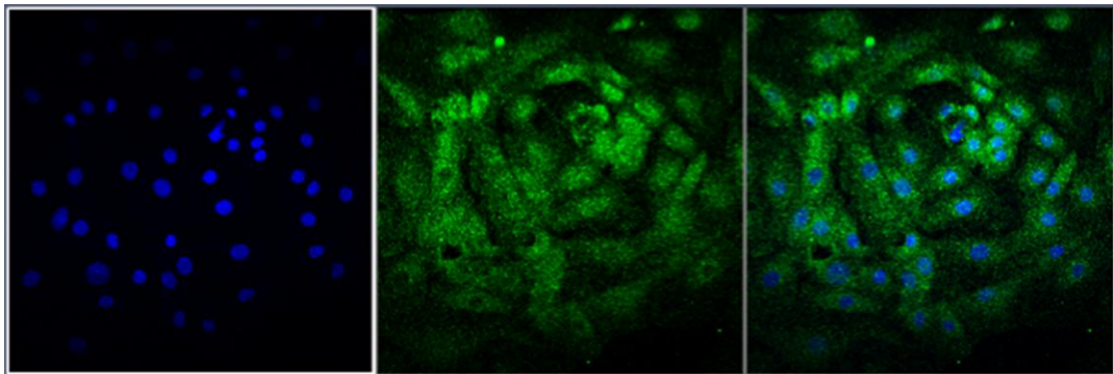


Figura 15 - Localização das enzimas esteroidogénicas no Plexo coroideu de porco por imunohistoquímica. As imagens representam IHC de secções de CP de porco incubadas com os respetivos anticorpos primários, à exceção do controlo negativo onde se omitiu essa incubação, e posteriormente coloradas com diaminobenzidina (DAB). As figuras 15.a) e .b) dizem respeito à presença da enzima CYP17A1 nas células epiteliais do CP de porco através da marcação com anticorpo primário anti-CYP17A1; Nas figuras 15.c) e .d) foi detetada a presença da proteína da ST5ared por incubação com o anticorpo primário anti-ST5ared; Nas figuras 15.e) e .f) foi observada a presença da proteína da CYP19A1 através da marcação com o anticorpo primário anti-CYP19A1; Nas figuras 15.g) e .h) a proteína da 17β -HSD8 foi identificada por marcação com anticorpo primário anti- 17β -HSD8. Nas figuras 15.i) e .j) foi observada a ausência de marcação. As figuras 15 .a), .c), .e), .g) e .i) foram obtidas numa ampliação original de 10x, já as figuras 15.b), .d), .f), .h) e .j) foram obtidas numa ampliação original de 40x.

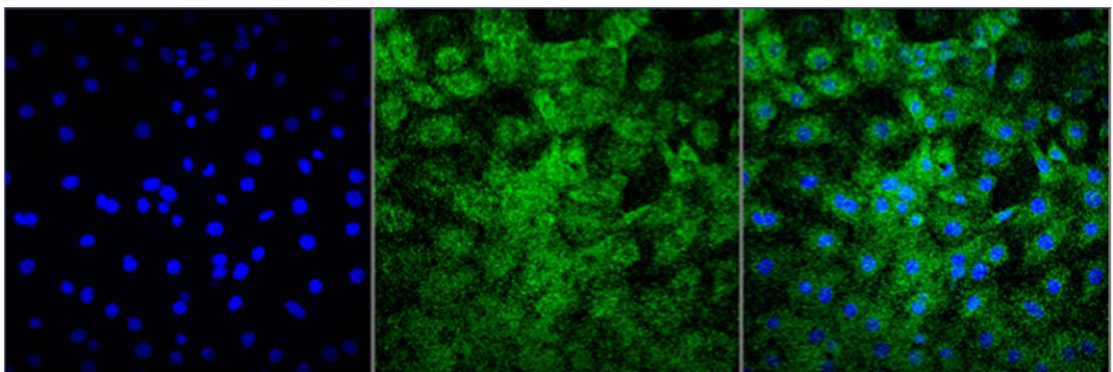
2.1. Imunocitoquímica por fluorescência

A técnica de ICC por fluorescência permitiu a deteção das enzimas esteroidogénicas em CPEC de rato. Nas figuras 16.a) a 16.d) verificou-se a marcação de núcleos (cor azul) e a marcação da enzima esteroidogénica em causa (cor verde). As células incubadas com os respetivos

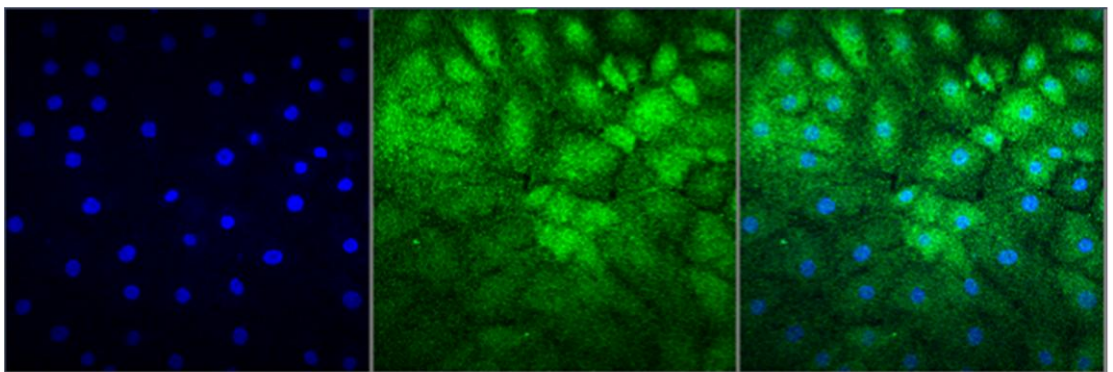
anticorpos primários apresentam marcação, indicando a localização destas proteínas nas CPEC. As enzimas CYP17A1 (figura 16.a)), ST5ared (figura 16.b)), 17 β -HSD8 (figura 16.c)) e CYP19A1 (figura 16.d)) foram detetadas no citoplasma, de forma evidente, e em alguns núcleos das CPEC. A figura 16.e) representa o controlo negativo, onde se omitiu a incubação com o anticorpo primário e com o anticorpo secundário, já a figura 16.f) representa um segundo controlo negativo onde apenas se omitiu a incubação com o anticorpo primário. Em ambas as imagens não se verificou qualquer marcação.



a)



b)



c)

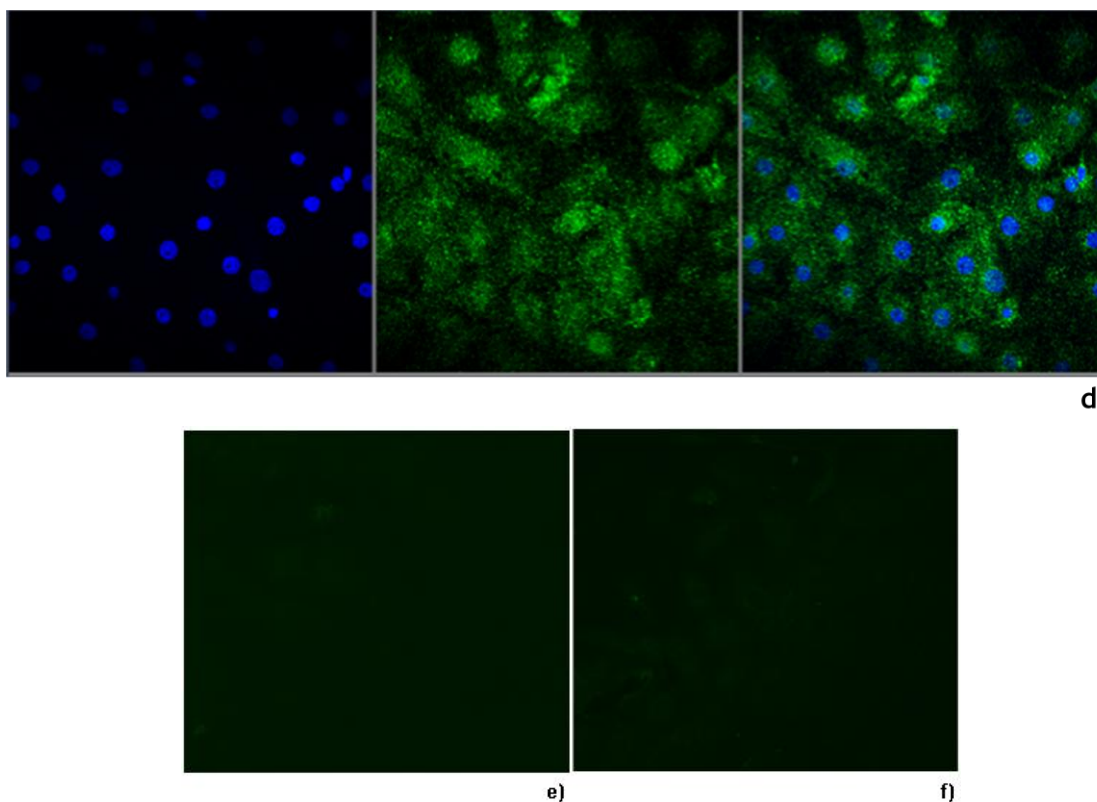


Figura 16 - Localização das enzimas esteroidogénicas na CPEC de rato por imunocitoquímica. As imagens representam células epiteliais de CP de rato incubadas com os respetivos anticorpos primários, à exceção dos controlos negativos onde se omitiu essa incubação. A figura 16.a) diz respeito à presença da enzima CYP17A1 nas células epiteliais do CP através da marcação com anticorpo primário anti-CYP17A1; Na figura 16.b) foi detetada a presença da proteína da ST5ared por incubação com o anticorpo primário anti-ST5ared; Na figura 16.c) foi observada a presença da proteína da CYP19A1 através da marcação com o anticorpo primário anti-CYP19A1; Já na figura 16.d) a proteína da 17 β -HSD8 foi identificada por marcação com anticorpo primário anti-17 β -HSD8. A figura 16.e) é o controlo, onde se omitiu a incubação com qualquer anticorpo, tanto primário como secundário. A figura 16.f) também é um controlo negativo apenas com omissão do anticorpo primário. Os controlos negativos não apresentam qualquer marcação.

3. Avaliação da atividade funcional das enzimas esteroidogénicas

A realização de ensaios *ex vivo* em CPEC e explantes de CPs de rato com androstenediona tritiada permitiu analisar a atividade funcional das enzimas esteroidogénicas. A deteção e monitorização da conversão do precursor em causa em hormonas esteroides foi detetada por TLC.

Nos ensaios funcionais em CPEC, verificou-se que, nas células incubadas com androstenediona durante 2 horas, o cromatograma apresentou um pico muito pouco evidente aos 94.8 mm (Figura 17). As CPEC sujeitas a um tempo de incubação de 6 horas apresentaram um pico um pouco mais saliente aos 91.6 mm (Figura 18). Em relação ao ensaio funcional em

explantos de CP de ratos a tendência mantêm-se. Os CPs que foram incubados com o precursor em estudo durante 2 horas exibiram um pico pouco expressivo por volta dos 90 mm (Figura 19), no entanto nos CPs que tiveram sujeitos a um tempo de incubação de 6 horas verificou-se que o cromatograma apresentara um pico bastante mais evidente aos 92.7 mm (Figura 20). Estes resultados estão concordantes com a amostra utilizada como controle positivo. A amostra de ovário incubada com a androstenediona durante 2 horas apresenta um pico aos 89.5 mm (Figura 21). O pico da amostra de ovário, observado no cromatograma, com tempo de incubação de 6 horas surgiu aos 93.7 mm (Figura 22), sendo notoriamente mais elevado do que o pico às 2 horas de incubação.

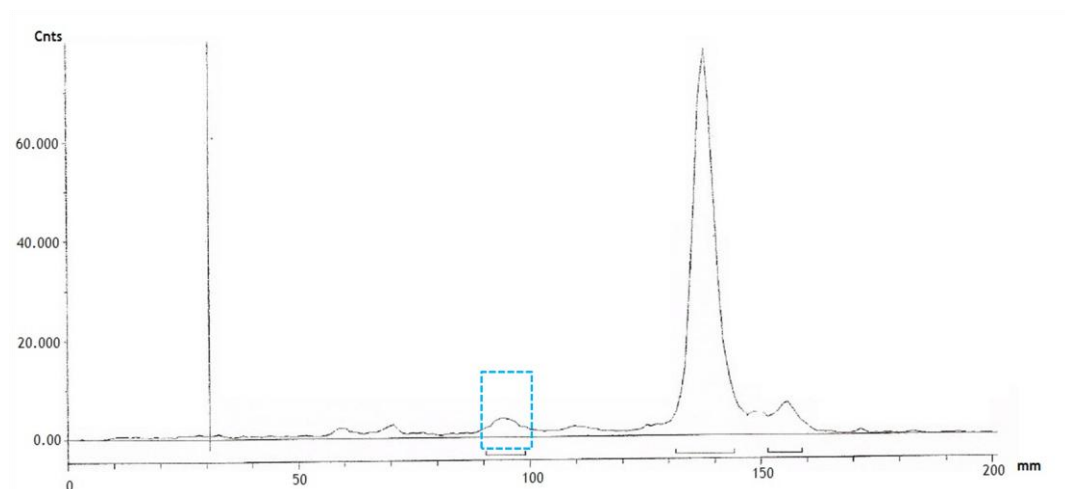


Figura 17 - Cromatograma correspondente à incubação das CPEC durante 2 horas com androstenediona tritiada. Observou-se um pico aos 94.8 mm, entre a gama do padrão da testosterona (92-97 mm).

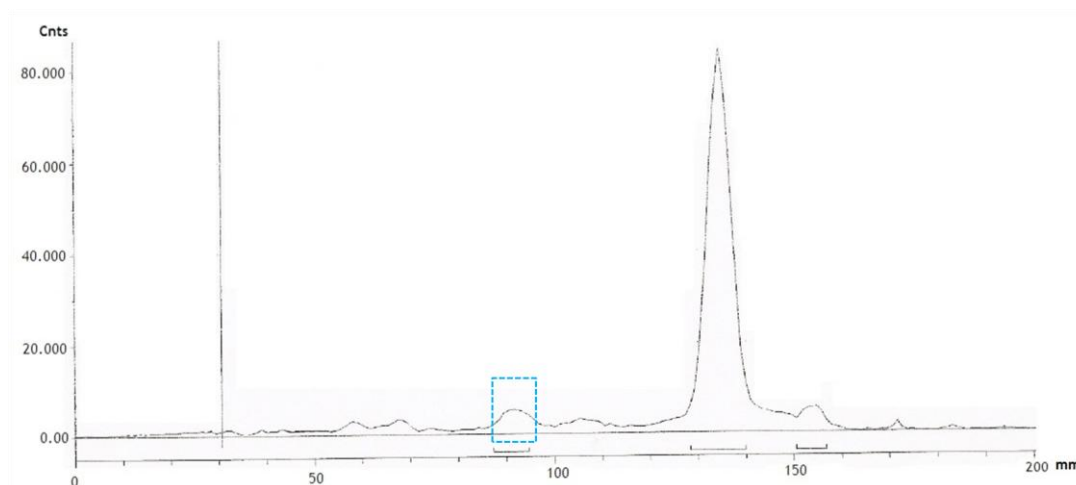


Figura 18 - Cromatograma correspondente à incubação das CPEC durante 6 horas com androstenediona tritiada. Observou-se um pico aos 91.6 mm, entre a gama do padrão da testosterona (89-95 mm).

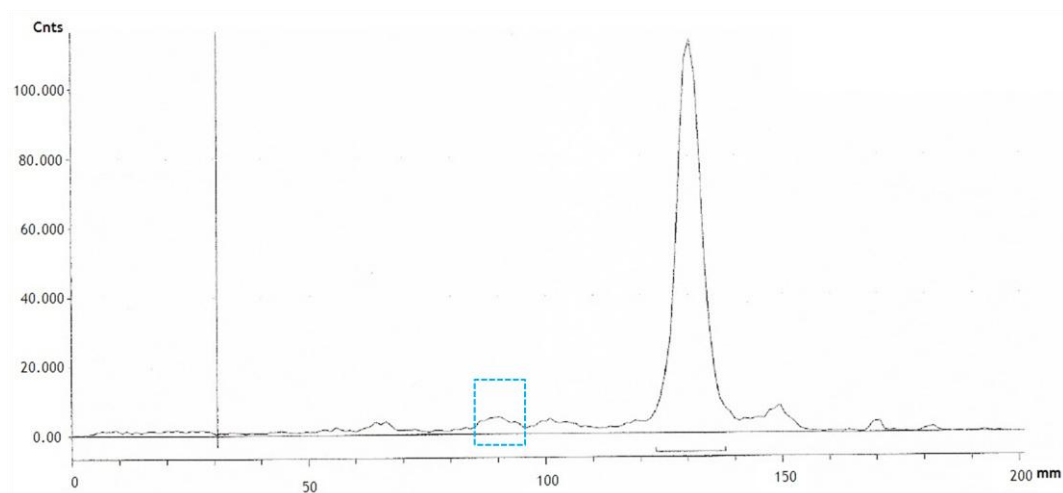


Figura 19 - Cromatograma correspondente à incubação dos CPs durante 2 horas com androstenediona tritiada. Observou-se um pico bastante reduzido perto dos 90 mm, localizado na gama do padrão da testosterona 88-93 mm).

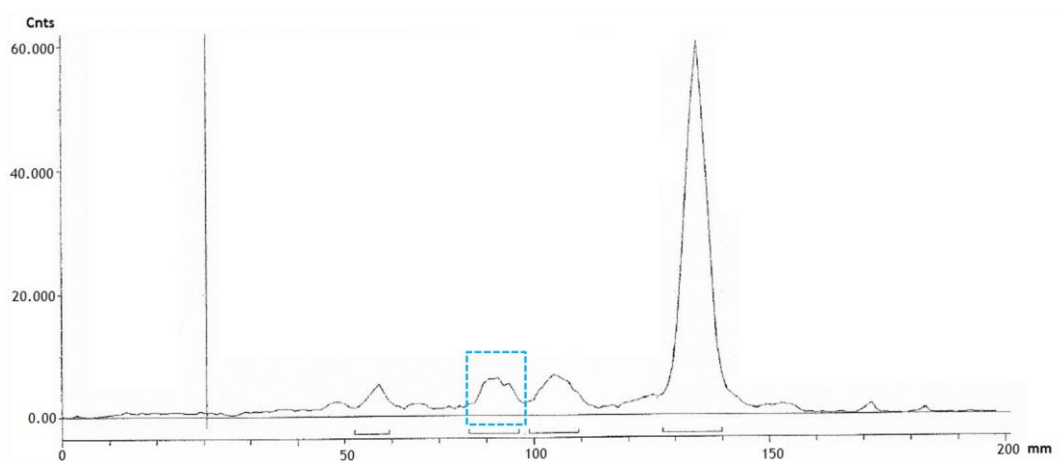


Figura 20 - Cromatograma correspondente à incubação dos CPs durante 6 horas com androstenediona tritiada. Observou-se um pico aos 92.7 mm, localizado na gama do padrão da testosterona (88-93 mm).

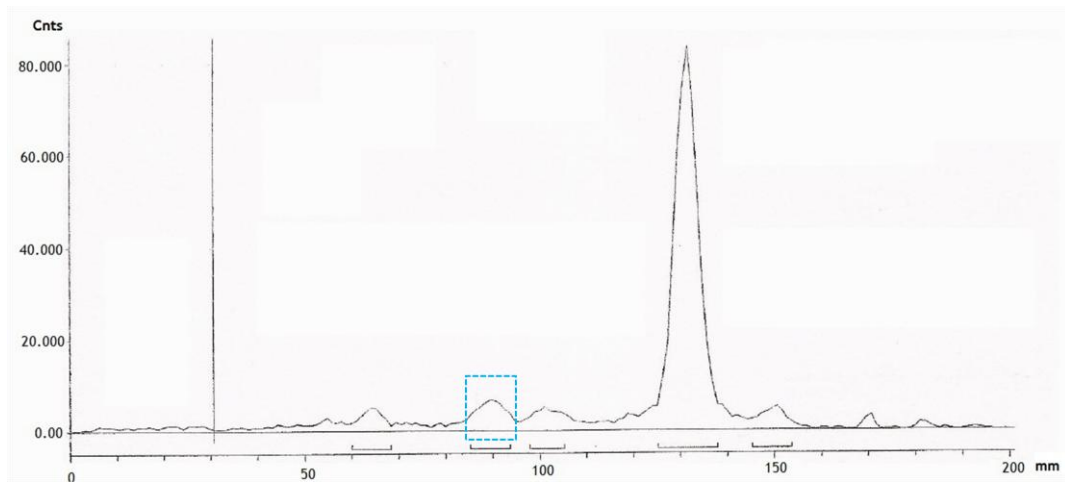


Figura 21 - Cromatograma correspondente à incubação de uma porção de ovário durante 2 horas com androstenediona tritiada. Observou-se um pico aos 89.5mm, entre a gama do padrão da testosterona (89-94 mm).

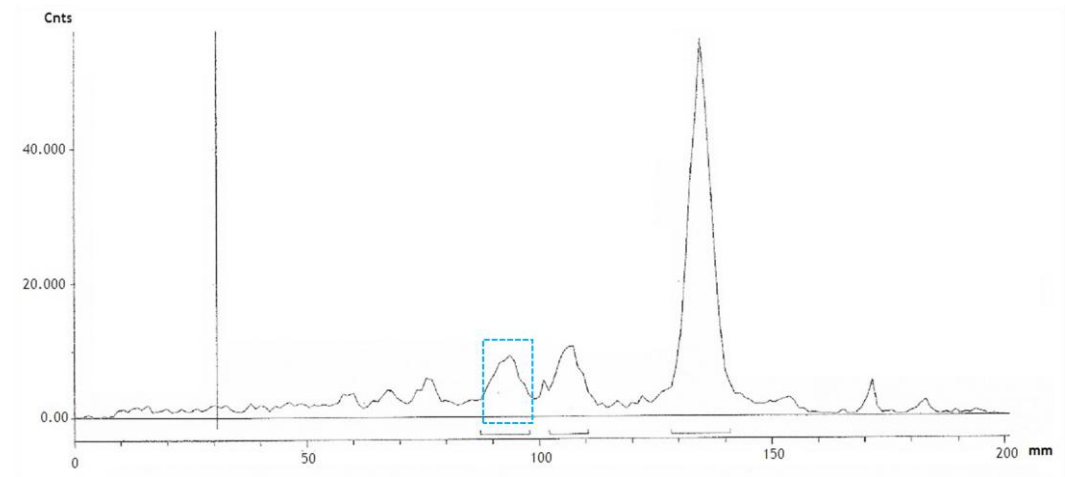


Figura 22 - Cromatograma correspondente à incubação de uma porção de ovário durante 6 horas com androstenediona tritiada. Observou-se um pico aos 93.7 mm, entre a gama do padrão da testosterona (89-94 mm)

IV. Discussão

Um estudo de microarrays de cDNA de CP de rato, efetuado no nosso grupo de investigação, mostrou a presença de enzimas esteroidogénicas, entre as quais a CYP11A1, CYP11B3, 17 β -HSD, ST5ared, CYP17A1 e CYP19A1 neste tecido. Face a este resultado, formulou-se a hipótese de que o CP seria um local de síntese de hormonas esteroides. Muitos estudos têm demonstrado a expressão das várias enzimas esteroidogénicas assim como a sua atividade na produção de esteroides numa variedade de tecidos, tais como a glândula adrenal, gónadas e mais recentemente no músculo, pele e SN (Thiboutot *et al.* 2003; Sanderson 2006; Aizawa *et al.* 2007; Ghayee and Auchus 2007; Miller and Auchus 2011). A expressão de mRNA e/ou proteína das enzimas em estudo já foi, também, identificada em algumas regiões do SN, sobretudo no córtex, hipocampo, cerebelo, hipotálamo, tálamo e gânglio basal. Portanto, de modo a confirmar se o CP é ou não uma fonte extragonadal de hormonas esteroides analisaram-se os níveis de expressão de mRNA das enzimas já referidas no CP de rato (Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002).

Esta análise confirmou a expressão do mRNA de enzimas da esteroidogénese, nomeadamente o CYP11A1, CYP11B3, 17 β -HSD e ST5ared, em CP de rato por RT-PCR e PCR em tempo real. Para além disso, as proteínas correspondentes aos transcritos da 17 β -HSD, ST5ared, CYP17A1 e CYP19A1 foram também detetadas por IHC e ICC. Os resultados de ambas as técnicas demonstraram a presença destas proteínas no citoplasma e em alguns núcleos das células epiteliais de CP de rato e porco.

Cada uma destas enzimas tem um papel essencial na via da esteroidogénese. As enzimas correspondentes aos genes CYP11A1, CYP11B3, CYP17A1 e CYP19A1 pertencem à família das enzimas do citocromo P450, sendo todas elas enzimas oxidativas que possuem um grupo heme. O gene CYP11A1 codifica a enzima P450_{sc} que catalisa o primeiro passo da esteroidogénese, conversão do colesterol em pregnenolona. O gene CYP11B3 codifica uma enzima da subfamília P450_{c11}. Esta pode catalisar a produção de corticosterona e 18-OH-corticosterona a partir da DOC e da 18-hidroxideoxicorticosterona, respetivamente, pois apresenta atividade 11 β -hidroxilase e 18-hidroxilase. Enzimas pertencentes a esta família são bastante importantes na síntese de glucocorticoides e mineralocorticoides. O gene CYP17A1 codifica a enzima P450₁₇, que tem dupla atividade, 17 α -hidroxilase e 17, 20-liase. Assim, esta enzima catalisa a 17 α -hidroxilação da pregnenolona e da progesterona dando origem à 17 α -hidroxipregnenolona e à 17 α -hidroxiprogestero, que são submetidas à cisão entre o C17- C20, formando a DHEA e a androstenediona, respetivamente. O gene CYP19A1 codifica a P450_{aro}, esta permite a aromatização de esteroides androgénicos a partir de esteroides androgénicos. Portanto, esta enzima pode converter a testosterona em estradiol e a androstenediona em estrona. A ST5ared e 17 β -HSD pertencem à família das HSDs, que não possuem grupo heme. A subfamília 17 β -HSD tem várias isoformas, permitindo catalisar várias reações reversíveis, tais como a conversão da DHEA em androstenediol, da androstenediona em testosterona e da estrona em estradiol. O gene ST5ared codifica a 5 α -redutase, esta

permite a conversão de testosterona em DHT. Se esta enzima estiver no SN pode também catalisar a conversão da progesterona em 5 α -dihidroprogesterona e da DOC em DihidroDOC.

As enzimas envolvidas na esteroidogénese podem, também, agrupar-se quanto à sua localização, uma vez que se podem encontrar em alguns organelos citoplasmáticos, tais como a mitocôndria e retículo endoplasmático (Mellon and Griffin 2002). As enzimas provenientes dos genes CYP11A1, CYP11B3 e 17 β -HSD estão localizadas na mitocôndria. Enquanto que, as enzimas P450c17, P450 aro e 5 α -redutase estão presentes no retículo endoplasmático (Compagnone and Mellon 2000; Mellon and Griffin 2002). Portanto, uma vez que neste trabalho se verificou que as enzimas 17 β -HSD, P450c17, P450 aro e 5 α -redutase estão presentes no citoplasma, podemos afirmar que estes resultados vão de encontro ao descrito anteriormente. A localização destas enzimas em alguns núcleos, leva-nos a pensar que de algum modo as enzimas esteroidogénicas produzidas no citoplasma atravessam a membrana nuclear atingindo assim o núcleo.

Depois de detetar a presença e a localização das enzimas em causa, tornou-se importante verificar se estas estão ativas e desempenham a sua função. Para tal, realizaram-se testes *ex vivo* em CPEC e explantes de CP de rato com androstenediona tritiada, seguida de uma monitorização da conversão deste precursor por TLC. Os resultados desta experiência evidenciam que uma pequena quantidade de androstenediona é convertida noutra hormona esteroide. Nos ensaios em CPEC verificou-se um pico relativamente mais reduzido em comparação com o obtido nos ensaios em CP de rato. Uma hipótese que suporta estes resultados é o facto de nos explantes de CP existir uma maior quantidade de células em relação às CPEC. Para além disso, verificou-se que as amostras sujeitas a um maior tempo de incubação (6 horas), apresentaram um pico mais acentuado. Isto indica que quanto maior o tempo de incubação com androstenediona, maior a taxa de conversão deste precursor. Com base nos cromatogramas obtidos por TLC, observou-se que todos apresentam um pico na gama correspondente ao padrão da testosterona. Logo podemos supor que parte do precursor foi convertido em testosterona durante o tempo de incubação. Isto, leva-nos a pressupor que, no CP, a enzima 17 β -HSD, que catalisa a reação em causa, está metabolicamente ativa. Os resultados obtidos ao longo deste trabalho revelaram-se bastante importantes e inovadores na medida em que fornecem evidências de que o CP possa ser um local de síntese de neuroesteroides.

As hormonas esteroides produzidas na glândula adrenal e gónadas são essenciais para muitas vias metabólicas e inclusivamente para a homeostasia do SNC (Miller and Auchus 2011). Os esteroides desempenham um papel importante em várias funções biológicas do SN, desde a embriogénese até a fase adulta. Ao longo deste período observam-se alterações na neuroesteroidogénese e conseqüentemente nos níveis de neuroesteroides (Mellon and Griffin 2002). Estes esteroides permitem a proteção dos neurónios a agentes tóxicos e pró-apoptóticos, possibilitando por sua vez a sobrevivência neuronal e autorenovação de células

danificadas. Alterações dos níveis normais de neuroesteroides pode estar associada à etiologia de muitas doenças neurológicas (Compagnone and Mellon 2000; Charalampopoulos *et al.* 2008). Também, o envelhecimento e situações de stress têm vindo a ser relacionados com uma redução evidente dos níveis de hormonas esteroides em todas as regiões do SN, provocando a degeneração neuronal (Mellon and Griffin 2002; Wojtal *et al.* 2006). As hormonas esteroides pela sua hidrofobicidade conseguem passar do sangue para o LCR, levando a que a concentração destas hormonas reflita a composição plasmática. Assim, a presença de uma via esteroideogénica ativa no CP poderá servir para compensar a diminuição dos níveis de hormonas plasmáticas que de outro modo se poderiam refletir na composição hormonal do LCR com efeitos negativos na homeostase do SNC. A nossa hipótese baseia-se no facto desta falha poder estimular o CP a aumentar a produção de esteroides, e estes poderem restituir os níveis normais no LCR.

V. Conclusão e Perspetivas Futuras

Com a realização deste trabalho pudemos provar a existência de mRNA do CYP11A1, CYP11B3, 17B-HSD e ST5ared em CP de rato, assim como a localização das enzimas codificadas pelos genes 17B-HSD, ST5ared, CYP17A1 e CYP19A1 no citoplasma e em alguns núcleos das células epiteliais do CP de rato e porco. Também, demonstrámos que, nas CPEC e nos explantes de CPs de rato, parte da androstenediona tritiada foi convertida noutra hormona esteroide, permitindo sugerir que a enzima que catalisa esta reação está metabolicamente ativa. Portanto, este estudo sugere que, o CP possa ser uma fonte de esteroides.

Posteriormente, deverão ser efetuados estudos de ICC com co-marcação do retículo endoplasmático e da mitocôndria para uma localização mais precisa das enzimas esteroideogénicas nas células epiteliais do CP. Também, para obter uma maior conversão de precursor, ensaios ex vivo em CP de rato deveriam ser realizados, aumentando o número de CPs e o tempo de incubação com o precursor. Depois, podem, ainda, realizarem-se ensaios para determinar qual ou quais os esteroides convertidos, para se poder concluir quais as enzimas que estão metabolicamente ativas. A longo prazo, poder-se-á identificar quais os fatores que regulam a expressão destas enzimas.

VI. Referências

- Adamski, J., Normand, T., Leenders, F., Monte, D., Begue, A., Stehelin, D., Jungblut, P. W. and de Launoit, Y. (1995). "Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV." Biochem J **311** (Pt 2): 437-443.
- Aizawa, K., Iemitsu, M., Maeda, S., Jesmin, S., Otsuki, T., Mowa, C. N., Miyauchi, T. and Mesaki, N. (2007). "Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(2): E577-584.
- Andersson, S., Geissler, W. M., Wu, L., Davis, D. L., Grumbach, M. M., New, M. I., Schwarz, H. P., Blethen, S. L., Mendonca, B. B., Bloise, W., Witchel, S. F., Cutler, G. B., Jr., Griffin, J. E., Wilson, J. D. and Russel, D. W. (1996). "Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency." J Clin Endocrinol Metab **81**(1): 130-136.
- Basta-Kaim, A. Z., Kaciński, M. and Lasoń, W. (2006). "Effects of neurosteroids on neuronal survival: molecular basis and clinical perspectives." Acta Neurobiol Exp **66**: 359-367.
- Baulieu, E., Robel, P. and Schumacher, M. (2001). "Neurosteroids: beginning of the story." International review of neurobiology **46**: 1-32.
- Bondy, C., Werner, H., Roberts, C. and LeRoith, D. (1992). "Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II." Neuroscience **46**(4): 909-923.
- Brown, P. D., Davies, S. L., Speake, T. and Millar, I. D. (2004). "Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production." Neuroscience **129**(4): 957-970.
- Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B. and Bourguiba, S. (2003). "Aromatase expression and role of estrogens in male gonad." Reprod. Biol. Endocrinol **11**: 1-35.
- Celotti, F., Melcangi, R. C. and Martini, L. (1992). "The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function." Front Neuroendocrinol **13**(2): 163-215.
- Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N. and Gravanis, A. (2008). "Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival." Trends in Endocrinology & Metabolism **19**(8): 300-307.
- Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N. and Gravanis, A. (2008). "Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival." Trends Endocrinol Metab **19**(8): 300-307.
- Charytoniuk, D., Traiffort, E., Pinard, E., Issertial, O., Seylaz, J. and Ruat, M. (2000). "Distribution of bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein receptor transcripts in the rodent nervous system and up-regulation of bone morphogenetic protein receptor type II in hippocampal dentate gyrus in a rat model of global cerebral ischemia." Neuroscience **100**(1): 33-43.
- Chen, R., Kassem, N., Redzic, Z., Chen, C., Segal, M. and Preston, J. (2009). "Age-related changes in choroid plexus and blood-cerebrospinal fluid barrier function in the sheep." Experimental gerontology **44**(4): 289-296.
- Chodobski, A. and Szmydynger-Chodobska, J. (2001). "Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis." Microsc Res Tech **52**(1): 65-82.
- Chodobski, A., Szmydynger-Chodobska, J., Vannorsdall, M. D., Epstein, M. H. and Johanson, C. E. (1994). "AT1 receptor subtype mediates the inhibitory effect of central angiotensin II on cerebrospinal fluid formation in the rat." Regul Pept **53**(2): 123-129.

- Chodobski, A., Summy-Long, J., Lin, M.-S., Wojcik, B., Bui, V., Kil, E., Johanson, C. and Szmydynger-Chodobska, J. (2000). "Regulation of choroidal vasopressin secretion by the cAMP/PKA signaling pathway and the possible autocrine peptide actions." Soc Neurosci Abstr **26**: 337.
- Chodobski, A., Wojcik, B. E., Loh, Y. P., Dodd, K. A., Szmydynger-Chodobska, J., Johanson, C. E., Demers, D. M., Chun, Z. G. and Limthong, N. P. (1998). "Vasopressin gene expression in rat choroid plexus." Adv Exp Med Biol **449**: 59-65.
- Compagnone, N. A. and Mellon, S. H. (1998). "Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(8): 4678.
- Compagnone, N. A. and Mellon, S. H. (2000). "Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators." Frontiers in neuroendocrinology **21**(1): 1-56.
- Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L. and Mellon, S. H. (1995). "Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system." Endocrinology **136**(11): 5212-5223.
- Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L. and Mellon, S. H. (1995). "Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis." Endocrinology **136**(6): 2689-2696.
- Cornford, E. M., Varesi, J. B., Hyman, S., Damian, R. T. and Raleigh, M. J. (1997). "Mitochondrial content of choroid plexus epithelium." Exp Brain Res **116**(3): 399-405.
- Cottrell, D., Blakely, E., Johnson, M., Ince, P., Borthwick, G. and Turnbull, D. (2001). "Cytochrome c oxidase deficient cells accumulate in the hippocampus and choroid plexus with age." Neurobiology of aging **22**(2): 265-272.
- Cserr, H. F. (1971). "Physiology of the choroid plexus." Physiol Rev **51**(2): 273-311.
- Cserr, H. F. (1988). "Role of secretion and bulk flow of brain interstitial fluid in brain volume regulation." Ann N Y Acad Sci **529**: 9-20.
- Del Bigio, M. R. (1995). "The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid." Glia **14**(1): 1-13.
- Dharia, S., Slane, A., Jian, M., Conner, M., Conley, A. J. and Parker Jr, C. R. (2004). "Colocalization of P450c17 and cytochrome b5 in androgen-synthesizing tissues of the human." Biology of reproduction **71**(1): 83-88.
- Dohrmann, G. J. (1970). "The choroid plexus: a historical review." Brain Res **18**(2): 197-218.
- Emerich, D. F., Skinner, S. J. M., Borlongan, C. V., Vasconcellos, A. V. and Thanos, C. G. (2005). "The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain." Bioessays **27**(3): 262-274.
- Engelhardt, B., Wolburg-Buchholz, K. and Wolburg, H. (2001). "Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation." Microsc Res Tech **52**(1): 112-129.
- Fan, Y. S., Sasi, R., Lee, C., Winter, J. S., Waterman, M. R. and Lin, C. C. (1992). "Localization of the human CYP17 gene (cytochrome P450(17 alpha)) to 10q24.3 by fluorescence in situ hybridization and simultaneous chromosome banding." Genomics **14**(4): 1110-1111.
- Finch, P. W., Cunha, G. R., Rubin, J. S., Wong, J. and Ron, D. (1995). "Pattern of keratinocyte growth factor and keratinocyte growth factor receptor expression during mouse fetal development suggests a role in mediating morphogenetic mesenchymal-epithelial interactions." Developmental dynamics **203**(2): 223-240.

- Gao, B. and Meier, P. J. (2001). "Organic anion transport across the choroid plexus." Microsc Res Tech **52**(1): 60-64.
- Ghayee, H. K. and Auchus, R. J. (2007). "Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis." Rev Endocr Metab Disord **8**(4): 289-300.
- Gherzi-Egea, J. F. and Strazielle, N. (2001). "Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus." Microsc Res Tech **52**(1): 83-88.
- Gomez-Sanchez, C. E., Zhou, M. Y., Cozza, E. N., Morita, H., Foecking, M. F. and Gomez-Sanchez, E. P. (1997). "Aldosterone biosynthesis in the rat brain." Endocrinology **138**(8): 3369-3373.
- Hebert, J. M., Mishina, Y. and McConnell, S. K. (2002). "BMP signaling is required locally to pattern the dorsal telencephalic midline." Neuron **35**(6): 1029-1041.
- Huang, X., Ketova, T., Fleming, J. T., Wang, H., Dey, S. K., Litingtung, Y. and Chiang, C. (2009). "Sonic hedgehog signaling regulates a novel epithelial progenitor domain of the hindbrain choroid plexus." Development **136**(15): 2535-2543.
- Huang, X., Liu, J., Ketova, T., Fleming, J. T., Grover, V. K., Cooper, M. K., Litingtung, Y. and Chiang, C. (2010). "Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(18): 8422-8427.
- Ibanez, C., Shields, S., El-Etr, M., Leonelli, E., Magnaghi, V., Li, W. W., Sim, F., Baulieu, E. E., Melcangi, R. and Schumacher, M. (2003). "Steroids and the reversal of age-associated changes in myelination and remyelination." Progress in neurobiology **71**(1): 49-56.
- Irwin, D. J., Wunner, W. H., Ertl, H. C. and Jackson, A. C. (1999). "Basis of rabies virus neurovirulence in mice: expression of major histocompatibility complex class I and class II mRNAs." J Neurovirol **5**(5): 485-494.
- Johanson, C., Stopa, E., Baird, A. and Sharma, H. (2011). "Traumatic brain injury and recovery mechanisms: peptide modulation of periventricular neurogenic regions by the choroid plexus-CSF nexus." J Neural Transm **118**(1): 115-133.
- Johanson, C. E., Stopa, E. G. and McMillan, P. N. (2011). "The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance." Methods Mol Biol **686**: 101-131.
- Johanson, C. E., Palm, D. E., Primiano, M. J., McMillan, P. N., Chan, P., Knuckey, N. W. and Stopa, E. G. (2000). "Choroid plexus recovery after transient forebrain ischemia: role of growth factors and other repair mechanisms." Cell Mol Neurobiol **20**(2): 197-216.
- Keep, R. F. and Jones, H. C. (1990). "A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat." Brain Res Dev Brain Res **56**(1): 47-53.
- Knuckey, N. W., Finch, P., Palm, D. E., Primiano, M. J., Johanson, C. E., Flanders, K. C. and Thompson, N. L. (1996). "Differential neuronal and astrocytic expression of transforming growth factor beta isoforms in rat hippocampus following transient forebrain ischemia." Brain Res Mol Brain Res **40**(1): 1-14.
- Kurtcuoglu, V., Soellinger, M., Summers, P., Boomsma, K., Poulidakos, D., Boesiger, P. and Ventikos, Y. (2007). "Computational investigation of subject-specific cerebrospinal fluid flow in the third ventricle and aqueduct of Sylvius." Journal of biomechanics **40**(6): 1235-1245.
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S. X., Labrie, C., Simard, J., Breton, R. and Belanger, A. (1997). "The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology." Steroids **62**(1): 148-158.

- Lephart, E. D., Simpson, E. R., McPhaul, M. J., Kilgore, M. W., Wilson, J. D. and Ojeda, S. R. (1992). "Brain aromatase cytochrome P-450 messenger RNA levels and enzyme activity during prenatal and perinatal development in the rat." Molecular brain research **16**(3-4): 187-192.
- LeRoith, D., Werner, H., Faria, T. N., Kato, H., Adamo, M. and Roberts, C. T., Jr. (1993). "Insulin-like growth factor receptors. Implications for nervous system function." Ann N Y Acad Sci **692**: 22-32.
- Logan, A., Gonzalez, A., Hill, D., Berry, M., Gregson, N. and Baird, A. (1994). "Coordinated pattern of expression and localization of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 in the adult rat brain." Endocrinology **135**(5): 2255-2264.
- Luu-The, V., Zhang, Y., Poirier, D. and Labrie, F. (1995). "Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition." J Steroid Biochem Mol Biol **55**(5-6): 581-587.
- Maden, M. (2002). "Retinoid signalling in the development of the central nervous system." Nat Rev Neurosci **3**(11): 843-853.
- Marieb, E. N. and Hoehn, K. (2007). *Human Anatomy & Physiology*, Pearson Benjamin Cummings: 430-450.
- Martin, C., Bueno, D., Alonso, M. I., Moro, J. A., Callejo, S., Parada, C., Martin, P., Carnicero, E. and Gato, A. (2006). "FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells." Dev Biol **297**(2): 402-416.
- Matteson, K. J., Picado-Leonard, J., Chung, B. C., Mohandas, T. K. and Miller, W. L. (1986). "Assignment of the gene for adrenal P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase) to human chromosome 10." J Clin Endocrinol Metab **63**(3): 789-791.
- May, C., Kaye, J., Atack, J., Schapiro, M., Friedland, R. and Rapoport, S. (1990). "Cerebrospinal fluid production is reduced in healthy aging." Neurology **40**(3 Part 1): 500-500.
- Mellon, S. H. (1994). "Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance." J Clin Endocrinol Metab **78**(5): 1003-1008.
- Mellon, S. H. and Deschepper, C. F. (1993). "Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain." Brain Res **629**(2): 283-292.
- Mellon, S. H. and Griffin, L. D. (2002). "Neurosteroids: biochemistry and clinical significance." Trends Endocrinol Metab **13**(1): 35-43.
- Mellon, S. H., Griffin, L. D. and Compagnone, N. A. (2001). "Biosynthesis and action of neurosteroids." Brain Res Brain Res Rev **37**(1-3): 3-12.
- Mensah-Nyagan, A. G., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G. and Vaudry, H. (1999). "Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system." Pharmacol Rev **51**(1): 63-81.
- Miller, W. L. and Auchus, R. J. (2011). "The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders." Endocrine reviews **32**(1): 81-151.
- Mindnich, R., Möller, G. and Adamski, J. (2004). "The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." Molecular and cellular endocrinology **218**(1): 7-20.
- Moghrabi, N. and Andersson, S. (1998). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenases: physiological roles in health and disease." Trends Endocrinol Metab **9**(7): 265-270.

- Moore, K. L., Dalley, A. F. and Agur, A. M. R. (2006). Clinically Oriented Anatomy, Lippincott Williams & Wilkins: 889-892.
- Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A. and White, P. C. (1989). "Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta)." J Biol Chem **264**(35): 20961-20967.
- Morohashi, K., Sogawa, K., Omura, T. and Fujii-Kuriyama, Y. (1987). "Gene structure of human cytochrome P-450(SCC), cholesterol desmolase." J Biochem **101**(4): 879-887.
- Nakajin, S., Shively, J. E., Yuan, P. M. and Hall, P. F. (1981). "Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 alpha-hydroxylase and c17,20-lyase) associated with one protein." Biochemistry **20**(14): 4037-4042.
- Nielsen, C. M. and Dymecki, S. M. (2010). "Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus." Dev Biol **340**(2): 430-437.
- Nilsson, C., Ekman, R., Lindvall-Axelsson, M. and Owman, C. (1990). "Distribution of peptidergic nerves in the choroid plexus, focusing on coexistence of neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide and peptide histidine isoleucine." Regul Pept **27**(1): 11-26.
- Owler, B. K., Pitham, T. and Wang, D. (2010). "Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus." Cerebrospinal Fluid Res **7**: 15.
- Pelletier, G., Luu-The, V. and Labrie, F. (1995). "Immunocytochemical localization of type I 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain." Brain Res **704**(2): 233-239.
- Peltoketo, H., Luu-The, V., Simard, J. and Adamski, J. (1999). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes." J Mol Endocrinol **23**(1): 1-11.
- Plassart-Schiess, E. and Baulieu, E. E. (2001). "Neurosteroids: recent findings." Brain research reviews **37**(1-3): 133-140.
- Pollay, M., Stevens, A., Estrada, E. and Kaplan, R. (1972). "Extracorporeal perfusion of choroid plexus." J Appl Physiol **32**(5): 612-617.
- Praetorius, J. (2007). "Water and solute secretion by the choroid plexus." Pflügers Archiv European Journal of Physiology **454**(1): 1-18.
- Preston, J. E. (2001). "Ageing choroid plexus-cerebrospinal fluid system." Microscopy research and technique **52**(1): 31-37.
- Raballo, R., Rhee, J., Lyn-Cook, R., Leckman, J. F., Schwartz, M. L. and Vaccarino, F. M. (2000). "Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex." The Journal of Neuroscience **20**(13): 5012-5023.
- Rainey, W. E. (1999). "Adrenal zonation: clues from 11 [beta]-hydroxylase and aldosterone synthase." Molecular and cellular endocrinology **151**(1-2): 151-160.
- Ray, W. J., Bain, G., Yao, M. and Gottlieb, D. I. (1997). "CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family." Journal of Biological Chemistry **272**(30): 18702-18708.
- Redzic, Z. B. and Segal, M. B. (2004). "The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium." Advanced drug delivery reviews **56**(12): 1695-1716.
- Redzic, Z. B., Preston, J. E., Duncan, J. A., Chodobski, A. and Szmydynger-Chodobska, J. (2005). "The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging." Curr Top Dev Biol **71**: 1-52.

- Reincke, M., Beuschlein, F., Menig, G., Hofmockel, G., Arlt, W., Lehmann, R., Karl, M. and Allolio, B. (1998). "Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex." Journal of Endocrinology **156**(3): 415-423.
- Rose, K. A., Stapleton, G., Dott, K., Kieny, M. P., Best, R., Schwarz, M., Russell, D. W., Bjorkhem, I., Seckl, J. and Lathe, R. (1997). "Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7 α -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy pregnenolone." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 4925-4930.
- Sakka, L., Coll, G. and Chazal, J. (2011). "Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid." Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis **128**(6): 309-316.
- Saladin, K. S. (2010). *Anatomy & physiology: the unity of form and function*, McGraw-Hill: 496-500.
- Sanderson, J. T. (2006). "The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals." Toxicol Sci **94**(1): 3-21.
- Schreiber, G., Aldred, A. R., Jaworowski, A., Nilsson, C., Achen, M. G. and Segal, M. B. (1990). "Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus." Am J Physiol **258**(2 Pt 2): R338-345.
- Schumacher, M., Sitruk-Ware, R. and De Nicola, A. F. (2008). "Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair." Current Opinion in Pharmacology **8**(6): 740-746.
- Schumacher, M., Akwa, Y., Guennoun, R., Robert, F., Labombarda, F., Désarnaud, F., Robel, P., De Nicola, A. F. and Baulieu, E. E. (2000). "Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects." Journal of neurocytology **29**(5): 307-326.
- Seeley, R., Kennedy, J. and Tate, P. (2003). *Anatomia e Fisiologia*, 6ª Edição. Loures, Lusociência: 443-458
- Segal, M. B. (2000). "The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid." Cell Mol Neurobiol **20**(2): 183-196.
- Segal, M. B. (2001). "Transport of nutrients across the choroid plexus." Microsc Res Tech **52**(1): 38-48.
- Serot, J. M., Béné, M. C. and Faure, G. C. (2003). "Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease." Front Biosci **8**: s515-521.
- Serot, J. M., Bene, M. C., Foliguet, B. and Faure, G. C. (2000). "Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium." J Neuroimmunol **105**(2): 115-119.
- Serot, J. M., Béné, M. C., Foliguet, B. and Faure, G. C. (2000). "Morphological alterations of the choroid plexus in late-onset Alzheimer's disease." Acta neuropathologica **99**(2): 105-108.
- Simard, J., Ricketts, M. L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F. A. and Melner, M. H. (2005). "Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family." Endocr Rev **26**(4): 525-582.
- Simpson, E. R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W. C., Robertson, K., Britt, K., Speed, C. and Jones, M. (2002). "Aromatase--a brief overview." Annu Rev Physiol **64**: 93-127.
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D. and et al. (1994).

- "Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis." Endocr Rev **15**(3): 342-355.
- Skipor, J. and Thiery, J. C. (2008). "The choroid plexus & cerebrospinal fluid system: Undervalued pathway of neuroendocrine signaling into the brain." Acta Neurobiol Exp **68**: 414-428.
- Speake, T., Whitwell, C., Kajita, H., Majid, A. and Brown, P. D. (2001). "Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus." Microsc Res Tech **52**(1): 49-59.
- Standring, S. (2010). *Gray's Anatomy*, Elsevier Health Sciences: 1201-1209.
- Strazielle, N. and Gherzi-Egea, J. F. (2000). "Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **59**(7): 561.
- Szmydynger-Chodobska, J., Chodobski, A., Wojcik, B., Dodd, K., Trimble, W., Burkart, A., Johanson, C. and AC., F. (1998). "The presence of membrane fusion proteins in choroid plexus epithelium." Soc Neurosci Abstr **24**: 1312.
- Thiboutot, D., Jabara, S., McAllister, J. M., Sivarajah, A., Gilliland, K., Cong, Z. and Clawson, G. (2003). "Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1)." J Invest Dermatol **120**(6): 905-914.
- Thigpen, A. E., Silver, R. I., Guileyardo, J. M., Casey, M. L., McConnell, J. D. and Russell, D. W. (1993). "Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression." J Clin Invest **92**(2): 903-910.
- Thouvenot, E., Lafon-Cazal, M., Demetree, E., Jouin, P., Bockaert, J. and Marin, P. (2006). "The proteomic analysis of mouse choroid plexus secretome reveals a high protein secretion capacity of choroidal epithelial cells." Proteomics **6**(22): 5941-5952.
- Tremblay, Y., Ringler, G. E., Morel, Y., Mohandas, T. K., Labrie, F., Strauss, J. F., 3rd and Miller, W. L. (1989). "Regulation of the gene for estrogenic 17-ketosteroid reductase lying on chromosome 17cen---q25." J Biol Chem **264**(34): 20458-20462.
- Wen, G. Y., Wisniewski, H. M. and Kascsak, R. J. (1999). "Biondi ring tangles in the choroid plexus of Alzheimer's disease and normal aging brains: a quantitative study." Brain research **832**(1-2): 40-46.
- White, P. C., Curnow, K. M. and Pascoe, L. (1994). "Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes." Endocr Rev **15**(4): 421-438.
- Wojtal, K., Trojnar, M. K. and Czuczwar, S. J. (2006). "Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids." Pharmacol Rep **58**(3): 335-340.
- Wolburg, H. and Paulus, W. (2010). "Choroid plexus: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 75-88.
- Yool, A. J. (2007). "Aquaporins: multiple roles in the central nervous system." Neuroscientist **13**(5): 470-485.
- Zappaterra, M. W. and Lehtinen, M. K. (2012). "The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond." Cell Mol Life Sci.
- Zhang, G. and Miller, W. L. (1996). "The human genome contains only two CYP11B (P450c11) genes." J Clin Endocrinol Metab **81**(9): 3254-3256.